

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»
Федерального медико-биологического агентства

На правах рукописи

УШАКОВА ЕКАТЕРИНА ИГОРЕВНА

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

3.2.7. Иммунология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Атауллаханов Равшан Иноятович

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
Актуальность темы исследования.....	7
Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности.....	8
Степень разработанности темы исследования	8
Цель исследования	9
Задачи исследования	9
Научная новизна работы.....	10
Теоретическая значимость работы	11
Практическая значимость работы.....	11
Внедрение результатов исследования в практику.....	12
Методология и методы исследования	13
Положения, выносимые на защиту.....	13
Степень достоверности результатов.....	14
Апробация результатов.....	14
Личный вклад автора.....	15
Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах	15
Объем и структура диссертации	15
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Механизмы ускользания опухоли от иммунного контроля.....	16
1.2. Влияние компонентов опухолевого микроокружения на функциональное состояние миелоидных клеток.....	17
1.3. Механизмы подавления противоопухолевого иммунитета миелоидными клетками	23
1.3.1. Нарушение антиген-презентирующей функции	24
1.3.2. Метаболическая супрессия	25
1.3.3. Экспрессия молекул иммунных контрольных точек	25
1.3.4. Поддержание регуляторных Т-клеток и ингибирование цитотоксической активности НК-клеток и CD8-Т-клеток	26

1.4. Стратегии перепрограммирования миелоидных клеток в опухолевом микроокружении.....	26
1.4.1. Активация врожденных рецепторов.....	28
1.4.2. Ингибирование иммуносупрессивных сигнальных каскадов.....	31
1.4.3. Цитокиновая стимуляция.....	33
1.4.4. Метаболическое перепрограммирование.....	34
1.4.5. Чекпойнт-ингибиторы.....	34
1.4.6. Эпигенетическая регуляция.....	36
1.4.7. Таргетная доставка.....	37
1.4.8. Комбинированные подходы.....	38
1.5. Экспериментальные модели для изучения перепрограммирования миелоидных клеток.....	39
1.6. Резюме.....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
2.1. Животные.....	42
2.2. Экспериментальная модель метастатической карциномы 4T1.....	42
2.3. Хирургическая резекция опухоли.....	43
2.4. Экспериментальная модель иммунотерапии агонистами TLR после хирургической резекции первичной опухоли.....	43
2.5. Культура клеток линии 4T1 и 4T1-GFP.....	44
2.6. Получение суспензии клеток селезенки, опухоли, легких и лимфатических узлов.....	45
2.7. Количественный анализ метастатических колониеобразующих единиц в ткани легкого методом лимитирующих разведений.....	47
2.8. Культуры дендритных клеток и макрофагов <i>in vitro</i>	47
2.9. Получение зрелых дендритных клеток и макрофагов из периферической крови здоровых доноров.....	48
2.10. Проточная цитофлуориметрия и сортировка популяций клеток.....	49

2.11. Анализ противоопухолевой цитотоксической активности <i>in vitro</i>	51
2.12. Получение лизата опухолевых клеток карциномы 4Т1	53
2.13. Анализ Т-клеточных реакций, специфичных к антигенам карциномы 4Т1 методом ELISpot	53
2.14. Определение экспрессии генов в очищенных сортировкой миелоидных клеток, выделенных из опухоли методом RT-PCR	54
2.15. Анализ антител, специфично связывающихся с антигенами карциномы 4Т1	56
2.16. Статистический анализ	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	59
3.1. Характеристика экспериментальной модели солидной опухоли молочной железы у мышей BALB/с	59
3.2. Исследование влияния агонистов TLR3 и TLR4 на рост 4Т1 карциномы <i>in vivo</i>	65
3.3. Исследование эффективности хирургического вмешательства путем резекции солидной карциномы 4Т1	67
3.4. Изучение эффективности применения перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции опухоли в модели метастатической карциномы 4Т1	70
3.4.1. Влияние применения экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции первичной опухоли на выживаемость животных.....	70
3.4.2. Влияние иммунотерапии агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции первичной опухоли на процесс метастазирования карциномы 4Т1 в ткани легких	74
3.5. Исследование механизмов раннего иммунного ответа у животных в процессе проведения иммунотерапии после хирургического вмешательства.....	76
3.5.1. Исследование противоопухолевой активности миелоидных клеток <i>in situ</i>	76

3.5.2. Исследование Т-клеточных реакций в процессе иммунотерапии агонистами TLR3 и TLR4 после резекции первичной опухоли	83
3.5.3. Исследование динамики противоопухолевых антител в процессе иммунотерапии агонистами TLR3 и TLR4	93
3.6. Исследование механизмов формирования долговременной иммунной памяти у выживших животных после проведения экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR после резекции первичной опухоли	97
3.6.1. Анализ скорости роста опухоли при повторном введении опухолевых клеток 4Т1 у мышей, излечившихся от метастатической болезни – модель рецидива	97
3.6.2. Анализ клеточного состава дренирующих опухоль лимфатических узлов и селезенки у мышей- <i>responders</i>	101
3.6.3. Анализ противоопухолевой цитотоксической активности CD8-Т-клеток, инфильтрирующих опухоль и дренирующий опухоль лимфатический узел, после повторного введения клеток карциномы 4Т1 у мышей- <i>responders</i>	105
3.6.4. Анализ Т-клеточных реакций, специфичных к антигенам карциномы 4Т1 в опухоли, дренирующим лимфатическом узле и селезенке у мышей- <i>responders</i>	107
3.6.5. Анализ экспрессии факторов, определяющих функциональную поляризацию, в миелоидных клетках во вторичных опухолях у мышей- <i>responders</i>	114
3.6.6. Анализ противоопухолевых антител, специфично связывающихся с антигенами карциномы 4Т1 в модели рецидива	117
3.7. Исследование <i>in vitro</i> противоопухолевой активности дендритных клеток/макрофагов здоровых доноров	119
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	121

4.1. Характеристика экспериментальной модели метастатической карциномы 4T1	122
4.2. Влияние иммунотерапии агонистами TLR3 и TLR4 на рост и метастазирование опухоли, а также на выживаемость мышей-опухоленосителей.....	124
4.3. Эффективность экспериментального подхода: перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR после хирургической резекции опухоли	125
4.4. Активация противоопухолевых свойств миелоидных клеток под влиянием агонистов TLR.....	129
4.5. Влияние экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR на Т- и В - клеточные звенья иммунитета.....	131
4.6. Эффективность экспериментальной иммунотерапии путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR – модель рецидива	134
4.7. Влияние экспериментальной иммунотерапии перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR на формирование долговременной иммунной памяти	137
4.8. Перепрограммирование миелоидных клеток: транскрипционные изменения	142
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	144
Итоги.....	144
Рекомендации.....	145
Перспективы дальнейшей разработки темы.	146
ВЫВОДЫ	147
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	150
ПРИЛОЖЕНИЕ А Акты о внедрении результатов диссертационной работы	181

ВВЕДЕНИЕ

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 [22, 64, 65, 100]. Эти клетки производят растворимые ингибиторы иммунных реакций, такие как IDO, TGF- β , 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 [63, 114, 132, 140]. 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 [177].

Новый подход в иммунотерапии основан на возможности перепрограммирования тканевых макрофагов и дендритных клеток в противоопухолевый фенотип [177]. 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 [177].

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 [5, 9, 10, 18, 19, 30, 156]. Без воздействия агонистами TLR макрофаги и дендритные клетки стимулируют размножение клеток опухолевых линий в совместной культуре *in vitro* [30]. После активации агонистами TLR перепрограммированные макрофаги и дендритные клетки не только не стимулируют размножения опухолевых клеток, но, напротив, быстро и эффективно способствуют их гибели [30].

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 4T1 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 4T1 и на выживаемость мышей-опухоленосителей.

3. Изучить эффективность лечения метастатической карциномы 4T1 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 4T1 в процессе иммунотерапии после хирургического удаления опухоли.

5. Исследовать эффективность формирования долговременной Т-клеточной иммунной памяти у мышей с карциномой 4T1, 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 4T1 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 4T1 способствует формированию

долговременной иммунной памяти в виде долгоживущих CD4- и CD8-T-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 4T1 у мышей BALB/c 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-специфических 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 резекцией

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 26th 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Механизмы ускользания опухоли от иммунного контроля

Иммунная система играет ключевую роль в контроле за возникновением и прогрессированием злокачественных новообразований. С момента появления концепции иммунного надзора, предложенной в середине XX века, представления о взаимодействии клеток иммунной системы с опухолью существенно эволюционировали. Современные данные свидетельствуют о том, что иммунная система не только способна распознавать и уничтожать трансформированные клетки, но также может непреднамеренно способствовать селекции клеток с онкогенным фенотипом, что отражено в концепции иммунного редактирования опухолей [113, 142].

Иммунное редактирование включает три фазы: элиминацию, равновесие и уклонение [113]. На начальном этапе (элиминация) иммунные клетки, включая натуральные киллеры (НК-клетки), цитотоксические Т-лимфоциты и некоторые популяции клеток врожденного иммунитета, распознают и уничтожают опухолевые клетки. Если полное устранение трансформированных клеток не достигается, развивается фаза равновесия, в ходе которой иммунная система сдерживает, но не полностью подавляет опухолевый рост. На поздней стадии (уклонение) опухолевые клетки приобретают свойства, позволяющие им избегать иммунного контроля, в том числе за счёт потери молекул МНС класса I или снижения экспрессии опухолевых антигенов, секреции иммуносупрессивных факторов и ремоделирования опухолевого микроокружения [86, 113].

Ключевую роль в формировании иммунной толерантности к опухоли играют клетки врожденного иммунитета, включая миелоидные популяции. Такие клетки, как опухоль-ассоциированные макрофаги и дендритные клетки, могут приобретать иммуносупрессивный фенотип под влиянием опухолевых

сигналов. Они способствуют ингибированию Т-клеточного ответа, индукции регуляторных Т-клеток, стимуляции ангиогенеза и активации механизмов тканевого ремоделирования, поддерживающих инвазию и метастазирование.

Таким образом, понимание механизмов взаимодействия злокачественных клеток и клеток иммунной системы имеет принципиальное значение для разработки новых подходов к терапии злокачественных новообразований. Особенно перспективным направлением в настоящее время считается таргетирование клеток врожденного иммунитета, способных оказывать как протективное, так и патогенное влияние в зависимости от функционального состояния. В этом контексте внимание исследователей всё чаще привлекает возможность терапевтического перепрограммирования миелоидных клеток с целью переключения их на противоопухолевый фенотип [177].

