

Ушакова Екатерина Игоревна

**Экспериментальная иммунотерапия злокачественного новообразования путем  
перепрограммирования миелоидных клеток в модели метастатической  
карциномы у лабораторных мышей**

3.2.7. Иммунология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор **Атауллаханов Равшан Иноятович**

**Официальные оппоненты:**

**Анисимова Наталья Юрьевна** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета и биотехнологий Научно-исследовательского института экспериментальной онкологии и канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

**Кармакова Татьяна Анатольевна** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отделения прогноза эффективности консервативного лечения Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 68.1.002.01 в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России по адресу: 115522, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте: <http://nrcii.ru/dissertatsionnyy-совет/zashchitydissertatsiy/>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор биологических наук

Шиловский Игорь Петрович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Иммуносупрессивные свойства среды внутри опухоли создаются как злокачественными, так и незлокачественными клетками, а также веществами, которые они вырабатывают. Значительную роль в иммуносупрессии играют миелоидные клетки: ассоциированные с опухолью макрофаги, внутриопухолевые дендритные клетки, привлеченные опухолью миелоидные супрессоры [Colegio O. R. et al. 2014, Gabrilovich D. I. et al. 2012, 2017, Maier B. et al. 2020, Li Y. et al. 2021]. Эти клетки производят растворимые ингибиторы иммунных реакций, такие как IDO, TGF- $\beta$ , IL-10, простагландины, а также экспонируют на своей поверхности молекулы, обладающие способностью подавлять активность клеток иммунитета, в частности, молекулы PD-L1 и PD-L2, вызывающие функциональный паралич и гибель Т-клеток [Qian B. et al. 2010, Colegio O. R. et al. 2014, Noy R. et al. 2014, Ruffell B. et al. 2015]. Не преодолев супрессию иммунитета, нельзя достичь эффективной элиминации злокачественных клеток силами иммунных механизмов. Поэтому исследование лечебного действия препаратов, которые могут перепрограммировать иммунные клетки внутри опухоли в противоопухолевый фенотип, а также могут преодолеть иммуносупрессивные механизмы и индуцировать адаптивные иммунные реакции, представляет актуальный подход в онкоиммунологии [Wu T. et al. 2025].

Новый подход в иммунотерапии основан на возможности перепрограммирования тканевых макрофагов и дендритных клеток в противоопухолевый фенотип [Wu T. et al. 2025]. Изменение функционального состояния этих клеток достигается воздействием фармакологическими агентами, действующими через рецепторы врожденного иммунитета – Toll-подобные рецепторы 3 и 4 типов (TLR3 и TLR4, соответственно). Перепрограммирование переводит миелоидные клетки из состояния, способствующего прогрессивному росту опухоли, в состояние активной противоопухолевой защиты.

Данная диссертационная работа актуальна, поскольку посвящена разработке нового подхода к лечению метастатической солидной опухоли путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR, а также исследованию детальных механизмов противоопухолевой иммунной защиты. Точное знание механизмов, понимание совокупности интегральных эффектов агонистов TLR могут

составить основу для разработки новых методов терапии онкологических заболеваний.

### **Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности**

Тема диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности «3.2.7. Иммунология» (Направления исследований: №2, №3, №6).

### **Степень разработанности темы исследования**

Диссертационная работа посвящена исследованию иммунологических механизмов действия и эффективности новой экспериментальной иммунотерапии при злокачественном опухолевом процессе у лабораторных животных. Новый иммунотерапевтический подход состоит в перепрограммировании тканевых макрофагов и дендритных клеток в противоопухолевый фенотип [Wu T. et al. 2025].

Диссертационная работа органически связана с многолетними исследованиями лаборатории активации иммунитета ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России. Был накоплен значительный объем данных, касающихся действия агонистов TLR3 и TLR4 на макрофаги и дендритные клетки в условиях культуры клеток *in vitro*. Было показано, что агонисты TLR3 и TLR4 индуцируют включение транскрипционной программы, характерной для M1-макрофагов и D1-дендритных клеток [Пичугин А. В. и др. 2015, 2018, Лебедева Е. С. и др. 2017, 2018, Чулкина М. М и др. 2018, Bagaev A. et al. 2018, Lebedeva E. et al. 2018]. Без воздействия агонистами TLR макрофаги и дендритные клетки стимулируют размножение клеток опухолевых линий в совместной культуре *in vitro* [Bagaev A. et al. 2018]. После активации агонистами TLR перепрограммированные макрофаги и дендритные клетки не только не стимулируют размножения опухолевых клеток, но, напротив, быстро и эффективно способствуют их гибели [Bagaev A. et al. 2018].

Несмотря на существенный прогресс в понимании эффектов агонистов TLR на макрофаги и дендритные клетки, до настоящего времени не было изучено применение перепрограммирования макрофагов и дендритных клеток с помощью агонистов TLR3 и TLR4 в условиях организма *in vivo*.

### **Цель исследования**

Изучить механизмы и эффективность противоопухолевого действия экспериментальной иммунотерапии метастатической карциномы 4T1 путём перепрограммирования миелоидных клеток агонистами Toll-подобных рецепторов.

### **Задачи исследования**

1. В экспериментальной модели карциномы 4Т1 у мышей исследовать динамические характеристики роста и метастазирования опухоли и детально описать клеточный состав иммунного микроокружения опухоли и органов-мишеней метастазирования.
2. Оценить влияние агонистов TLR3 и TLR4 на рост карциномы 4Т1 и на выживаемость мышей-опухоленосителей.
3. Изучить эффективность лечения метастатической карциномы 4Т1 у мышей путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции первичной опухоли.
4. Исследовать динамику противоопухолевых иммунных реакций у мышей с карциномой 4Т1 в процессе иммунотерапии после хирургического удаления опухоли.
5. Исследовать эффективность формирования долговременной Т-клеточной иммунной памяти у мышей с карциномой 4Т1, выживших после проведения экспериментальной иммунотерапии путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR после хирургической резекции первичной опухоли.

### **Научная новизна работы**

Впервые системно исследованы врожденные и адаптивные иммунные реакции против опухоли в условиях комбинированного лечения путем хирургической резекции первичной опухоли и перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4.

Впервые показано, что инъекции TLR3 и TLR4 агонистов после хирургической резекции первичной опухоли 4Т1 активируют противоопухолевые реакции CD4- и CD8-Т-клеток в дренирующих лимфатических узлах и в селезенке.

Впервые показано, что инъекции агонистов TLR3 и TLR4 перепрограммируют тканевые макрофаги и дендритные клетки (в частности, макрофаги и дендритные клетки в ткани легкого) в клетки с выраженной противоопухолевой цитотоксической активностью в отношении злокачественных клеток опухоли.

Впервые показано, что применение агонистов TLR3 и TLR4 после хирургической резекции первичной опухоли 4Т1 способствует формированию долговременной иммунной памяти в виде долгоживущих CD4- и CD8-Т-клеток памяти, а также В-клеток памяти, продуцирующих IgG-антитела.

### **Теоретическая значимость работы**

Теоретическая значимость исследования заключается в получении новых знаний о биологических механизмах действия агонистов TLR3 и TLR4 на клеточное и гуморальное звенья противоопухолевого иммунитета. Установлено, что агонисты TLR способствуют индукции противоопухолевых Т-клеток и IgG-антител, специфичных к антигенам опухоли.

Полученные результаты исследований расширяют современные представления об участии миелоидных клеток в противоопухолевом иммунном ответе. Показано, что у мышей, получивших агонисты TLR, тканевые макрофаги и дендритные клетки приобретают свойства цитотоксических клеток, элиминируют метастазы злокачественной опухоли. При индукции рецидива миелоидные клетки внутри опухоли поляризованы в противоопухолевое состояние, что подтверждается усиленной экспрессией мРНК генов *Nos2*, *Il1b* и *Tnf*.

Теоретическую ценность представляют и новые сведения о возможности индукции долговременной Т-клеточной и В-клеточной иммунной памяти против опухоли не через прямое воздействие на лимфоидные клетки, а путем перепрограммирования макрофагов и дендритных клеток с помощью агонистов TLR3 и TLR4.

### **Практическая значимость работы**

Практическая значимость работы обусловлена разработкой и экспериментальным обоснованием нового подхода к лечению солидных злокачественных метастатических опухолей, основанного на перепрограммировании миелоидных клеток агонистами TLR4 и TLR3 после хирургической резекции первичной опухоли. В экспериментальной модели солидной злокачественной метастатической карциномы 4Т1 у мышей BALB/с разработанный в данной диссертационной работе подход к лечению приводил к выживаемости 50% животных. Установлено, что сочетание системной иммунотерапии агонистами TLR с хирургической резекцией первичной опухоли приводит к достоверному снижению числа метастатических очагов в лёгких, а в ряде случаев — к полному устранению метастатической болезни. Ключевым преимуществом предложенной комбинации является усиление как локального, так и системного противоопухолевого иммунитета за счет активации врожденного и адаптивного иммунного ответа, что позволяет

рассматривать данный подход как перспективную стратегию послеоперационной иммунотерапии.

В данной диссертационной работе показана перспективность трансляции в клиническую онкологию результатов иммунотерапии с использованием агонистов TLR3 и TLR4. Об этом свидетельствуют представленные в диссертации результаты экспериментов *in vitro*, показывающие превращение моноцитарных макрофагов и дендритных клеток человека в эффективных противоопухолевых киллеров под влиянием агонистов TLR3 и TLR4.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты работы используются в экспериментальной практике в лаборатории активации иммунитета, лаборатории иммунохимии, лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России при разработке новых терапевтических подходов к анализу активности иммунных реакций против антигенов опухолей с целью преодоления иммуносупрессии при онкологических заболеваниях (акт внедрения от 20 июня 2020 г. и акт внедрения от 20 февраля 2023 г., Приложение А).

### **Методология и методы исследования**

Для выполнения диссертационной работы были использованы современные методы исследования. Оценка клеточного состава опухоли, легких и вторичных лимфоидных органов осуществлена с использованием проточной цитофлуориметрии. Оценка антиген-специфических Т-клеточных реакций выполнена с помощью метода ELISpot. Оценка антиген-специфичных антител проведена с помощью методов ELISA и проточной цитофлуориметрии. Оценка экспрессии генов в миелоидных клетках осуществлена методом ПЦР в реальном времени. Оценка терапевтической эффективности агонистов TLR проведена *in vivo* на модели карциномы молочной железы. Обработка первичных результатов выполнена с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.

### **Положения, выносимые на защиту**

1) Перепрограммирование миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 в противоопухолевый фенотип после хирургической резекции первичной карциномы 4T1 способствует усилению противоопухолевых адаптивных иммунных реакций.

2) Перепрограммирование миелоидных клеток агонистами TLR индуцирует формирование долговременной иммунной памяти, специфичной к антигенам опухоли.

3) Экспериментальная иммунотерапия путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции первичной опухоли высокоэффективна для лечения солидной злокачественной метастатической карциномы 4T1 у мышей BALB/c.

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность результатов диссертационной работы обусловлена применением современного оборудования, прошедшего своевременную поверку, использованием сертифицированных методик, достаточным объемом экспериментальных данных и корректным применением статистических методов, адекватных поставленным задачам. Установлено, что результаты диссертационной работы являются достоверными.

### **Апробация результатов**

Материалы диссертации были представлены и обсуждены на международных и отечественных конференциях: The 26<sup>th</sup> International Student Congress Of (bio)Medical Sciences, Гронинген, Голландия, 3–7 июня 2019 г., 6th European Congress of immunology, Белград, Сербия, 1–4 сентября 2021 г., The 8th Immunotherapy of Cancer Conference, Мюнхен, Германия, 8–9 октября 2021 г., II Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, Сочи, Россия, 3–8 октября 2021 г., The 9th Immunotherapy of Cancer Conference, Мюнхен, Германия, 22–24 сентября 2022 г., The 3rd Immuno-Oncology World Congress, Копенгаген, Дания, 2–3 ноября 2023 г., 1st International Caparica Conference on Prescriptomics & Precision Medicine, Лиссабон, Португалия, 11–13 мая 2024 г.

### **Личный вклад автора**

Автор непосредственно участвовала во всех этапах выполнения диссертационного исследования: постановке задач и проведении экспериментов, получении исходных данных, разработке экспериментальных моделей и методик, обработке и интерпретации результатов, а также подготовке публикаций по выполненной работе.

## **Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах**

По основным материалам диссертационной работы опубликовано 15 печатных работ, в том числе 7 статей в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и доктора наук; опубликовано 8 публикаций в сборниках материалов конференций.

## **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 182 страницах машинописного текста и содержит 33 рисунка и 7 таблиц. Диссертация оформлена в традиционном стиле и включает в себя следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», «Приложение». Библиография включает 179 источников, в том числе 21 отечественный и 158 зарубежных.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Животные.** Мышей линии BALB/c (N=745) в возрасте 8–10 недель, полученных из питомника «Столбовая», содержали на стандартной диете в стандартных условиях вивария ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России.

**Экспериментальная модель.** Лабораторным мышам вводили подкожно суспензию сингенной клеточной линии 4T1 в дозе 15 тысяч клеток на животное. На 11-й день после имплантации проводили хирургическую резекцию первичной опухоли при массе 12–15 мг. С 12-го дня терапию осуществляли внутрибрюшинными инъекциями агонистов TLR каждые 4–5 дней: агонист TLR3 Poly I:C — 3 мкг/мышь, агонист TLR4 Иммуномакс (ИММ, IMM) — 14 мкг/мышь, а также комбинация IMM и Poly I:C в указанных дозах.

**Культуры клеток.** Культура опухолевых клеток линии 4T1 была предоставлена профессором М. Г. Агаджаняном (Институт Молекулярной Медицины, Хантингтон Бич, Калифорния, США). Линия 4T1 с устойчивой GFP-экспрессией получена в лаборатории путем трансфекцией лентивирусным вектором pLV-neo-EGFP с FACS-сортировкой GFP<sup>high</sup>-популяции на BD FACSAria II.

**Получение суспензии клеток селезенки, опухоли, легких и лимфатических узлов (ЛУ).** Мышей выводили из эксперимента дислокацией шейных позвонков.

Клетки селезенки получали с использованием центрифугирования на градиенте плотности фиколла. Клетки из ткани легких и опухоли получали ферментативно при использовании коллагеназы I типа, IV типа и ДНКазы. Извлеченные ЛУ в стерильных условиях измельчали наконечником от шприца, полученную суспензию протирали через фильтр с порами размером 70 мкм.