1.2. Влияние компонентов опухолевого микроокружения на функциональное состояние миелоидных клеток

Одним из основных факторов снижения эффективности противоопухолевого иммунитета служит наличие иммуносупрессивного опухолевого микроокружения (англ. tumor microenvironment, ТМЕ), которое оказывает непосредственное влияние на фенотип и функциональную активность клеток врожденного иммунитета, прежде всего макрофагов и дендритных клеток. ТМЕ представляет собой сложную систему, которая включает не только злокачественные клетки, но также фибробласты, эндотелиальные клетки, Т-клетки, В-клетки, НК-клетки, регуляторные Т-лимфоциты, мезенхимальные стромальные клетки и разнообразные миелоидные популяции, взаимодействующие через цитокины, хемокины, метаболиты и внеклеточные везикулы. Среди компонентов врожденного иммунитета особое место занимают миелоидные клетки, обладающие

высокой пластичностью и способностью адаптироваться к изменяющимся условиям среды [64]. Их функциональная направленность определяется комплексом внешних сигналов, поступающих от опухоли и клеток окружающей ткани.

К числу ключевых миелоидных клеток, вовлечённых в регуляцию опухолевого роста и метастазирования, относят макрофагов, дендритные клетки, а также популяции миелоидных супрессорных клеток. Эти клетки в нормальных условиях выполняют важные функции в обеспечении защиты от патогенов, заживлении ран и поддержании тканевого гомеостаза. Однако в условиях опухолевой прогрессии их функции могут искажаться в сторону поддержки роста новообразования. Но не только клетки миелоидного ряда способны подавлять иммунный ответ.

Опухоль-ассоциированные макрофаги

Опухоль-ассоциированные макрофаги (англ. tumor-associated macrophages, TAM) формируют одну из наиболее многочисленных (до 50% клеточной массы некоторых опухолей) и биологически активных популяций клеток врождённого иммунитета в опухоли [171]. В зависимости от микроокружения они дифференцируются в различные фенотипы: от классически активированных (M1), обладающих противоопухолевыми свойствами, до альтернативно активированных (M2), поддерживающих рост опухоли и способствующих метастазированию [32]. Исходно, циркулирующие моноциты дифференцируются в макрофагов (МФ) в ткани под действием колониестимулирующих факторов, таких как CSF-1 и ГМ-КСФ. Однако в условиях роста опухоли их дальнейшее созревание и функциональная специализация направлены на поддержку опухолевого роста. Обилие поляризующих факторов — IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β , PGE₂, а также метаболитов (например, лактата) — способствует смещению фенотипа МФ в сторону M2-подобного состояния [114, 132, 140].

Функционально TAM участвуют в ремоделировании внеклеточного матрикса (через секрецию металлопротеиназ (MMPs), таких как MMP2,

MMP7, MMP9), облегчая инвазию опухолевых клеток, и способствуют формированию преметастатических ниш [132], стимуляции ангиогенеза через VEGF, PDGF, а также в подавлении активности цитотоксических Т-клеток и НК-клеток через IL-10, TGF- β [63]. Важным аспектом является экспрессия PD-L1 и B7-H4 на TAM, которая дополнительно усиливает супрессию CD8-Т-клеток и ограничивает эффективность чекпоинт-ингибиторов [24]. Высокая инфильтрация TAM ассоциируется с неблагоприятным прогнозом при различных типах рака, включая рак молочной железы (РМЖ), яичников, поджелудочной железы и глиобластому [130].

Дендритные клетки

Дендритные клетки (ДК) выступают основными инициаторами адаптивного иммунитета, однако в ТМЕ происходит ингибирование их нормального созревания и антигенпрезентации. Как главные антиген-презентирующие клетки, ДК обеспечивают запуск специфического Т-клеточного ответа. Однако в опухолевом микроокружении их функции часто нарушаются под влиянием таких факторов, как VEGF, IL-10, PGE₂ и TGF- β , что приводит к нарушению экспрессии молекул МНС класса II, ко-активационных рецепторов CD40, CD80, CD86, а также молекул миграции CCR7, что ограничивает способность ДК мигрировать в лимфоузлы и активировать Т-клетки [22, 67, 173]. Это приводит к функциональной инактивации или формированию толерантного фенотипа [66]. Некоторые опухолевые клетки непосредственно влияют на ДК посредством внеклеточных везикул, содержащих miRNA и белки, которые активируют сигнальные пути Toll-подобных рецепторов (например, TLR2), способствуют синтезу IL-10 и ингибируют продукцию IL-12. Таким образом, ДК теряют свою противоопухолевую активность и приобретают толерогенный профиль, способствующий индукции регуляторных Т-клеток [174] и способствуют угнетению цитотоксических Т-лимфоцитов [54].

Особое значение имеют кросс-презентирующие ДК (например, CD103⁺ ДК), которые играют центральную роль в запуске ответа CD8-Т-клеток. Их

дефицит в TME может способствовать уклонению опухоли от иммунного контроля [41].

Опухоль-ассоциированные фибробласты

Опухоль-ассоциированные фибробласты (англ. cancer-associated fibroblasts, CAF) играют ключевую роль в поддержании иммуносупрессивного микроокружения. CAF представляют собой гетерогенную группу активированных фибробластов с мезенхимными признаками, которые обитают в строме опухоли и ее микроокружении [91]. В отличие от нормальных фибробластов, они характеризуются повышенной пролиферативной и миграционной активностью, а также усиленной продукцией факторов роста, хемокинов и протеаз, таких как MMPs, что способствует разрушению внеклеточного матрикса и облегчает инвазию и метастазирование опухолевых клеток [14]. Также, CAF продуцируют высокие уровни CXCL12, который формирует «хемокиновый барьер» и предотвращает инфильтрацию эффекторных T-клеток в опухоль. Одновременно CAF выделяют IL-6, PGE₂ и TGF- β , воздействуя на TAM и ДК, усиливая их иммуносупрессивный и толерогенный фенотип [133].

Кроме того, CAF играют ключевую роль в формировании тканевого микроокружения опухоли, регулируя процессы ангиогенеза, ремоделирования внеклеточного матрикса, а также противоопухолевого иммунного ответа. Они продуцируют коллаген, который повышает жесткость опухолевой ткани и создает благоприятные условия для роста опухоли [14]. Кроме того, CAF могут индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход опухолевых клеток через расщепление E-кадгерина, что усиливает их подвижность и инвазивность [13].

Молекулярные и метаболические изменения в CAF связаны с адаптацией опухоли к условиям гипоксии и дефициту питательных веществ, что сопровождается индукцией определённых транскрипционных факторов и переключением энергетического обмена на анаэробный гликолиз. Это

способствует не только поддержке опухолевого роста, но и развитию резистентности к химиотерапии и иммунотерапии [14].

CAF также способствуют ремоделированию внеклеточного матрикса, что затрудняет проникновение иммунных клеток в опухолевое микроокружение. Жёсткий матрикс и повышенное внутритканевое давление могут препятствовать диффузии молекул и снижать эффективность иммунных препаратов [56].

Миелоидные супрессорные клетки

Супрессорные клетки миелоидного происхождения (англ. myeloid-derived suppressor cells, MDSC) представляют собой гетерогенную популяцию незрелых миелоидных клеток, обладающих мощной иммуносупрессивной активностью. Эти клетки классифицируются на две основные подгруппы: гранулоцитарные (PMN-MDSC) и моноцитарные (M-MDSC). В физиологических условиях эти клетки дифференцируются в МФ, ДК и гранулоциты. Однако при патологических процессах, включая воспаление, инфекции и опухолеобразование, наблюдается блокада их созревания, приводящая к аккумуляции незрелых миелоидных клеток. Кроме того, данные клетки приобретают супрессивный фенотип с экспрессией противовоспалительных цитокинов, способствующих ингибированию Т-клеточного иммунитета [1, 65]. MDSC способствуют канцерогенезу путем формирования благоприятного микроокружения для роста опухоли [25]. MDSC-опосредованные механизмы, вовлеченные в метастазирование опухолей, изучали на мышинных моделях. У мышей – носителей РМЖ 4Т1 опухоль-индуцированные MDSC продуцировали несколько MMPs (MMP2, MMP13, MMP14), опосредующих инвазивность 4Т1 клеток *in vitro* и *in vivo* [25]. Также существуют доказательства роли MDSC-продуцируемых цитокинов, таких как TGF- β , IL-6, TNF- α , в индукции метастазирования [138].

Опухоль-ассоциированные нейтрофилы

Опухоль-ассоциированные нейтрофилы (англ. tumor-associated neutrophils, TAN) обладают двойственной функциональностью. TAN

проявляют фенотипическую пластичность, способствуя либо прогрессии опухоли, либо её подавлению в зависимости от локальных сигналов в микроокружении опухоли.

Нейтрофилы могут способствовать инвазии и метастазированию опухолей, стимулируя ангиогенез, подавляя функции клеток противоопухолевого иммунитета и выделяя белки, способствующие разрушению внеклеточного матрикса [126]. В то же время определённые субпопуляции TAN способны ингибировать рост опухоли и активировать противоопухолевый иммунный ответ, что открывает новые возможности для таргетной терапии.

На сегодняшний день известно, что фенотип N1 ассоциирован с цитотоксической активностью и продукцией провоспалительных медиаторов, тогда как N2-нейтрофилы участвуют в ремоделировании тканей, ангиогенезе и подавлении иммунного ответа [126].

Регуляторные T-клетки

Регуляторные T-клетки (Трег) активно привлекаются в ТМЕ под влиянием хемокинов CCL17, CCL22, CXCL12 и взаимодействуют с миелоидными клетками, усиливая их супрессивные функции. Трег секретируют IL-10 и TGF- β , а также контактируют с МФ и ДК через CTLA-4, индуцируя экспрессию IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) и аргиназы -1 (Arg1) – ферментов, подавляющих локальную активацию T-клеток [81, 173].

Совместное действие Трег и M2-подобных МФ формирует мощное супрессорное микроокружение в опухоли, ограничивающее как врождённый, так и адаптивный иммунный ответ, снижая эффективность иммунотерапии [27].