**Культуры дендритных клеток и макрофагов *in vitro*.** Дифференцировку дендритных клеток (ДК) и макрофагов (МФ) костного мозга мышей осуществляли *in vitro* в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ, 10 нг/мл) и 50 мкМ 2-меркаптоэтанола. Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли из образцов цельной крови здоровых доноров с использованием центрифугирования на градиенте плотности фиколла. Адгезионные моноциты культивировали в присутствии рекомбинантного человеческого ГМ-КСФ (100 нг/мл) и ИЛ-4 (25 нг/мл) в течение 7 дней для генерации незрелых ДК и МФ.

**Проточная цитофлуориметрия и сортировка чистых популяций клеток.** Для идентификации различных клеточных популяций использовали две панели антител. Антитела использованные для анализа лимфоидных популяций: CD45, CD19, CD69, CD8a, CD49b, CD4, TCR  $\gamma/\delta$ , CD3, CD11b. Антитела использованные для анализа миелоидных популяций: CD45, CD11b, CD11c, Ly6G, Ly6C, I-A/I-E, F4/80. Из суспензии клеток опухоли, селезенки, ЛУ выделяли чистые CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клетки, CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клетки, CD45<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> миелоидные клетки, из легких выделяли ДК CD45<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Ly6C<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> I-A/I-E<sup>+</sup>, МФ CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> F4/80<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> I-A/I-E<sup>+</sup> методом сортировки на проточном цитофлуориметре-сортировщике BD FACS Aria II.

**Количественный анализ метастатических колониеобразующих единиц (КОЕ) в ткани легкого методом лимитирующих разведений.** Максимальное количество клеток в культуре составляло 1/10 часть от всей суспензии, приготовленной из ткани правого и левого легких. Культуры с пошагово уменьшающимся количеством клеток легкого получали титрованием с шагом 3.

**Анализ противоопухолевой цитотоксической активности *in vitro*.** В лунки планшета для культивирования помещали 200 клеток карциномы 4T1-GFP и CD8-Т-клеток, полученные из ЛУ и ткани опухоли или тканевые ДК, МФ, выделенные из

ткани легких. Для анализа противоопухолевой активности ДК/МФ, выделенных из РВМС, клетки помещали в лунки планшета вместе с 450 клетками K562-GFP.

**Анализ Т-клеточных реакций, специфичных к антигенам карциномы 4Т1 методом ELISpot.** Специфический Т-клеточный ответ индуцировали в совместной культуре Т-клеток с антиген-презентирующими ДК, предварительно нагруженными лизатом клеток 4Т1 или совместно с клетками карциномы 4Т1. Совместные культуры инкубировали в течение 36 часов, после чего выявляли клетки, секретирующие интерферон- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ) в лунках планшета для ELISpot.

**Определение экспрессии генов в CD11b<sup>+</sup> миелоидных клетках,** выделенных из ткани опухоли FACS-сортировкой на BD FACS Aria II, проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора реагентов фирмы «Синтол» (Россия). Значение экспрессии мРНК каждого исследованного гена вычисляли относительно референсного гена *Actb*. Для определения абсолютного количества копий использовался метод 2<sup>- $\Delta\Delta CT$</sup> .

**Анализ сывороточных противоопухолевых IgG-антител, специфично связывающихся с антигенами карциномы 4Т1,** исследовали методами иммуноферментного анализа (ИФА) и проточной цитофлуориметрии.

**Статистический анализ** данных выполняли с использованием программного обеспечения Graph-Pad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc., США). Различия между выборками при значениях  $p < 0,05$  считались статистически значимыми. Данные представляли в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **Характеристика экспериментальной модели солидной опухоли молочной железы у мышей BALB/c**

В качестве экспериментальной модели метастатической карциномы была выбрана клеточная линия 4Т1, полученная из агрессивного рака молочной железы (РМЖ) мыши, признанная моделью трижды негативного РМЖ у человека. Для характеристики экспериментальной модели солидной опухоли подкожно вводили 15 тысяч клеток карциномы 4Т1 сингенным мышам линии BALB/c. У 100% мышей развивались солидные опухоли. Через 18–20 дней после инокуляции злокачественных клеток мыши с прогрессивно растущей карциномой 4Т1 начинали погибать.

Карцинома 4T1 отличается развитием выраженной иммуносупрессии. Рост опухоли сопровождается накоплением миелоидных клеток-супрессоров во всех тканях: лимфоидных органах, в легких, и, конечно, в самой опухоли. В результате роста карциномы 4T1 количество CD45<sup>+</sup> лейкоцитов, инфильтрирующих ткань легких, возрастало в среднем в 3 раза. Большая часть вновь пришедших клеток была представлена CD11b<sup>+</sup> миелоидными клетками, среди которых доминировали CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> тканевые МФ. Происходила инфильтрация Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup> миелоидными супрессорами, содержание этих клеток увеличивалось в 2 раза, достигая 12% от всех лейкоцитов в ткани легких. Очевидным было нарастание содержания CD11c<sup>+</sup> ДК.

В опухолевом микроокружении карциномы 4T1 наблюдалось около 75% миелоидных клеток: ассоциированные с опухолью МФ, ДК, миелоидные супрессоры и моноциты. Таким образом, в модели карциномы 4T1 иммуносупрессивное окружение доминирует как в самой опухоли, так и во всем организме. В этих условиях любая иммунотерапия сталкивается с проблемой преодоления мощной иммуносупрессии, которая защищает быстро растущую и активно метастазирующую опухоль.

### **Исследование влияния агонистов TLR3 и TLR4 на рост 4T1 карциномы *in vivo***

Для проверки гипотезы о возможном влиянии агонистов TLR на рост опухоли с мощной иммуносупрессией, мышам подкожно вводили 15 тысяч клеток карциномы 4T1 для инициации роста солидной опухоли. Через 3 дня после инокуляции начинали курс инъекций агонистов TLR. Полученные результаты свидетельствуют о том, что инъекционное введение агониста TLR4 или агониста TLR3 не влияет на скорость роста солидных опухолей 4T1 и на выживаемость мышей.

### **Изучение эффективности применения перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции опухоли в модели метастатической карциномы 4T1**

Для снижения опухолевой нагрузки и наиболее эффективного перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR проводили резекцию первичной опухоли. Первичная опухоль не только содержит основную массу злокачественных клеток, которые, в свою очередь, усиливают иммуносупрессию, но и является источником непрерывно образующихся метастатических клеток. После удаления первичной опухоли не происходило излечения от смертельного

опухолевого процесса. Наблюдались множественные метастазы. Животные погибали от метастатической болезни. Только гибель наступала на 30 дней позже, по сравнению с животными, у которых первичную опухоль не удаляли.

Методом лимитирующих разведений исследовали количество метастатических КОЕ карциномы 4Т1 в разных тканях. В день резекции в легких обнаруживалось несколько тысяч КОЕ 4Т1. А через месяц после этого в легких было уже 250 тысяч злокачественных клеток. В селезенке – 15 тысяч клеток.

В модели метастатической болезни после хирургического удаления первичной опухоли экспериментальная иммунотерапия агонистами TLR оказывала значительный противоопухолевый эффект. Сочетанное применение агонистов TLR3 и TLR4 приводило к выздоровлению 50% животных при том, что в контроле без агонистов TLR все 100% животных погибали (рисунок 1).

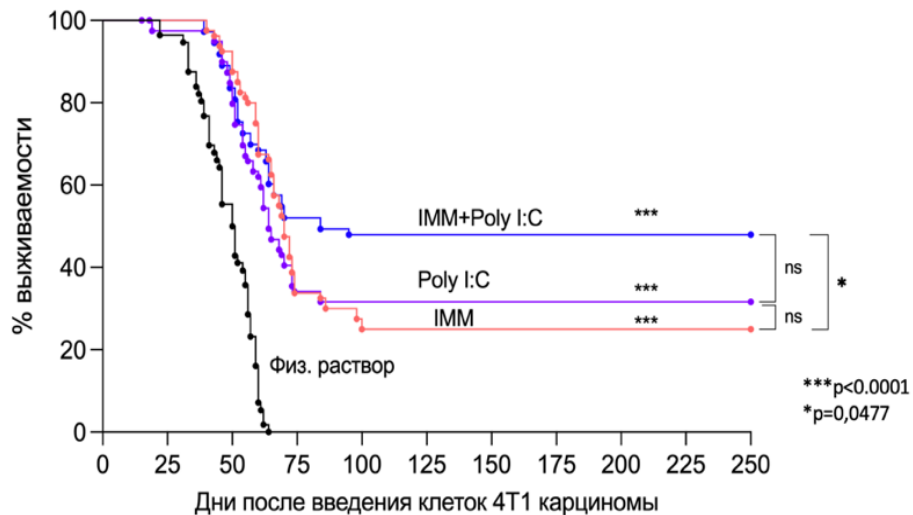


Рисунок 1 – Суммарные результаты 5-ти независимых экспериментов по динамике выживаемости мышей после резекции первичной карциномы 4Т1 и последующего курса инъекций агонистов TLR. Общее количество мышей N= 421

Полученные результаты свидетельствуют об эффективности экспериментального подхода – иммунотерапии агонистами TLR после хирургической резекцией опухоли. При метастатическом РМЖ полное излечение наблюдалось у 25–50% экспериментальных животных, что подтверждено отсутствием рецидива и метастазов через 8 месяцев после иммунотерапии.

### **Исследование противоопухолевой активности миелоидных клеток *in situ***

Под влиянием экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR происходило перепрограммирование МФ и ДК. Это происходило системно, во всем организме, в том числе в тех тканях и органах, куда мигрировали метастатические



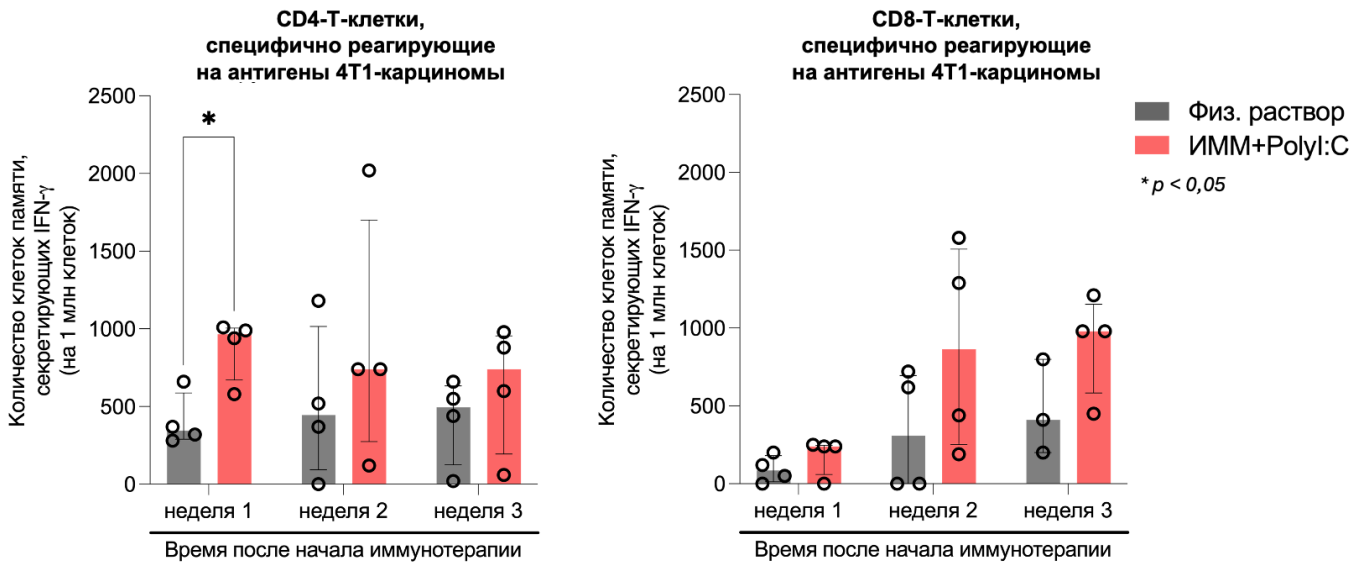


Рисунок 3 – Динамика противоопухолевых Т-клеточных реакций в дренирующем опухоли ЛУ в первые три недели иммунотерапии агонистами TLR

В селезенке происходила активация популяции миелоидных клеток и нарастало количество CD8-T-клеток, секретирующих ИФН-γ (рисунок 4).

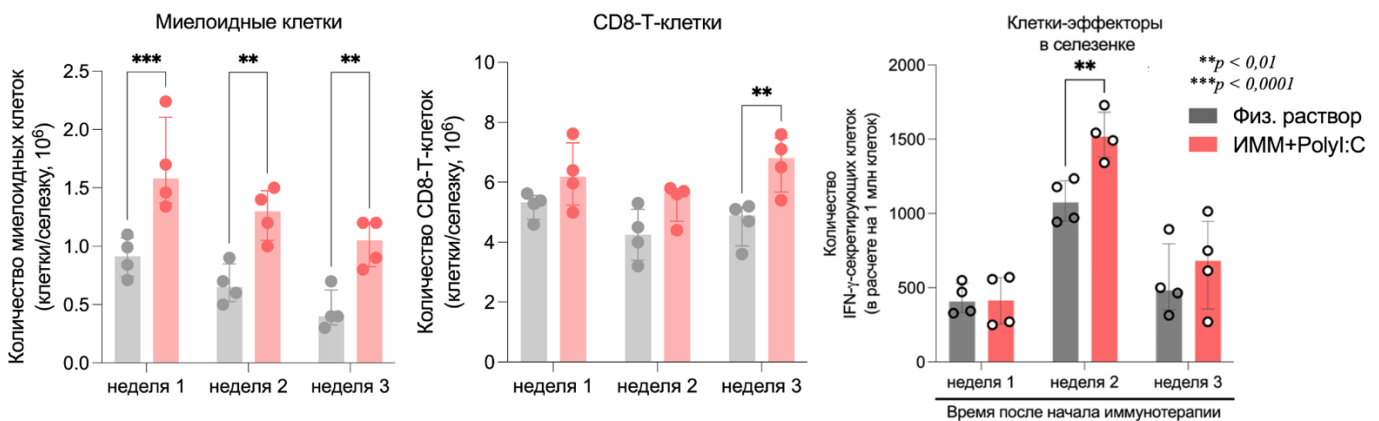


Рисунок 4 – Т-клеточные реакции в селезенке мышей на первых трех неделях проведения иммунотерапии агонистами TLR

Таким образом, данные показывают, что у мышей, получавших иммунотерапию агонистами TLR ИММ и Poly I:C наблюдаются усиленные противоопухолевые реакции как CD4-T-клеток, так и CD8-T-клеток. Так, TLR-активированные ДК способствовали увеличению интенсивности иммунных реакций антиген-специфических Т-клеток во вторичных лимфоидных органах.

### Исследование динамики противоопухолевых антител в процессе иммунотерапии агонистами TLR3 и TLR4

Наряду с Т-клеточными реакциями против опухолевых антигенов, исследовалось наличие антител, специфично связывающихся с антигенами карциномы 4Т1 (рисунок 5).