Метаболическая и гипоксическая активность

Опухолевые клетки демонстрируют выраженный гликолитический метаболизм (эффект Варбурга), что приводит к накоплению лактата, снижению pH и повышенной продукции аденозина. Эти метаболиты напрямую влияют на миелоидные клетки. Лактат способствует экспрессии

VEGF и Arg1 в МФ, блокирует продукцию IL-12 и провоцирует переход к M2-фенотипу. Аденозин, активируя A2A и A2B-рецепторы на ДК и МФ, подавляет экспрессию MHC II, CD86 и стимулирует продукцию IL-10 [169, 176, 179].

Гипоксия, возникающая в результате ангиогенного дисбаланса, усиливает экспрессию HIF-1 α , что влияет на транскриптом МФ и ДК, включая усиление продукции VEGF и снижение продукции иммуностимулирующих цитокинов. Так, опухоль использует метаболические и гипоксические механизмы для поддержания иммуносупрессии [100].

Таким образом, миелоидные клетки в составе опухолевого микроокружения представляют собой не просто регуляторный компонент, но и активных участников онкогенеза, способных модулировать как рост первичной опухоли, так и формирование метастатических очагов. Их высокая пластичность делает их привлекательной мишенью для терапии, включая перепрограммирование функционального состояния с целью переключения на противоопухолевую активность.

1.3. Механизмы подавления противоопухолевого иммунитета миелоидными клетками

Миелоидные клетки, включая TAM и ДК, играют ключевую роль в формировании толерогенного опухолевого микроокружения, способствующего уклонению опухоли от иммунного надзора. В нормальных условиях эти клетки участвуют в инициации и регуляции иммунного ответа, однако в условиях опухоли они подвергаются репрограммированию, приобретая иммуносупрессивные свойства [44, 114].

В таблице 1 представлены основные механизмы подавления противоопухолевого иммунитета миелоидными клетками.

Таблица 1 – Основные механизмы иммуносупрессии, реализуемые миелоидными клетками

Механизм супрессии	Основные клетки	Основные молекулы	Последствия для иммунного ответа
Нарушение антиген-презентации	TAM, ДК	MHC-I/II, CD80/86, IL-10, TGF- β	Снижение активации CD8- и CD4-T-клеток
Метаболическая супрессия	TAM, MDSC	Arg1, iNOS, IDO, ROS, NO	Истощение аргинина и триптофана, ингибирование T-клеток
Иммунные чекпойнты	TAM, ДК, MDSC	PD-L1, VISTA, B7-H4	Подавление T-клеток, функциональное истощение
Индукция Трег	TAM, ДК	IL-10, TGF- β , ICOSL, CTLA-4	Подавление CD8- и CD4-T-клеток, активация Трег
Подавление НК-клеток и CD8-T-клеток	TAM, MDSC	IL-12, NKG2D, ИФН- γ	Снижение цитотоксичности и продукции ИФН- γ

1.3.1. Нарушение антиген-презентирующей функции

Одним из центральных механизмов иммуносупрессии является подавление антиген-презентирующей функции у миелоидных клеток. У TAM и ДК в условиях ТМЕ снижается экспрессия молекул MHC класса II, а также костимулирующих рецепторов CD80 и CD86, необходимых для эффективной активации T-клеток [22, 65]. Кроме того, проопухолевые факторы, такие как IL-10, TGF- β и VEGF, могут ингибировать дифференцировку и созревание ДК, переводя их в толерогенный фенотип, неспособный запускать эффективный цитотоксический ответ [145, 175].

Также наблюдается функциональное истощение ДК вследствие воздействия продуктов метаболизма опухоли (например, лактата и аденозина), приводящее к снижению экспрессии MHC-I/II и снижению продукции IL-12, что критически важно для индукции T-хелперов 1 типа (Th1), интерферона (ИФН)- γ и активации НК-клеток [63].

1.3.2. Метаболическая супрессия

Миелоидные клетки в ТМЕ активно используют метаболические пути для подавления активности Т-лимфоцитов. Один из ключевых механизмов — повышенная экспрессия Arg1 и индуцибельной NO-синтазы (iNOS), что приводит к истощению аминокислот (аргинина, триптофана) и накоплению оксида азота (NO) и активных форм кислорода (ROS), ингибирующих пролиферацию и выживание Т-клеток [34, 115, 139]. TAM и MDSC также используют фермент IDO, катализирующий катаболизм триптофана до кинуренина. Дефицит триптофана и накопление токсичных метаболитов приводит к угнетению функции CD8-Т-клеток и активации Трег [125].

1.3.3. Экспрессия молекул иммунных контрольных точек

Миелоидные клетки в опухолевом микроокружении могут экспрессировать иммунорегуляторные молекулы, такие как PD-L1, B7-H4, VISTA, которые взаимодействуют с рецепторами на Т-клетках и ингибируют их противоопухолевую активность [97, 98]. Особенно важную роль играет PD-L1, экспрессируемый на TAM и ДК, взаимодействие которого с PD-1 на Т-клетках приводит к функциональному истощению и апоптозу последних [121].

Кроме того, экзосомальные формы PD-L1, выделяемые опухолью и миелоидными клетками, обладают способностью к системной супрессии иммунного ответа [61, 148]. Данные эффекты усиливаются при воздействии гипоксии и медиаторов воспаления, активирующих сигнальные пути STAT3 и NF-κB [52].

1.3.4. Поддержание регуляторных Т-клеток и ингибирование цитотоксической активности НК-клеток и CD8-Т-клеток

ТАМ и ДК способствуют экспансии и активации регуляторных Т-клеток, способных дополнительно ингибировать эффекторное звено иммунитета [43]. Это реализуется через продукцию IL-10, TGF- β , экспрессию ICOS-L, а также посредством взаимодействия с молекулами CTLA-4. С другой стороны, миелоидные клетки угнетают активность НК-клеток, снижая их способность к секреции ИФН- γ и экспрессии рецепторов активации (NKG2D, NKp46) [99].

1.4. Стратегии перепрограммирования миелоидных клеток в опухолевом микроокружении

Переход к парадигме активного воздействия на врождённые компоненты иммунной системы открыл перспективные возможности для терапии злокачественных новообразований. Среди таких мишеней особое место занимают опухоль-ассоциированные миелоидные клетки, прежде всего МФ и ДК, которые в условиях опухолевого микроокружения приобретают иммуносупрессивный фенотип и способствуют прогрессии заболевания. Учитывая пластичность миелоидных клеток, а также их ключевую роль в формировании опухолевого микроокружения, разработка методов их целевой модификации становится приоритетной задачей экспериментальной онкоиммунологии. В настоящее время разработан широкий спектр подходов, основанных на активации врождённых рецепторов, ингибировании супрессивных сигнальных каскадов, метаболическом и эпигенетическом перепрограммировании, а также на применении нанотехнологий и комбинированной терапии.

Основные стратегии перепрограммирования миелоидных клеток в опухолевом микроокружении представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Сравнительная характеристика подходов к перепрограммированию миелоидных клеток

Подход	Основные мишени	Примеры	Основные эффекты
Агонисты TLR/STING	TLR3/4/7/9, STING	CpG, Poly I:C, IMM, cGAMP	Повышение ИФН I типа, IL-12, фенотипическое перепрограммирование в D1 и M1, ↑экспрессии CD80/86, CD40.
Ингибиторы иммуносупрессивных сигнальных каскадов	CSF-1R, PI3K γ , STAT3, TGF- β	PLX3397, IPI-549, AZD9150	Снижение TAM, ↑экспрессии MHC II и цитокинов
Цитокиновая стимуляция	ГМ-ККФ, ИФН- γ , TNF- α , IL-12	ГМ-ККФ, ИФН- γ , TNF- α , IL-12	Поляризация МФ в M1-фенотип, продукция IL-12, TNF- α
Метаболическое перепрограммирование	Arg-1, IDO, HIF-1 α	2-DG, Nor-NOHA, эпикадостат	Повышение ROS, NO, восстановление антиген-презентирующей функции
Чекпойнт-ингибиторы	PD-L1	Атезолизумаб	Снятие иммуносупрессии, активация Т-клеток
Эпигенетическое перепрограммирование	HDAC, miRNA, siRNA	HDACi, miR-155, CRISPR	Повышение экспрессии MHC I/II, снижение STAT3
Таргетированная доставка	CD206, CD11b, CCR2	Липосомы, PLGA-наночастицы	Локальная доставка, комбинированное воздействие
Комбинированные подходы	Мультимишеневые	TLR+TLR, TLR+NOD2, TLR+anti-PD1, CAR-T+TAM-ингибиторы	Повышение инфильтрации Т-клеток, активация Т-клеток, устранение резистентности, ↑ продукции TNF- α , IL-6, ИФН- β

1.4.1. Активация врожденных рецепторов

Агонисты рецепторов врождённого иммунитета, таких как Toll-подобные рецепторы и рецепторы STING, являются мощными модуляторами функционального состояния как TAM, так и ДК.

Агонисты TLR3 (Poly I:C, IPH 3102), TLR4 (Иммуномакс, ЛПС), TLR7/8 (имидазохинолины, R848), TLR9 (CpG-олигодезоксинуклеотиды), а также STING-агонисты (циклические динуклеотиды — cGAMP, ADU-S100) демонстрируют способность индуцировать созревание ДК и переключение TAM в M1/D1-подобный фенотип, продукцию ИФН I типа и экспрессию CD80, CD86, CD40 [5, 30, 37, 96, 98]. Такие клетки эффективно активируют CD8-T-лимфоциты и повышают эффективность формирования иммунной памяти [158].

Рецепторы лектинов С-типа (CLR-рецепторы - Dectin-1, Mincle) представляют собой кальций-зависимые белки, связывающие гликаны, которые экспрессируются на поверхности различных иммунных клеток, преимущественно МФ и ДК. Они преимущественно распознают гликоконъюгаты, содержащие маннозу, фукозу, N-ацетилгалактозамин (GalNAc) или N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) [68, 172]. Их активация индуцирует продукцию цитокинов и модулирует взаимодействие с Т-клетками [136, 178].

Агонист TLR3 - Полирибозиновая кислота – Poly I:C:

Полирибозиновая кислота – Poly I:C – синтетический ко-полимер полиинозиновой и полицитидиловой кислот, известный аналог двухцепочечной РНК, который непосредственно активирует НК-клетки для уничтожения опухолевых клеток [39, 50]. Помимо распознавания эндосомным TLR3 [39, 164], он индуцирует усиление экспрессии ИФН I типа и активирует несколько ядерных и цитоплазматических ферментных систем (олигоденилатсинтазу OAS, дцРНК-зависимую протеинкиназу (PKR), RIG-I хеликазу и MDA5), которые участвуют в противовирусных и противоопухолевых защитных

реакциях [92]. В исследованиях на мышинных моделях с дефицитом TLR3 наблюдается увеличение скорости роста опухоли предстательной железы. Наоборот, лечение агонистом TLR3 Poly I:C ингибирует рост опухоли в модели рака простаты со сверхэкспрессией трансгена TRAMP [166].

Было установлено, что Poly I:C повышает выживаемость грызунов с опухолевыми образованиями и усиливает антиген-специфические иммунные реакции на вирусные антигены, особенно в комбинации с антителами анти-CD40 [31, 84, 92]. Poly I:C, по-видимому, оказывает терапевтическое действие, вызывая ответные реакции В-клеток [87, 143], усиливая кросс-презентацию [39, 164], стимулируя активность противоопухолевых CD8-Т-клеток [45, 163] и антиген-специфические CD4-Т-клетки [49]. В сравнении с рядом других агонистов TLR, Poly I:C демонстрирует наибольшую эффективность в индукции ИФН I типа, необходимых для созревания ДК и формирования иммунитета, опосредованного CD4-Т-лимфоцитами.

Системное введение Poly I:C уменьшает рост меланомы, а также метастазирование [127]. Poly I:C способен имитировать действие дцРНК, которая представляет промежуточный материал генома или жизненного цикла многих вирусов. Связывание дцРНК активирует TLR3 [135], который использует адаптерный белок TRIF для активации сигнального каскада белков. Этот путь приводит к активации MAPKs, NF- κ B и регуляторного фактора 3 ИФН [92], а также индукции ИФН I типа и провоспалительных цитокинов. Среди которых ИФН- β , цитокин, критически важный для защиты хозяина от вирусных инфекций и для индукции апоптоза у нескольких типов клеток. Poly I:C вызывает ингибирование пролиферации опухолевых клеток, связанной со значительной индукцией TLR3-опосредованного апоптоза в клеточных линиях рака простаты.

Агонист TLR4 - Иммуномакс:

Одним из агонистов TLR4 является Иммуномакс (ИММ, англ. IMM). ИММ представляет собой растительный полисахарид. Он стимулирует иммунную защиту при лечении инфекционных заболеваний и также обладает

противоопухолевой активностью. Группой ученых под руководством профессора Атауллаханова Р.И. были исследованы клеточные механизмы активирующего влияния ИММ на иммунную систему [15]. В условиях культуры клеток периферической крови человека *in vitro* доказано прямое активирующее действие ИММ на НК-клетки и моноциты. Под влиянием ИММ НК-клетки представляют на клеточной поверхности активационные молекулы CD69, моноциты усиленно синтезируют и секретируют цитокины IL-1 β , TNF- α и IL-8. Кроме того, повышается в 3 раза цитолитическая активность НК-клеток. ИММ оказывает отсроченное на 24 часа активирующее действие на нейтрофильные гранулоциты крови, что проявляется усилением экспрессии на этих клетках молекул CD69 [15, 30, 156].

Впоследствии той же группой исследователей изучено влияние ИММ на ДК мыши и человека. Экспериментальные данные подтвердили, что ИММ повышает экспрессию ко-стимулирующих молекул CD40, CD80, CD86 и МНС II на поверхности ДК, стимулирует секрецию провоспалительных, регуляторных цитокинов и хемокинов (IL-1 β , TNF α , IL-10, IL-12, IL-8, MCP-1, MIP-1, RANTES) [2, 4, 5, 9, 10, 12, 17, 18, 19, 30, 58, 156]. Кроме того, установлено, что активация НК-клеток ИММ опосредована ДК, что свидетельствует об усилении ключевых функций ДК, включая антигенпрезентацию Т-лимфоцитам, активацию антиген-специфических Т-клеток и привлечение других иммунных клеток в зону воспаления.

Кроме того, Вагаев А. и соавторы (2018) изучали механизм подавления опухоли *in vitro* с помощью TLR4-активированных ДК, полученных из костного мозга (BMDC), выделенных от мышей BALB/c. Авторы определили, что два различных подмножества BMDCs (CD11b⁺ CD11c⁺ I-A/I-E^{int} и CD11b⁺ CD11c⁺ I-A/I-E^{high}) имеют разные цитотоксические механизмы действия [30]. Цитотоксичность первого подмножества опосредуется через NO и активные формы кислорода и ИФН типа I (ИФН- β), тогда как второе подмножество действует только через ИФН- β [30]. Агонисты TLR4, LPS и ИММ, активируют CD11c⁺ BMDC, которые, в свою очередь, непосредственно вызывают гибель

клеток РМЖ мыши 4Т1 и ингибируют их пролиферацию независимым от МНС образом [30]. Эти данные определяют две популяции BMDC с различными механизмами прямой цитотоксичности, а также позволяют предположить, что подмножество I-A/I-E^{int} может быть менее восприимчивым к противодействующим механизмам в микроокружении опухоли, и поддерживают исследование аналогичных подмножеств в ДК человека [30].

Суммируя данные об ИММ, можно констатировать, что *in vitro* ИММ непосредственно активирует ДК и МФ. Активированные ДК экспрессируют рецепторы ко-активации для Т-клеток (CD86, CD80 и CD40) и секретируют иммуностимулирующие цитокины (IL-12, IL-6, TNF- α , RANTES, MIP-1, MCP-1, IL-1 β) и антимикробные вещества (ИФН I типа, NO, пероксинитрит). После активации ИММ оба типа антиген-презентирующих клеток, ДК и МФ, приобретают противоопухолевые свойства, хотя механизмы их различны [30]. Влияние ИММ на ДК и МФ эквивалентно LPS [30, 129].

Другое исследование показало, что инъекции ИММ *in vivo* существенно изменяли клеточный состав селезенки и легких мышей с метастатической карциномой 4Т1. Это увеличивало частоту активации НК-клеток, CD4- и CD8-Т-клеток и уменьшало количество миелоидных клеток-супрессоров в селезенке мышей [129]. Однако, изучение роли агониста TLR4 ИММ *in vivo* еще требует детального исследования в аспекте изучения иммунологической памяти при экспериментальной метастатической болезни.

Таким образом, использование агонистов TLR, обладает большим потенциалом в противораковой иммунотерапии.

1.4.2. Ингибирование иммуносупрессивных сигнальных каскадов

Современная онкология достигла значительных успехов в области таргетной терапии, основанной на ингибировании сигнальных каскадов. Данный подход к терапии предполагает использование фармакологических

агентов, преимущественно ингибиторов или блокаторов, селективно воздействующих на ключевые молекулярные мишени, вовлеченные в онкогенез и прогрессирование злокачественных опухолей. В таргетной терапии доминируют низкомолекулярные ингибиторы протеинкиназ, с особым акцентом на те из них, которые выступают основными драйверами опухолевого роста в различных типах новообразований у значительного числа пациентов. Кроме того, применяются низкомолекулярные ингибиторы, направленные на миелоидные клетки.

Пексидартиниб (PLX3397) представляет собой характерный пример таргетного воздействия на миелоидные клетки. Данный препарат ингибирует несколько протеинкиназ, критически важных для пролиферации миелоидных клеток, блокируя тирозинкиназный домен рецептора колониестимулирующего фактора-1 (CSF1R). Цитокин CSF-1, продуцируемый опухолевыми клетками в многочисленных новообразованиях, связывается с CSF1R на миелоидных клетках, стимулируя дифференцировку проопухолевых M2 МФ и миелоидных супрессоров [38, 42, 151]. Эти популяции активно ингибируют противоопухолевый иммунитет и часто определяют иммуносупрессивный статус опухоли [93].

Пексидартиниб (PLX3397) выступает ингибитором сигнального пути CSF1R, предназначенным для разрыва цикла индукции проопухолевых иммуносупрессоров M2-подобных МФ и MDSC. Экспериментальные исследования выявили высокую противоопухолевую активность PLX3397, проявляющуюся в значительном снижении инфильтрации опухоли миелоидными клетками. Комбинированное применение PLX3397 с адаптивной Т-клеточной терапией повышало терапевтическую эффективность за счет усиления Т-клеточной инфильтрации опухоли и роста продукции ИФН- γ [82, 154].

Изоформа PI3K γ активно участвует в поляризации TAM в M2-фенотип. Применение ингибиторов PI3K γ (например, IPI-549) переключает МФ в

воспалительный M1-подобный фенотип и усиливает ответ на блокаду иммунных контрольных точек, поддерживая активацию CD8-T-клеток [124].

Аналогично, подавление сигнального пути STAT3 приводит к восстановлению экспрессии молекул МНСII и ко-стимуляторных рецепторов на ДК [95]. Блокада STAT3 (например, с использованием молекул *stattic*, *parabucasin*) приводит к подавлению транскрипции генов, связанных с ангиогенезом, иммунной толерантностью и миграцией клеток [147].

HDAC-ингибиторы (например, *vorinostat*) способны усиливать антиген-презентирующую активность ДК и подавлять экспрессию иммуносупрессивных генов в МФ [73].

1.4.3. Цитокиновая стимуляция

Классическим и широко используемым методом терапии злокачественных новообразований является использование провоспалительных цитокинов и факторов, таких как ГМ-КСФ, ИФН- γ , TNF- α , IL-12 [167]. Эти молекулы способны усиливать дифференцировку моноцитов в зрелые антиген-презентирующие ДК и способствуют поляризации МФ в M1-фенотип с высоким уровнем продукции IL-12, TNF- α и повышенной экспрессией костимулирующих молекул [114].

Так, воздействие ИФН- γ на ТАМ приводит к усилению экспрессии МНС II и активации сигнальных каскадов STAT1 \rightarrow NF- κ B, что способствует переключению с иммуносупрессивного на провоспалительный фенотип [171]. Использование вакцин на основе мРНК или аденовирусных конструкций, кодирующих IL-12, обеспечивает локальную стимуляцию T-клеточного ответа в опухолевом очаге при одновременном ремоделировании популяции МФ [23].