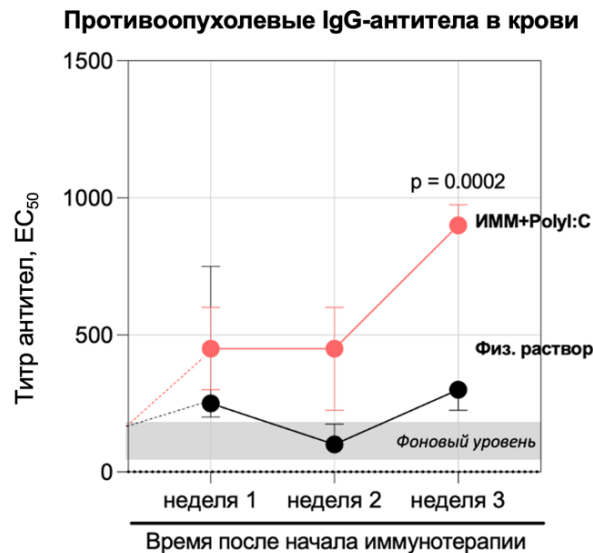


Рисунок 5 – Динамика противоопухолевых IgG-антител, специфичных к антигенам лизата клеток карциномы 4T1, определенных методом ИФА

У мышей с карциномой 4T1 противоопухолевые антитела практически не детектировались. Этот иммунный механизм полностью подавлялся опухолевым процессом и иммуносупрессией. Иммунотерапия перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 после хирургического удаления первичной опухоли инициировала продукцию противоопухолевых IgG-антител, которые становились вполне заметными через 3 недели после начала терапии. Схожая динамика была выявлена при исследовании IgG-антител к поверхностным антигенам карциномы 4T1 методом проточной цитофлуориметрии.

### **Исследование механизмов формирования долговременной иммунной памяти у выживших животных после проведения экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR после резекции первичной опухоли – модель рецидива**

Как было отмечено выше, 50% животных выживают с помощью иммунотерапии перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR после резекции первичной опухоли. Через 8 месяцев таким животным, выжившим в результате экспериментальной иммунотерапии, вводили клетки карциномы 4T1, чтобы имитировать появление рецидивной опухоли. У 15% мышей опухоли вообще не появились (рисунок 6 А). У 85% мышей опухоли развивались очень медленно, оставались небольших размеров. При этом, у некоторых мышей опухоли появлялись и вскоре исчезали (рисунок 6 Б). В соответствующем контроле у наивных здоровых животных опухоли появились в 100% случаев и росли очень быстро.

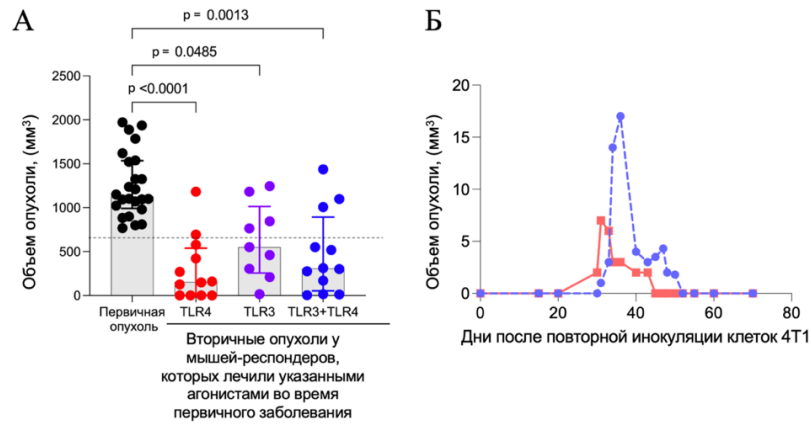


Рисунок 6 – Динамика роста вторичных, рецидивных, опухолей в группах мышей, ранее получавших иммунотерапию агонистами TLR

Вторичные опухоли были интенсивно инфильтрированы противоопухолевыми CD4- и CD8-Т-клетками памяти, и Т-клетками эффекторами, а также CD8-Т-клетками с высоким уровнем цитотоксической активности против клеток карциномы 4Т1 (рисунок 7).

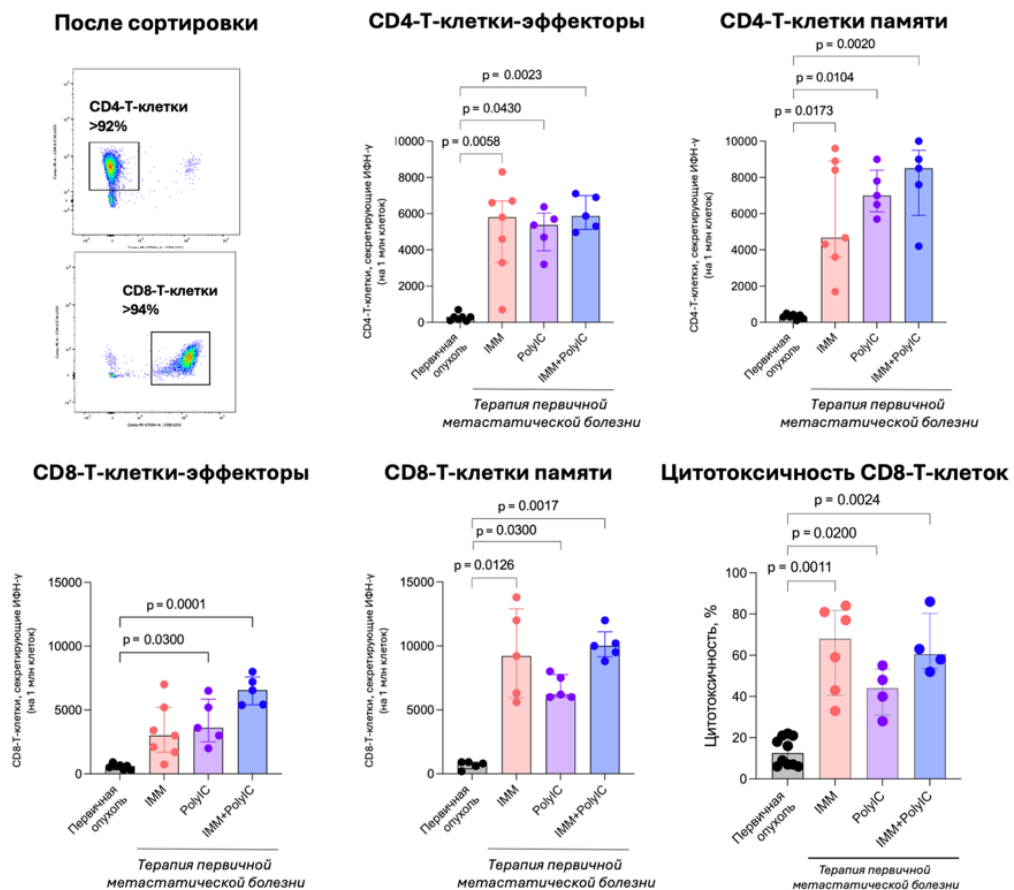


Рисунок 7 – Т-клеточные реакции, специфичные к антигенам карциномы 4Т1, во вторичных опухолях мышей-ответчиков на иммунотерапию

Внутриопухолевые миелоидные клетки были поляризованы в противоопухолевое состояние, что подтверждалось по усиленной транскрипции генов *Inos*, *Tnf* и *Il1b* (рисунок 8).

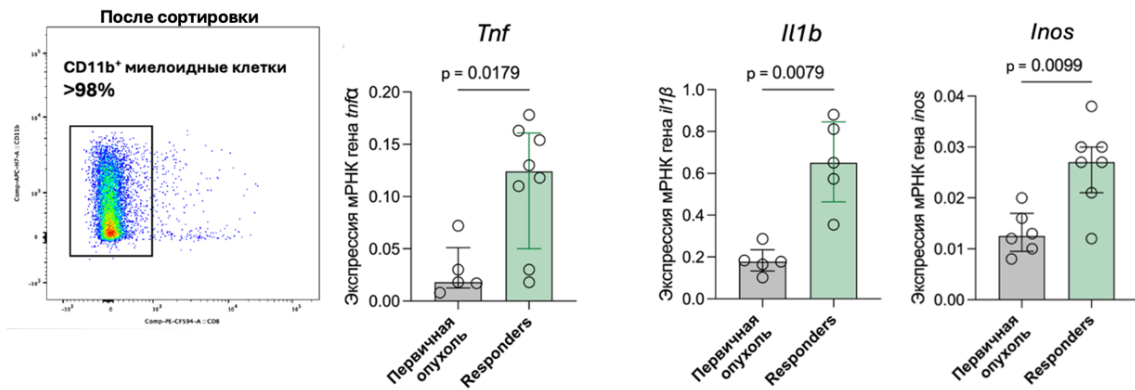


Рисунок 8 – Экспрессия факторов, определяющих функциональную поляризацию в CD11b<sup>+</sup> миелоидных клетках

В ЛУ, дренирующих вторичную опухоль, было значительно повышено содержание противоопухолевых CD4- и CD8-T-клеток памяти, CD4-T-клеток-эффекторов и CD8-T-клеток с высокой цитотоксической активностью против клеток карциномы 4Т1 (рисунок 9).

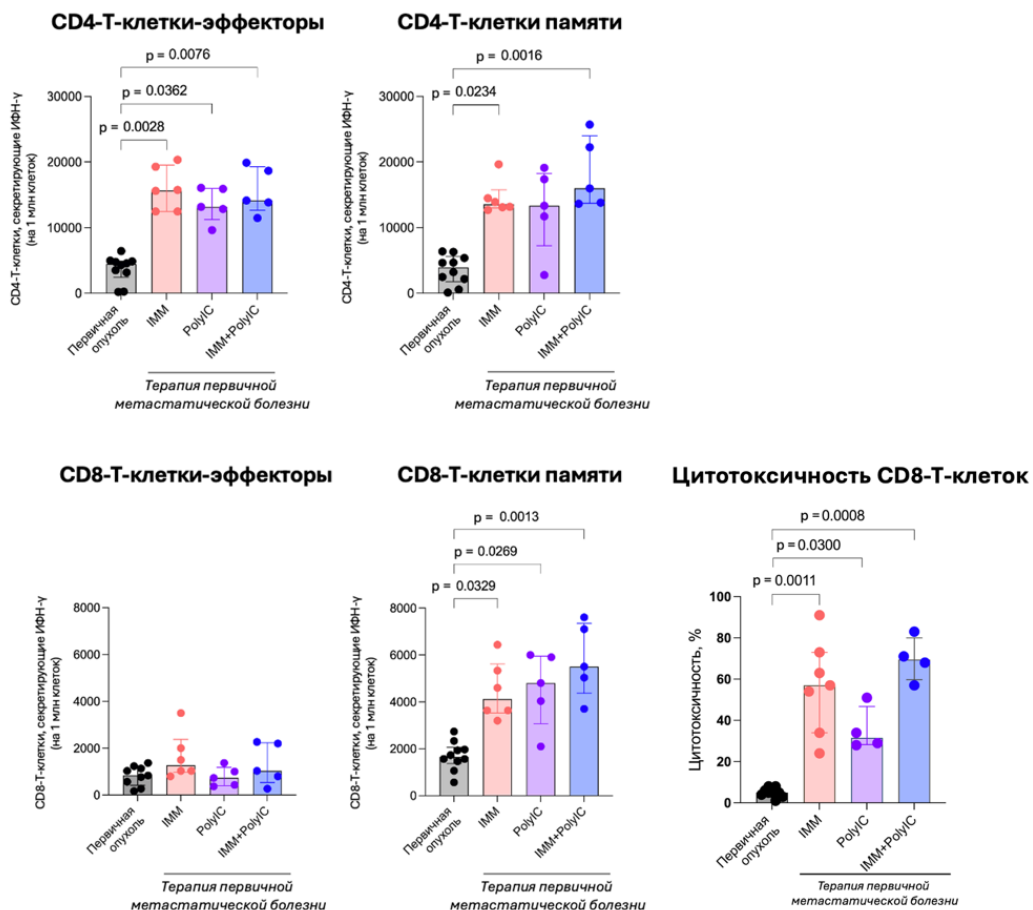


Рисунок 9 – Т-клеточные реакции, специфичные к антигенам карциномы 4Т1, в ЛУ мышей-ответчиков на иммунотерапию

Через 8 месяцев после успешной экспериментальной иммунотерапии карциномы 4Т1 агонистами TLR при имитации рецидива происходила усиленная продукция IgG-антител, специфичных к антигенам опухоли 4Т1 (рисунок 10). У

контрольной группы животных с первичной опухолью, без лечения агонистами, антитела к опухолевым антигенам не обнаруживались.

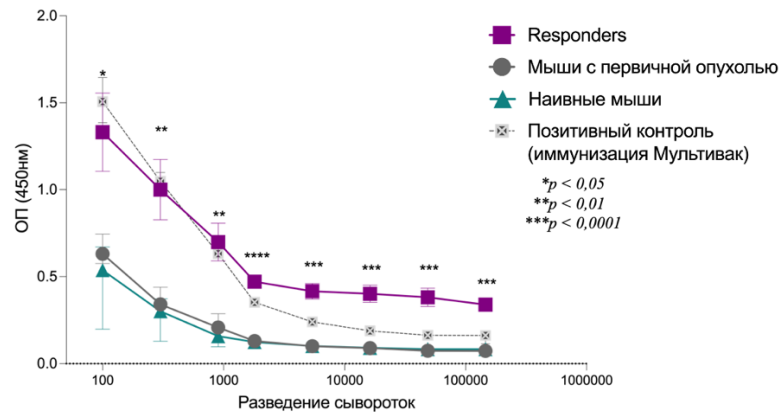


Рисунок 10 – Анализ сывороточных противоопухолевых IgG-антител, связывающихся с лизатом клеток карциномы 4Т1

Таким образом, экспериментальная иммунотерапия карциномы 4Т1 путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции первичной опухоли индуцирует формирование В-клеток памяти, обеспечивающих продукцию противоопухолевых IgG-антител.

### Исследование *in vitro* противоопухолевой активности дендритных клеток/макрофагов здоровых доноров

Результаты исследования в экспериментальных моделях иммунотерапии агонистами TLR злокачественной опухоли у мышей имеют перспективу трансляции в клиническую онкологию. ДК взрослых доноров приобретали выраженные противоопухолевые свойства после перепрограммирования агонистами TLR. Это видно по высокой цитотоксичности миелоидных клеток доноров в отношении клеток миелолейкоза человека K562-GFP (рисунок 11).