1.4.4. Метаболическое перепрограммирование

Миелоидные клетки в опухоли подвергаются значительным метаболическим изменениям: доминирует анаэробный гликолиз, накапливаются лактат и липиды, активируются ферменты Arginase-1 и IDO. Эти изменения способствуют иммуносупрессии и снижению антиген-презентирующей функции ДК.

Воздействие на метаболические пути, включая ингибирование Arginase-1 (Nor-NOHA), IDO (эпакадостат), подавление гликолиза (2-DG), блокаду β -окисления жирных кислот (этомоксир), позволяет изменить метаболический профиль TAM и ДК, повысить их проиммунный потенциал и продукцию ROS, NO, IL-12 [63, 108, 175].

1.4.5. Чекпойнт-ингибиторы

Иммуносупрессия в опухолевом микроокружении обусловлена не только растворимыми медиаторами. Злокачественные клетки и иммунные популяции TME продуцируют супрессивные растворимые факторы и экспрессируют на поверхности иммуносупрессивные рецепторы. Эти рецепторы активируются при взаимодействии с эффекторными иммунными клетками (цитотоксическими Т-лимфоцитами, НК-клетками, фагоцитами), обеспечивая блокаду их активности и индукцию апоптоза. Данные механизмы создают надежную защиту растущей опухоли от иммунного ответа.

В настоящее время разработано множество фармакологических средств, направленных на ингибирование рецепторных взаимодействий, обеспечивающих опухоли возможность подавлять противоопухолевый иммунный ответ. Часть этих препаратов внедрена в клиническую практику, другие проходят этапы доклинических и клинических исследований [122, 149]. Широкое распространение получили антитела, ингибирующие PD-L1 —

лиганд рецептора PD-1, который интенсивно экспрессируется на миелоидных клетках ТМЕ. Через PD-L1 опухоль подавляет активность Т-лимфоцитов и индуцирует их апоптоз. Инфильтрирующие опухоль Т-клетки несут рецепторы PD-1 (белок программируемой смерти-1). При активации Т-лимфоциты подвергаются пролиферации и дифференцировке в эффекторные клетки в ответ на антигены, представленные в комплексе с МНС на антиген-презентирующих клетках.

В ходе этой программы на поверхности Т-лимфоцитов экспрессируются специальные ингибирующие рецепторы, обеспечивающие прекращение их экспоненциальной пролиферации. Отсутствие строгого механизма контроля неизбежно приведет к злокачественной трансформации активированного Т-клеточного клона в лимфому или лейкоз. Среди ингибирующих рецепторов PD-1 занимает особое место как основной регулятор остановки пролиферации и элиминации эффекторных Т-клеток после выполнения защитных функций [21]. Опухоли эксплуатируют этот механизм: злокачественные и миелоидные клетки ТМЕ гиперэкспрессируют PD-L1 — лиганды PD-1. Контакт Т-клеток с PD-L1⁺ клетками приводит к их функциональному параличу, супрессии и апоптозу, в то время как блокада PD-L1-PD1 взаимодействия восстанавливает Т-клеточную активность.

Взаимодействие PD-L1 на злокачественных и миелоидных клетках опухоли с PD-1 на инфильтрирующих Т-лимфоцитах блокируется моноклональными антителами, направленными против PD-L1 (Атезолизумаб) или PD-1 (Ниволумаб, Пембролизумаб). Эти препараты сформировали основу высокоэффективного направления иммунотерапии — ингибирования иммунных контрольных точек, продемонстрировав значительные успехи в клинической онкологии [127, 149]. Согласно данным клинических испытаний, Атезолизумаб одобрен для терапии уротелиальной карциномы мочевого пузыря, немелкоклеточного рака легкого, трижды негативного РМЖ, мелкоклеточного рака легкого и гепатоцеллюлярной карциномы. Ниволумаб применяется при меланоме, опухолях головы и шеи, лимфоме Ходжкина, раке

легкого, плевральной мезотелиоме, почечно-клеточном раке, уротелиальной карциноме, раках пищевода, желудка, колоректального рака и первичной карциноме печени [122, 149, 157]. В отличие от Атезолизумаба, напрямую воздействующего на миелоидные клетки, Ниволумаб и Пембролизумаб блокируют PD-1 на Т-клетках, прерывая иммуносупрессивную сигнализацию PD-L1 → PD-1 и восстанавливая противоопухолевый иммунитет. Однако ингибирование PD-1/PD-L1 и других контрольных точек сопряжено с риском аутоиммунных осложнений. Это связано с отменой важных естественных механизмов контроля, которые предотвращают атаку Т-клеток на собственные ткани организма.

1.4.6. Эпигенетическая регуляция

Генетическая коррекция иммуносупрессивного фенотипа миелоидных клеток осуществляется через нокаут, нокаун или сверхэкспрессию определённых регуляторных генов. Функциональный статус миелоидных клеток регулируется на уровне транскрипции и эпигенетики. Использование ингибиторов гистоновых деацетилаз (HDACi), РНК-интерференции (siRNA, miRNA), а также редактирование генов с помощью системы CRISPR/Cas9 позволяет селективно подавлять экспрессию иммуносупрессивных факторов (например, STAT3, IRF4) и усиливать представление антигенов, экспрессию МНС и молекул костимуляции [51, 59, 117, 168]. siRNA и miRNA используются для подавления экспрессии генов, ответственных за иммуносупрессивный фенотип. Например, siRNA к *Arg1*, *IL-10* и *PD-L1* позволяет изменять профиль экспрессии генов в TAM [105].

CRISPR/Cas9-технологии используются для нокаута супрессорных генов и усиления экспрессии провоспалительных медиаторов в миелоидных клетках. Примером служит редактирование экспрессии генов *Arg1* и *Socs3*, приводящее к снижению продукции *Arg-1* и восстановлению антиген-

презентирующей активности TAM [33, 40] Этот подход применяется в *ex vivo* модификации ДК с последующей реинфузией [40].

Также было показано, что использование *miR-155* и *miR-125a* направлено на подавление негативных регуляторов активации, таких как SHIP1 и IRF4, способствуя усилению ответа на TLR-стимуляцию [116].

мРНК-вакцины и трансфекции (например, мРНК, кодирующие ГМ-КСФ или CD40L) повышают экспрессию ко-стимулирующих молекул, усиливают миграцию ДК в лимфатические узлы (ЛУ) и активируют специфический Т-клеточный ответ [89].

1.4.7. Таргетная доставка

Современные наноматериалы позволяют доставлять перепрограммирующие агенты непосредственно в опухоль-ассоциированные миелоидные клетки. Это могут быть липосомы, полимерные (PLGA) наночастицы, липидные наночастицы, пептидные конъюгаты, направленные на CD206, CD11b, CCR2 и другие маркеры TAM и ДК. Такая стратегия обеспечивает локальную высокую концентрацию препарата, снижает системную токсичность и позволяет проводить комбинированную доставку нескольких молекул (например, агониста TLR + siRNA) [88, 162].

Липосомы и мицеллы применяются для инкапсуляции гидрофобных препаратов, например, ингибиторов CSF1R или mTOR [124]. Липосомы, модифицированные лигандом к рецепторам CD206 (маннозный рецептор), обеспечивают таргетированную доставку в TAM [162]. Экзосомы, модифицированные лигандом к MARCO или CD206, направлены на TAM и доставляют siRNA или мРНК в опухолевые клетки [102]. Полимерные наночастицы, покрытые антителами к CD11b или DEC205, обеспечивают доставку генетических конструкций к МФ или ДК [152]. Кроме того, полиангидридные наночастицы, связанные с галактозой и д-маннозой,

увеличивают экспрессию CD40, CD86, MHC класса I и II, CIRE, MR и усиливают продукцию провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6 и TNF- α) у альвеолярных МФ [150]. Также, на мышинных моделях было доказано, что инъекции конъюгата анти-DEC-205-OVA поглощались ДК и стимулировал антиген-специфические CD8-T-клетки в 400 раз эффективнее по сравнению с одним OVA [57]. Кроме того, внутрикожное введение мышам антитела к DEC-205-OVA стимулировало как CD4-, так и CD8-T-клеточные ответы [60].

1.4.8. Комбинированные подходы

Перспективным направлением является создание комбинированных терапевтических платформ, включающих несколько активных компонентов, воздействующих на различные мишени или сигнальные пути одновременно. Эффективность перепрограммирования миелоидных клеток усиливается при комбинации с другими методами иммунотерапии — блокадой контрольных точек (анти-PD-1, анти-CTLA-4, анти-PD-L1), онколитическими вирусами, вакцинами, клеточной терапией (CAR-T, CAR-NK, CAR-M) или другими агонистами [11, 16, 21].

Исследование Лебедевой Е.С. с соавторами посвящено анализу внутриклеточных сигнальных каскадов, обеспечивающих синергический ответ МФ при совместной стимуляции агонистами TLR4, TLR9 и NOD2 [20]. Установлено, что парные комбинации этих агонистов (TLR4+TLR9, TLR9+NOD2, TLR4+NOD2) на моделях костномозговых МФ значительно усиливают транскрипцию гена TNF- α под контролем факторов NF- κ B и AP-1 через активацию MyD88-зависимых путей [20]. Комбинация TLR9+NOD2 продлевает, а TLR4+NOD2 ускоряет ядерную транслокацию NF- κ B без существенного влияния на MAPK-сигнализацию, определяя преобладающую роль NF- κ B в синергической продукции TNF- α [20].

В другой работе тех же ученых изучена эффективность активации врожденного иммунитета при стимуляции ДК и МФ комбинациями агонистов TLR4 (мембранный), TLR9 (эндосомальный) и NOD2 (цитозольный) [10]. Все изученные пары индуцировали синергетическое повышение секреции TNF- α , IL-6, ИФН- β и NO, эффект зависел от концентрации агонистов и длительности инкубации [10]. Синергизм обусловлен кооперативной транскрипционной активацией генов провоспалительных цитокинов и интерферонов на уровне PRR-сигнализации [10]. Такие комбинированные стратегии способствуют усиленной инфильтрации опухолей цитотоксическими Т-лимфоцитами и преодолению иммуносупрессивного барьера, повышая эффективность терапии «холодных» опухолей [104, 146].

Таким образом, наметился очевидный прогресс в лечении онкологических заболеваний с применением комбинированной иммунотерапии агонистами TLR, направленной на перепрограммирование миелоидных клеток. Однако, в литературе нет работ, в которых показано совместное применение агонистов TLR3 и TLR4 *in vivo*, а также исследование механизмов иммунной защиты в этих условиях.

1.5. Экспериментальные модели для изучения перепрограммирования миелоидных клеток

In vitro модели совместных 2D- и 3D-культур опухолевых и миелоидных клеток применяются для изучения межклеточных взаимодействий, однако не воспроизводят ключевые характеристики солидных опухолей [28, 47]. Сфероиды и органоиды частично имитируют архитектуру опухоли, но ограничены неполным воспроизведением ее микроокружения [69, 72, 119, 144, 160, 170].

Изучение молекулярных механизмов канцерогенеза и создание новых противоопухолевых препаратов невозможно без применения животных

моделей [83]. Оптимальная модель опухолевого процесса должна удовлетворять следующим критериям: 1) демонстрировать гистопатологические характеристики, идентичные человеческой опухоли; 2) прогрессировать через аналогичные стадии с сопоставимыми физиологическими и системными проявлениями; 3) задействовать те же генетические и биохимические пути, что наблюдаются при развитии новообразования у человека [112].

Перевиваемые опухолевые модели предполагают инокуляцию опухолевых клеток (аллогенных или ксеногенных) в организм животного [62, 110, 128]. В исследованиях преимущественно применяются мышинные опухолевые линии (B16-F10 — меланома; 4T1 — трижды негативный РМЖ), что обеспечивает возможность мониторинга динамики опухолевого роста, инфильтрации иммунными клетками, включая миелоидные популяции, и оценки терапевтической эффективности. 4T1-модель РМЖ у BALB/с мышей является одной из наиболее широко используемых моделей метастатического процесса. Этот тип опухоли характеризуется быстрым ростом, формированием иммуносупрессивного микроокружения и высоким уровнем инфильтрации ТАМ и ДК [25, 123]. Перевиваемые опухолевые модели дают возможность тестировать различные терапевтические агенты, а также оценивать динамику перепрограммирования ТАМ и ДК с использованием проточной цитометрии, иммуногистохимии и РНК-секвенирования.

Одним из подходов к моделированию метастатической болезни является введение опухолевых клеток различными способами – внутривенным, подкожным, внутрибрюшинным. Внутривенная инъекция опухолевых клеток приводит к их проникновению в капиллярное русло с образованием очагов экспериментальных метастазов. Таким образом, введение клеток в хвостовую вену грызунов индуцирует формирование метастатических очагов в различных органах.

Метастатические модели (например, инъекция 4T1 или B16-F10 клеток в хвостовую вену или подкожно) позволяют изучать процессы миграции и

перепрограммирования миелоидных клеток в метастатических очагах, включая легкие, селезенку, печень, мозг и кости [109, 131]. Для моделирования метастатического РМЖ наиболее широко используется клеточная линия 4Т1, характеризующаяся высокой агрессивностью, быстрым ростом и спонтанным метастазированием, адекватно воспроизводящая ключевые аспекты прогрессии заболевания у мышей [109, 131]. При подкожной имплантации клеток 4Т1 в область второй молочной железы половозрелых самок BALB/c развиваются полиорганные метастазы, преимущественно в легких, печени, селезенке, позвоночнике и регионарных ЛУ, реже — в головном мозге, что соответствует метастатическому профилю человеческого РМЖ [109, 131]. Было показано, что в таких моделях происходит активная рекрутирование моноцитов в органы-мишени, где они дифференцируются в TAM с иммуносупрессивным профилем, что делает эти модели важным инструментом для тестирования терапевтических вмешательств, направленных на изменение их фенотипа [25, 109, 123, 131, 138].

1.6. Резюме

Понимание механизмов взаимодействия опухоли и иммунной системы имеет принципиальное значение для разработки новых подходов к терапии. Особенно перспективным направлением в настоящее время считается таргетирование клеток врожденного иммунитета, способных оказывать как протективное, так и патогенное влияние в зависимости от функционального состояния. Их высокая пластичность делает их привлекательной мишенью для терапевтического вмешательства, включая перепрограммирование функционального состояния с целью переключения на противоопухолевую активность.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. 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.

В ходе экспериментов мыши получали подкожные инъекции, содержащие суспензии опухолевых клеток линии 4T1 (ATCC, Кат. №: CRL-2539), предоставленные профессором М. Г. Агаджаняном (Институт Молекулярной Медицины, Хангтингтон Бич, Калифорния, США).

Все экспериментальные процедуры с животными проводили в соответствии с Правилами исследовательской работы с лабораторными животными в Институте иммунологии ФМБА России (приказ от 12 ноября 2015 г.), одобренными локальным комитетом по этике (Резолюция 4/17 от 13 июля 2017 г.).

2.2. Экспериментальная модель метастатической карциномы 4T1

Лабораторные мыши линии BALB/c получали подкожные инъекции суспензий сингенной линии 4T1 (карцинома молочной железы мыши) в количестве 15 тысяч клеток/мышь. Размеры индивидуальных опухолей измеряли каждые 2–3 дня с помощью штангенциркуля. Объем опухоли определяли по формуле:

$V = l \times w^2 / 2$, где V - объем, l – длина, w – ширина. Ежедневно оценивали летальность. Также, измеряли массу опухоли (в мг).

2.3. Хирургическая резекция опухоли

Мышей анестезировали комбинацией препаратов Золетил 100 (0,005 мг/кг) и Ксилой (0,2 мл/кг) внутримышечно в бедро. Для оптимизации визуализации операционного поля шерсть на коже выбривали и проводили стерилизацию спиртовым антисептиком. Передние и задние конечности животного фиксировали к операционному столу, обеспечивая стабилизацию положения тела. На стадии хирургической анестезии опухоль удаляли стерильными инструментами с применением тупой диссекции для ее мобилизации. Раневые края ушивали нерассасывающимися нитями с полигликолидным покрытием USP 4/0 MP 1,5 (Кат. №: 61/19, Медтехника, Россия), операционную рану обрабатывали тетрациклиновой мазью. После проведения операции мышей перемещали в теплое сухое место и наблюдали до восстановления.

2.4. Экспериментальная модель иммунотерапии агонистами TLR после хирургической резекции первичной опухоли

Лабораторным мышам подкожно вводили суспензию сингенной клеточной линии 4Т1 в дозе 15×10^3 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 интервальными инъекциями агонистов TLR каждые 4–5 дней: агонист TLR3 Poly I:C (Кат. №: P-1530, Sigma, США) — 3 мкг/мышь, агонист TLR4 Иммуномакс (ИММ, англ. ИММ, Иммафарма, Россия) — 14 мкг/мышь, комбинация ИММ (14 мкг/мышь) + Poly I:C (3 мкг/мышь).

2.5. Культура клеток линии 4Т1 и 4Т1-GFP

После размораживания опухолевые клетки линии 4Т1 помещали в 15 мл пробирку с фосфатным солевым буферным раствором (англ. phosphate-buffered saline, PBS, ПанЭко, Россия), содержащего 0,5% эмбриональной телячьей сыворотки (англ. fetal bovine serum, FBS, Кат.№: SV30160.03, HyClone, США, уровень эндотоксина ≤ 10 УЕ/мл, далее PBS/FBS), центрифугировали 5 минут при 300g, при 4°C, 10 минут. Очищенные от диметилсульфоксида (ДМСО) клетки добавляли в полную среду RPMI (RPMI Advanced Gibco США, Кат. №: 12491023, дополненная 5% FBS, 25мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (ХЕПЕС, англ. HEPES), 2мМ L-глутамин, смесью заменимых аминокислот, 1мМ пирувата натрия, 10 мкг/мл гентамицина (все реактивы ПанЭко, Россия) в чашки Петри диаметром 60 мм для выращивания клеточных культур. Когда количество клеток достигало 70%–80% от монослоя, из чашек Петри убрали питательную среду и добавляли 3 мл раствора трипсина-ЭДТА (Кат. №: П043Е, ПанЭко, Россия) и оставляли на 2 минуты. С помощью светового микроскопа проводили визуальный контроль за трипсинолизом. Трипсинолиз прекращали добавлением 5 мл раствора PBS/FBS. Суспензию клеток аккуратно собирали, осаждали центрифугированием (400g, при 4°C, 10 минут) и использовали для дальнейших исследований.

Для культивирования осажденные клетки ресуспендировали в 1 мл PBS/FBS, из которых 100 мкл (1/10 часть) переносили в чашку Петри с полной средой и помещали в инкубатор при 37°C и при содержании в воздухе 5% диоксида углерода.

Для криоконсервации клетки ресуспендировали в криосреде (10% ДМСО в FBS) при концентрации 1×10^6 кл/мл, распределяли по криопробиркам и хранили в жидком азоте.

Для инокуляции опухолевых клеток мышам суспензию готовили в PBS/FBS (150 тысяч кл/мл), вводили подкожно 15 тысяч клеток (0,1 мл) инсулиновым шприцем U-100 (BD Micro-Fine™, США).

Линия 4T1 с устойчивой GFP-экспрессией (англ. green fluorescent protein, GFP) получена в лаборатории путем трансфекцией лентивирусным вектором pLV-neo-EGFP с FACS-сортировкой GFP^{high}-популяции на BD FACSAria II (Becton Dickinson, США; возбуждение 488 нм, эмиссия 515–545 нм). Чистота отсортированных клеток составила 98%.

2.6. Получение суспензии клеток селезенки, опухоли, легких и лимфатических узлов

Мышей выводили из эксперимента дислокацией шейных позвонков. После разреза кожи по средней линии живота удаляли опухоль, затем вскрывали брюшную полость и выделяли селезенку. Ткань селезенки размельчали в стерильных условиях ножницами и пинцетом в чашке Петри с PBS/FBS, протирали через фильтр с порами размером 100 мкм. Общий объем суспензии доводили до 6 мл раствором PBS/FBS, из которых 3 мл наслаивали на 3 мл фикола плотностью 1,09 г/см³ (Кат. №: P051, ПанЭко, Россия) в пробирке на 15 мл. Использовали разведение 1:1. Фракцию мононуклеарных клеток получали методом центрифугирования в градиенте фикола (400g, 20°C, 25 минут, без разгона и торможения). «Кольцо» мононуклеарных клеток собирали и переносили в новую пробирку на 15 мл и дважды отмывали 10 мл раствора PBS/FBS (300g, при 4°C, 10 минут). Получившийся осадок клеток разбавляли в 1 мл PBS/FBS.