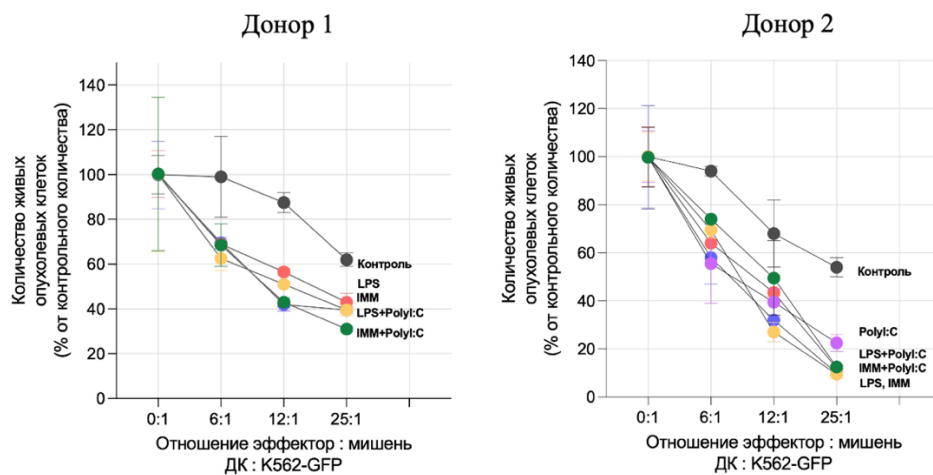


Рисунок 11 – Цитотоксическое действие TLR-активированных ДК и МФ в отношении клеток миелолейкоза человека K562-GFP

Таким образом, разработанный подход активации перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR может быть применен для усиления противоопухолевых свойств ДК и МФ.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Итоги.** Настоящее исследование было направлено на оценку эффективности иммунотерапии метастатической карциномы молочной железы у мышей BALB/c путем перепрограммирования миелоидных клеток опухолевого микроокружения с использованием агонистов Toll-подобных рецепторов. Комплексный экспериментальный подход включал создание и валидацию модели агрессивной солидной опухоли с высоким метастатическим потенциалом, анализ клеточного состава опухолевого микроокружения и метастатических ниш, а также анализ молекулярных и клеточных механизмов действия агонистов TLR при монотерапии и в сочетании с хирургическим удалением первичной опухоли.

Результаты, полученные в данной работе, подтверждают критическую роль миелоидных клеток, в частности тканевых МФ и ДК, в формировании иммуносупрессивной среды, способствующей прогрессии опухоли и системному угнетению иммунных реакций. В опухолевом микроокружении модели карциномы 4T1 преобладали супрессивные миелоидные популяции. Эти клетки активно способствовали снижению активности CD8-Т-лимфоцитов, ослаблению продукции провоспалительных цитокинов и формированию толерогенного иммунного микроокружения.

Применение TLR3- и TLR4-агонистов способствовало активации врождённого иммунитета и индуцировало фенотипические и функциональные изменения в миелоидных клетках. Было показано, что Poly I:C (агонист TLR3) и ИММ (агонист TLR4) активируют и переводят тканевые МФ и ДК в противоопухолевый цитотоксический фенотип.

Важным достижением работы стало подтверждение высокой эффективности экспериментального подхода путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR после хирургической резекции первичной опухоли. Была доказана стимуляция накопления Т-клеток-эффекторов, антиген-специфических Т-клеток памяти и образования противоопухолевых IgG-антител. Эти эффекты свидетельствуют о запуске системного адаптивного противоопухолевого иммунного

ответа, происходящего вторично по отношению к перепрограммированию врождённого звена иммунитета. Такая стратегия позволила не только уменьшить объём метастазов и продлить общую выживаемость, но и индуцировать долговременную иммунную память, специфическую к антигенам опухоли.

При повторном введении опухолевых клеток через 230-250 дней (8 месяцев) после успешного лечения первичной опухоли и метастатической болезни животные демонстрировали полное отсутствие или замедление роста опухоли, что свидетельствовало о формировании долговременной иммунной памяти. Иммунная реакция против вторичной опухоли отличалась интенсивным накоплением антиген-специфических CD4- и CD8-T-клеток, повышением цитотоксической активности CD8 T-клеток, а также усиленной продукцией противоопухолевых IgG-антител.

Особое внимание в работе было уделено молекулярному анализу перепрограммирования миелоидных клеток. Транскрипционный профиль продемонстрировал активацию генов, ассоциированных с функциональной поляризацией миелоидных клеток в противоопухолевое состояние, характерное для M1-подобных МФ и D1-подобных ДК. Таким образом, агонисты TLR действовали как иммунологические переключатели, способные эффективно перевести миелоидные клетки из промоторов опухолевого роста в клетки, обладающие противоопухолевой активностью, способствующие активации как врождённого, так и адаптивного иммунитета.

**Рекомендации.** В совокупности, полученные данные доказывают целесообразность использования агонистов TLR в качестве средства активации противоопухолевого иммунитета за счёт таргетированного воздействия на иммуносупрессивные миелоидные клетки. Перепрограммирование миелоидных клеток представляет собой перспективное направление иммунотерапии, обеспечивающее устранение иммунных барьеров, усиление цитотоксических реакций и формирование устойчивого иммунного контроля над опухолью. Применение данной стратегии в адьювантном режиме после хирургического вмешательства способно обеспечить длительную ремиссию и снизить риск рецидива, что особенно актуально при агрессивных и метастатических формах рака.

**Перспективы дальнейшей разработки темы.** Таким образом, проведённое исследование не только расширяет представления о механизмах ускользания опухоли

от иммунного контроля и роли миелоидных клеток в патогенезе карцином, но и формирует экспериментальные предпосылки для клинической трансляции подходов, основанных на перепрограммировании миелоидных клеток. В ближайшей перспективе это открывает возможность рационального конструирования комбинаций с иммунными чекпойнт-ингибиторами, таргетными ингибиторами и стандартной химио- и лучевой терапией для усиления противоопухолевого иммунного ответа. Отдельный интерес представляет интеграция стратегий перепрограммирования клеток врожденного иммунитета с персонализированными неоантигенными вакцинами и генно-модифицированными клетками (CAR-T-клетками, CAR-NK-клетками и др.), подготовленными *ex vivo* для терапии онкологических больных. Разработка комплексных протоколов лечения, включающих активацию сигнальных каскадов Toll-подобных рецепторов, может стать значимым этапом в создании эффективных, персонализированных стратегий лечения злокачественных новообразований.

### **ВЫВОДЫ**

1. Установлено, что активация тканевых макрофагов и дендритных клеток агонистами TLR3 и TLR4 приводит к приобретению ими выраженных противоопухолевых цитотоксических свойств в отношении клеток карциномы 4T1 в органах-мишенях метастазирования.
2. Перепрограммирование миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции первичной опухоли способствует усилению адаптивных противоопухолевых иммунных реакций, проявляющихся активацией Т-клеточного ответа в дренирующих лимфатических узлах и селезёнке и усилением образования противоопухолевых антител.
3. Перепрограммирование миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 в послеоперационном периоде способствует формированию долговременной противоопухолевой иммунной памяти в виде долгоживущих CD4- и CD8-Т-клеток памяти, а также В-клеток памяти, обеспечивающих продукцию противоопухолевых IgG-антител.
4. Перепрограммирование макрофагов и дендритных клеток под действием агонистов TLR3 и TLR4 в противоопухолевый фенотип ассоциировано с эффективной элиминацией метастатических клеток карциномы 4T1 в лёгких, что в

экспериментальной модели метастатической болезни обеспечивает выживаемость 50% животных.