Ткань опухоли размельчали ножницами и пинцетом в стерильных условиях в чашке Петри в 5 мл раствора RPMI-1640 (Кат. №: C310п, ПанЭко, Россия). Получившуюся суспензию переносили в пробирки на 15 мл, добавляли коллагеназу I типа (0,3 мг/мл, Кат. №: C0130, Sigma, США),

коллагеназу IV типа (0,5 мг/мл, Кат. №: CLS-1, Worthington, США) и ДНКазу (40 ЕД/мл, Roche, Швейцария), и оставляли в инкубаторе при 37°C и при содержании в воздухе 5% диоксида углерода на 1 час. Активность ферментов останавливали добавлением раствора PBS/FBS до общего объема суспензии 15 мл. Суспензию опухоли осаждали центрифугированием (300g, при 4°C, 10 минут), после чего перетирали через фильтр с размерами пор 100 мкм и промывали раствором PBS/FBS. Клетки осаждали центрифугированием доводя конечный объема клеточной суспензии до массы каждой индивидуальной опухоли раствором PBS/FBS. Перед проведением цитометрии или сортировки клеток клеточную суспензию еще раз пропускали через фильтр с размерами пор 70 мкм.

Извлеченные ЛУ в стерильных условиях измельчали наконечником от шприца в чашке Петри с раствором PBS/FBS, полученную суспензию протирали через фильтр с порами размером 70 мкм и промывали 10 мл раствора PBS/FBS. Клеточную суспензию осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 50 мкл раствора PBS/FBS.

Ткань легких размельчали ножницами и пинцетом в стерильных условиях в чашке Петри в 5 мл среды RPMI-1640. Получившуюся суспензию мелких фрагментов ткани переносили в конические пробирки объемом 15 мл, добавляли коллагеназу I типа, коллагеназу IV типа и ДНКазу, оставляли в инкубаторе при 37°C и при содержании в воздухе 5% диоксида углерода на 1 час. Действие ферментов останавливали добавлением раствора PBS/FBS. Клетки и тканевые фрагменты осаждали центрифугированием, осадок ресуспендировали в 1 мл раствора PBS/FBS, суспензию фильтровали через фильтр с размером пор 100 мкм. Тканевые фрагменты протирали через этот же фильтр с помощью поршня шприца. Фильтр дополнительно промывали PBS/FBS до общего объема 30 мл. Клетки осаждали центрифугированием, клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл раствора PBS/FBS.

2.7. Количественный анализ метастатических колониеобразующих единиц в ткани легкого методом лимитирующих разведений

Суспензию клеток из ткани легких готовили, как описано выше. Различные количества клеток легких культивировали в полной среде DMEM (DMEM Advanced, Кат. №: 12491023, Gibco, США, дополненная 5% FBS, 25мМ ХЕПЕС, 2мМ L-глутамина, смесью заменимых аминокислот, 1мМ пирувата натрия, 10 мкг/мл гентамицина) в течение 6–7 дней в инкубаторе при 37°C и при содержании в воздухе 5% диоксида углерода, чтобы каждая КОЕ успела образовать колонию достаточно большого размера. 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. Всего делали 11 шагов титрования. Количество одиночных колоний клеток карциномы 4Т1 при лимитирующих разведениях позволяло вычислить общее количество опухолевых КОЕ в исходной ткани легких. Колонии опухолевых клеток 4Т1 фиксировали в 4% параформальдегиде (Sigma, США) и окрашивали 0,5% раствором метиленового синего. Окрашенные колонии опухолевых клеток фотографировали, площадь колоний и интенсивность окраски рассчитывали с помощью программы ImageJ (NIH, США).

2.8. Культуры дендритных клеток и макрофагов *in vitro*

Дифференцировку ДК и МФ костного мозга мышей осуществляли *in vitro* в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ, Sigma, США). В асептических условиях выделяли бедренные и большие берцовые кости мышей. Костный мозг вымывали инсулиновым шприцом в чашку Петри с PBS/FBS и тщательно суспендировали. Полученную суспензию клеток переносили в коническую

пробирку объемом 15 мл. Клетки осаждали центрифугированием, надосадочную жидкость удаляли. Клеточный осадок встряхивали, эритроциты удаляли осмотическим лизисом, приливая к осадку 4,5 мл воды для инъекций на 20 секунд, мгновенно восстанавливали изотоничность, добавляя 0,5 мл 10-кратного раствора Хэнкса (ПанЭко, Россия), общий объем суспензии доводили до 10 мл раствором PBS/FBS. Ядродержащие клетки осаждали центрифугированием, надосадочную жидкость удаляли и клетки ресуспендировали в 1 мл полной среды. Количество клеток определяли в камере Горяева при окрашивании трипановым синим. Для культивирования в чашки Петри диаметром 10 см помещали 10 млн клеток костного мозга в 10 мл полной среды с добавлением 10 нг/мл ГМ-КСФ и 50 мкМ 2-меркаптоэтанола. Клетки культивировали при 37°C и при содержании в воздухе 5% диоксида углерода. Через 3–4 дня в культуры вносили 10 мл полной среды с теми же добавками. На 6-й день клетки собирали аккуратным пипетированием в холодной растворе Версена (Кат. №: P080п, ПанЭко, Россия), осаждали центрифугированием, осадок ресуспендировали.

2.9. Получение зрелых дендритных клеток и макрофагов из периферической крови здоровых доноров

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из образцов цельной крови здоровых доноров с использованием центрифугирования на градиенте плотности фиколла ($\rho = 1,077$ г/л, Sigma-Aldrich, США). Исследование было одобрено Этическим комитетом Института иммунологии (протокол № 8 от 10 июня 2025 г.). Исследование было выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека в качестве испытуемого».

Письменное информированное согласие от участников исследования были получены перед выполнением каких-либо процедур исследования.

Суспензию клеток РВМС помещали в чашки Петри (диаметром 60мм, Corning, США) в полной среде DMEM на 2 часа в инкубатор при 37°C и при содержании в воздухе 5% диоксида углерода. Через 2 часа собирали неадгезионную фракцию клеток вместе с культуральной средой, осаждали центрифугированием (300 g, 4°C, 10 минут) и культивировали в чашках Петри в полной среде — обогащенная Т-клеточная популяция. Сильно адгезионные моноциты, остающиеся на дне чашек, использовали для дифференцировки в МФ и ДК. Прилипшую фракцию РВМС культивировали в чашках Петри (Corning, Швейцария) в присутствии рекомбинантного человеческого ГМ-КСФ (100 нг/мл, BioLegend, США) и ИЛ-4 (25 нг/мл, BioLegend, США) в течение 7 дней для генерации незрелых ДК и МФ. На 4-й день культивирования ДК/МФ добавляли свежую порцию цитокинов. На 7-й день культивирования к клеткам добавляли липополисахарид (100 нг/мл, *E. coli* 055 : B5, Serviosebio, Китай) для получения зрелых ДК и МФ. Дифференцировку в ДК оценивали по экспрессии CD86-FITC и PD-L1-PE-Cy7 (Biolegend, США).

2.10. Проточная цитофлуориметрия и сортировка популяций клеток

Для идентификации различных клеточных популяций в ткани опухоли, селезенке, легких, дренирующих ЛУ клеточную суспензию инкубировали с двумя панелями моноклональных антител, обеспечивающими анализ лимфоидных и миелоидных фракций соответственно (таблицы 3, 4). Окрашивание проводили флуорохром-мечеными антителами в течение 15 минут при 4°C в темноте, после чего клетки промывали в PBS-cyto (PBS без кальция и магния с добавлением: 10 mM ХЕПЕС, 0,5% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 0,01% азида натрия, 0,35 mM ЭДТА) и добавляли

калибровочные шарики (200 мкл, Biolegend, США) с DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол, 1 мкг/мл) для определения живых и мертвых клеток. Цитофлуориметрический анализ выполняли на сортировщике BD FACS Aria II (Becton Dickinson, США) с последующей обработкой данных в FlowJo (Dotmatics, США).

Таблица 3 – Панель антител, использованная для анализа методом проточной цитофлуориметрии поверхностных маркеров основных лимфоидных популяций в ткани опухоли, селезенке, легких, дренирующей опухоль ЛУ

Антиген	Флуорохром	Клон	Антитело	Производитель
CD45	BV510	30-F11	Rat IgG2b, κ	Biolegend, США
CD19	FITC	1D3	Rat IgG2a, κ	Biolegend, США
CD69	PE	H1-2F3	Armenian Hamster	BD Biosciences, США
CD8a	PE-Dazzle594	53-6.7	Rat IgG2a, κ	Biolegend, США
CD49b	PE	DX5	Rat IgM κ	BD Biosciences, США
CD4	PE-Cy5	RM4-5	Rat IgG2a, κ	Biolegend, США
TCR γ/δ	PE-Cy7	GL3	Armenian Hamster IgG	Biolegend, США
CD3	APC	17A2	Rat IgG2b κ	Biolegend, США
CD11b	APC-Cy7	M1/70	Rat IgG2b, κ	Biolegend, США

Таблица 4 – Панель антител, использованная для анализа методом проточной цитофлуориметрии поверхностных маркеров миелоидных клеток в ткани опухоли, селезенке, легких, дренирующей опухоль ЛУ

Антиген	Флуорохром	Клон	Антитело	Производитель
CD45	BV510	30-F11	Rat IgG2b, κ	Biolegend, США
CD11b	FITC	M1/70	Rat IgG2b, κ	Biolegend, США
CD11c	PE	N418	Armenian Hamster IgG	Biolegend, США
Ly6G	PE-Dazzle™ 594	YTS156.7.7	Rat IgG2b, κ	Biolegend, США
Ly6C	PE-Cy7	HK1.4	Rat IgG2c, κ	Biolegend, США
F4/80	APC	BM8	Rat IgG2a, κ	Biolegend, США
I-A/I-E	APC-Cy7	M5/114.15.2	Rat IgG2b, κ	Biolegend, США

Из суспензии клеток опухоли, селезенки, ЛУ выделяли чистые CD45⁺ CD11b⁻ CD3⁺ CD4⁺ Т-клетки, CD45⁺ CD11b⁻ CD3⁺ CD8⁺ Т-клетки, CD45⁺ CD3⁻ CD11b⁺ миелоидные клетки, из легких выделяли ДК CD45⁺ CD11c⁺ F4/80⁺

Ly6C⁻ Ly6G⁻ I-A/I-E⁺, CD45⁺ CD11b⁺ CD11c⁻ F4/80⁺ Ly6C⁺ Ly6G⁻ I-A/I-E⁺ МФ, CD45⁺ CD11b⁺ CD11c⁻ F4/80⁻ Ly6C⁻ Ly6G⁺ I-A/I-E⁻ гранулоциты для дальнейшей характеристики их функционального состояния. Очищенные популяции получали методом сортировки на проточном цитофлуориметре-сортировщике BD FACS Aria II. Чистота сортированных популяций составляла 70–98%.