5. Экспериментальная иммунотерапия путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции первичной опухоли высокоэффективна при лечении злокачественной карциномы 4Т1 у мышей.

#### Список статей, опубликованных по теме диссертации:

1. Комбинированная иммунотерапия метастатической карциномы у лабораторных мышей путем резекции первичного опухолевого узла и последующего перепрограммирования макрофагов и дендритных клеток с помощью агониста TLR4 / **Е.И. Ушакова**, Е.С. Лебедева, А.В. Багаев, А.В. Пичугин, Р.И. Атауллаханов. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2021. – Т. 42, №5. – С. 490–501. (К1)
2. Синергизм агонистов TLR3 и TLR4 при перепрограммировании макрофагов в противоопухолевое состояние / А.В. Багаев, А.С. Рыбинец, А.А. Федорова, **Е.И. Ушакова**, Е.С. Лебедева, А.В. Пичугин, Р.И. Атауллаханов. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2021. – Т. 42, №6. – С. 615–630. (К1)
3. Перепрограммирование миелоидных клеток опухолевого микроокружения – новый подход в иммунотерапии злокачественных новообразований / Р.И. Атауллаханов, **Е.И. Ушакова**, С.А. Аль Худур, А.В. Пичугин, Е.С. Лебедева. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2022. – Т. 43, №4. – С. 375–388. (К1)
4. Иммуногенность мультиантигенной вакцины, приготовленной из лизата злокачественных клеток опухоли / **Е.И. Ушакова**, А.А. Федорова, Е.С. Лебедева, А.В. Пичугин, Р.И. Атауллаханов. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2022. – Т. 43, №4. – С. 389–400. (К1)
5. Перепрограммирование миелоидных клеток опухолевого микроокружения повышает эффективность блокады рецепторов CTLA-4 и PD-1 при иммунотерапии злокачественной меланомы в эксперименте / А.В. Пичугин, С.А. Подсвинова, **Е.И. Ушакова**, Д.М. Спирин, Е.С. Лебедева, Р.И. Атауллаханов. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2022. – Т. 43, №6. – С. 673–690. (К1)
6. Интенсивность противоопухолевых иммунных реакций на иммунизацию вакцинами Multivac против карциномы 4Т1 у мышей BALB/с и меланомы В16 у мышей С57BL/6J не зависит от генотипа «хозяина» и тканевой природы опухоли / **Е.И. Ушакова**, А.В. Пичугин, А.А. Федорова, Е.С. Лебедева, Р.И. Атауллаханов. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2022. – Т. 43, №6. – С. 691–701. (К1)
7. Study of the antigenic specificity of T-cell immune reactions in response to immunization of laboratory mice with a recombinant adenoviral vector encoding the Spike-protein of SARS-CoV-2 / R.I. Ataulakhanov, **E.I. Ushakova**, A.V. Pichugin, E.S. Lebedeva, S.V. Ivanov, T.A. Ozharovskaia, O. Popova, D.N. Shcherbinin, A.S. Bandelyuk, O.V. Zubkova, M.M. Shmarov., D. Yu. Logunov, B.S. Naroditsky, A.L. Gintsburg. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2024. – Т. 45, №1. – С. 33–49. (К1)

### Публикации в материалах научных конгрессов и конференций:

1. CD4+ and CD8+ T lymphocytes protect mice treated with TLR4 agonist after resection of the primary tumor from metastatic 4T1 breast cancer / **E. I. Ushakova**. – Text: unmediated // Abstract book the 26<sup>th</sup> International Student Congress Of (bio)Medical Sciences (Groningen, Netherlands, 3-7 June 2019). – 2019. – P. 339. Текст англ.
2. In situ anti-tumor immunization using the tumor microenvironment reprogramming with a TLR4-agonist induces strong CD4 and CD8 T cells responses, long-living T cell memory, and protection against 4T1 metastatic breast cancer in mice / **E. Ushakova**, M. Savchenko, E. Lebedeva, A. Pichugin, R. Ataullakhanov. – Text: electronic // European Journal of Immunology: Abstract 6<sup>th</sup> European Congress of Immunology (Belgrade, Serbia, 1-4 September, 2021). – 2021. – Vol. 51, Suppl. 1: P. 391. – P-0822. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.202170200>
3. Successful immunotherapy of the breast cancer metastatic disease in mice using a pharmaceutical TLR4-agonist induces systemic anti-tumor T cell response and long-term T cell memory / **E. Ushakova**, E. Lebedeva, A. Pichugin, R. Ataullakhanov. – Text : electronic // Journal for ImmunoTherapy of Cancer: Abstract 8th Immunotherapy of Cancer Conference (Munich, Germany, 8–9 October 2021). – 2021. – A26. – P08.04. – URL: [https://jitc.bmj.com/content/9/Suppl\\_1/A26.1](https://jitc.bmj.com/content/9/Suppl_1/A26.1) Текст англ.
4. Иммуногенность и противоопухолевая активность неоантигенной вакцины на основе рекомбинантного аденовирусного вектора в модели меланомы B16F10 у мышей / **Е. И. Ушакова**, Е. С. Лебедева, А. А. Федорова, А. В. Пичугин, Ф. Е. Френкель, М. М. Шмаров, Р. И. Атауллаханов. – Текст: непосредственный // Материалы II Объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, Россия, 3–8 октября 2021). – 2021. – Т. 2. – С. 274.
5. Neoantigenic versus multi-antigenic personalized B16 melanoma vaccine comparison according to anti-tumor T cell response intensity / **E. Ushakova**, A. Fedorova, E. Lebedeva, A. Pichugin, R. Ataullakhanov. – Text : electronic // Journal for ImmunoTherapy of Cancer: Abstract 9th Immunotherapy of Cancer Conference (Munich, Germany, 22–24 September 2022). – 2022. – Vol. 10, Suppl. 1. – P03.08. – URL: [https://jitc.bmj.com/content/10/Suppl\\_1/A20.1?utm\\_source=researchgate.net&utm\\_medium=article](https://jitc.bmj.com/content/10/Suppl_1/A20.1?utm_source=researchgate.net&utm_medium=article)
6. High immunogenicity of a personalized antitumor vaccine made from 4T1 breast carcinoma tissue and molecular adjuvants that reprogram dendritic cells and myeloid suppressors / **E. Ushakova**, E. Lebedeva, A. Fedorova, A. Pichugin, R. Ataullakhanov. – Text: unmediated // Abstract book 3<sup>rd</sup> Immuno-Oncology World Congress (Copenhagen, Denmark, 2-3 November 2022). – 2022. – P-166. Текст англ.
7. A personalized multi-antigenic tumor vaccine induces significantly stronger CD4 and CD8 T cell immune responses against B16 melanoma than the adenovirus vector-based vaccine encoding B16 neo-antigens / **E. Ushakova**, E. Lebedeva, A. Fedorova, A. Pichugin, R. Ataullakhanov. – Text: unmediated // Abstract book 3<sup>rd</sup> Immuno-Oncology World Congress (Copenhagen, Denmark, 2-3 November 2022). – 2022. – P-171. Текст англ.
8. Comparison of immunogenicity and effectiveness of multi-antigen and neo-antigen personalized cancer vaccines / **E. Ushakova**, A. Fedorova, E. Lebedeva, A. Pichugin, M. Shmarov, R. Ataullakhanov. – Text: unmediated // Abstract book 1<sup>st</sup> International Caparica Conference on Prescriptomics & Precision Medicine (Lisbon, Portugal, 11-13 May 2024). – 2024. – P. 86. Текст англ.