2.11. Анализ противоопухолевой цитотоксической активности *in vitro*

В лунки 96-луночного планшета для культивирования помещали 200 клеток карциномы 4T1-GFP, экспрессирующего зеленый флуоресцентный белок. CD45⁺CD11b⁻CD3⁺CD8⁺ Т-клеток были получены с помощью сортировки на проточной флуориметре-сортировщике из ЛУ и ткани опухоли, как описано выше. Для анализа противоопухолевой активности CD8-Т-клетки помещали в лунки планшета вместе с 200 опухолевыми клетками 4T1-GFP. Отношение «эффектор : мишень» было равным 50:1. Культуры клеток инкубировали в течение 4 дней при 37 °С и при содержании в воздухе 5% диоксида углерода. Рост опухолевых клеток сравнивали в монокультуре и в совместной культуре с CD8-Т-клетками. В день анализа клетки 4T1-GFP собирали с помощью раствора трипсин-ЭДТА с солями Хэнкса и анализировали с помощью проточного цитометра BD FACS Aria II. Для цитофлуориметрического анализа клетки карциномы 4T1-GFP окрашивали DAPI и подсчитывали точное количество живых 4T1-GFP-клеток в каждой лунке планшета, используя калибровочные шарики (Кат. №: C36950, Invitrogen, США).

ДК CD45⁺ CD11c⁺ F4/80⁺ Ly6C⁻ Ly6G⁻ I-A/I-E⁺, CD45⁺ CD11b⁺ CD11c⁻ F4/80⁺ Ly6C⁺ Ly6G⁻ I-A/I-E⁺ МФ, CD45⁺ CD11b⁺ CD11c⁻ F4/80⁻ Ly6C⁻ Ly6G⁺ I-A/I-E⁻ гранулоциты были получены с помощью сортировки клеток из ткани легких мышей. Культуры миелоидных клеток с пошагово уменьшающимся

количеством клеток легкого получали титрованием с шагом 2. Для анализа противоопухолевой активности миелоидные клетки помещали в лунки планшета вместе с 200 опухолевыми клетками 4T1-GFP. В часть культур вносили агонист TLR4 ИММ (10 мкг/мл), агонист TLR3 Poly I:C (3мкг/мл), ИММ+Poly I:C. Культуры клеток инкубировали в течение 4 дней при 37 °С и при содержании в воздухе 5% диоксида углерода. Рост опухолевых клеток сравнивали в монокультуре и в совместной культуре с миелоидными клетками в присутствии или отсутствии агонистов TLR. В день анализа клетки 4T1-GFP собирали с помощью раствора трипсин-ЭДТА с солями Хэнкса и анализировали с помощью проточного цитометра BD FACS Aria II. Для цитофлуориметрического анализа клетки карциномы 4T1-GFP окрашивали DAPI и подсчитывали точное количество живых 4T1-GFP-клеток в каждой лунке планшета, используя калибровочные шарики.

В лунки 96-луночного планшета для культивирования помещали 450 клеток K562-GFP, экспрессирующего зеленый флуоресцентный белок. ДК/МФ были получены из периферической крови здоровых доноров, как описано выше. Для анализа противоопухолевой активности ДК/МФ помещали в лунки планшета вместе с 450 клетками миелолейкоза человека K562-GFP. Отношение «эффектор : мишень» титровали, начиная с соотношения 50:1. Культуры клеток инкубировали в течение 4 дней при 37 °С и при содержании в воздухе 5% диоксида углерода. Рост опухолевых клеток сравнивали в монокультуре и в совместной культуре с ДК/МФ. В день анализа клетки K562-GFP собирали с помощью раствора трипсин-ЭДТА с солями Хэнкса и анализировали с помощью проточного цитометра BD FACS Aria II. Для цитофлуориметрического анализа клетки миелолейкоза человека K562-GFP окрашивали DAPI и подсчитывали точное количество живых K562-GFP клеток в каждой лунке планшета, используя калибровочные шарики.

2.12. Получение лизата опухолевых клеток карциномы 4Т1

Клеточную линию выращивали и пересаживали стандартным методом, указанным выше. После осаждения клеток центрифугированием, клеточную суспензию 3 раза промывали от FBS, раствором Хенкса. Затем клетки переносили криопробирки. Проводили 3 цикла замораживания в азоте и оттаивания в воде при 37°C. Для подсчета концентрации целевого белка использовали методику титрования БСА с известной концентрацией (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, США). Затем измеряли концентрацию антигена 4Т1 (при 550 нм) и сравнивали ее с известными концентрациями БСА с использованием спекрофотометра. Полученную суспензию опухолевых антигенов в концентрации (10 мкг/мл) в комбинации липополисахаридом (100 нг/мл, ЛПС, англ. LPS, липополисахарид из *E. Coli* O55:B5, Кат. №: L-2880, Sigma, США) добавляли миелоидным клеткам, выделенных из костного мозга мышей, 6 день дифференцировки.

2.13. Анализ Т-клеточных реакций, специфичных к антигенам карциномы 4Т1 методом ELISpot

Для приготовления антиген-презентирующих ДК использовали методику выделения ДК, описанную выше. На 6-й день культивирования ДК активировали ЛПС в конечной концентрации 0,1 мкг/мл нагружали антигеном. В качестве антигена использовали лизат клеток 4Т1 в конечной концентрации 10 мкг/мл (по белку). Концентрацию белка в лизате определяли методом Pierce BCA Protein Assay. Для презентации антигенов в комплексе с МНС II класса активированные ДК нагружали лизатом опухолевых клеток 4Т1. Для презентации антигенов в комплексе с МНС I класса активированные ДК культивировали совместно с клетками карциномы 4Т1.

Антиген-специфический ответ Т-клеток оценивали по секреции ИФН- γ . Специфический Т-клеточный ответ индуцировали в совместной культуре Т-клеток с антиген-презентирующими ДК, предварительно нагруженными лизатом клеток 4Т1, как описано выше, или совместно с клетками карциномы 4Т1. В лунки планшета для ELISpot (BD TM ELISPOT Mouse IFN- γ , Кат. №: 551083, BD Bioscience, США) помещали 30 тысяч CD4- или CD8-Т-клеток, очищенных с помощью проточного сортировщика BD FACS Aria II, культивировали совместно с 50 тысячами ДК. Для активации CD8-Т-клеток в совместную культуру Т-клеток и ДК вносили 10 тысяч клеток карциномы 4Т1. Совместные культуры инкубировали в течение 36 часов при 37°C и при содержании в воздухе 5% диоксида углерода, после чего выявляли клетки, секретирующие ИФН- γ , в соответствии с инструкцией производителя. Фотографии каждой лунки делали с помощью микроскопа Levenhuk DTX 700 LCD, количество спотов считали с помощью компьютерной программы ImageJ (НИН, США). Количество ИФН- γ -секретирующих антиген-реактивных Т-клеток представляли в расчете на 1 миллион (млн) CD4- или CD8-Т-клеток.

2.14. Определение экспрессии генов в очищенных сортировкой миелоидных клеток, выделенных из опухоли методом RT-PCR

CD11b⁺ миелоидные клетки, выделенные FACS-сортировкой на BD FACS Aria II, подвергали лизирующему воздействию в 200 мкл буфера с гуанидин-изотиоцианатом (набор «РНК-экстран», Синтол, Россия). Для полного удаления белков добавляли протеиназу К (0,3 мг/мл, Кат. №: O0491, Thermo Scientific, США) с инкубацией 30 минут при 37°C. РНК осаждали 26,6 мкл изопропанола с последующим центрифугированием (12000 g, 4°C, 15 минут), промывкой (266 мкл этанолового раствора) и элюцией в 30 мкл DEPC-обработанной воды. Контаминацию ДНК устраняли ферментативно (ДНКаза I, Кат. №: N0521, Thermo Scientific, США): 10 мкл РНК и 1 мкл

10-кратного буфера хлорида магния и 0,5 мкл ДНКазы при 37°C на 20 минут, инактивация с добавлением 5 мМ ЭДТА при 65°C на 10 минут.

Обратную транскрипцию осуществляли в 25 мкл с использованием Random6 праймеров (15 ОЕ/мл) по протоколу набора Синтол (Кат. №: ОТ-1, Синтол, Россия). РНК-праймерный комплекс отжигали 5 минут при 65°C, охлаждали на льду, добавляли 10 мкл 2,5-кратного буфера и 1 мкл ревертазы (50 Ед/мкл). Цикл синтеза включал 40°C 40 минут с финальной денатурацией при 95°C 10 минут (термостат «Гном», ДНК-Технология, Россия). Полученную кДНК разбавляли mQ водой до 50 мкл.

Реакции RT-qPCR (25 мкл) содержали 5 мкл кДНК, пары праймеров (1,4 мМ), TaqMan-зонды FAM (0,3 мМ) или Syber Green I (Кат. №: R-402, Синтол, Россия). Последовательность использованных праймеров и зондов представлена в таблице 5. Реакционная смесь включала SnTaq-полимеразу (2,5 Е), 2,5 мМ хлорида магния, 0,25 мМ dNTPs.

Таблица 5 – Последовательность использованных праймеров и зондов

Название гена	Последовательность олигонуклеотидов 5'-3'
<i>Actb</i>	(forward) agagggaatcgtgctgac (reverse) caatagtgatgacctggccgt (probe) FAM-cactgccgcacacctctctccc-RTQ
<i>Nos2</i>	(forward) cagctgggctgtacaaacctt (reverse) cattggaagtgaagcgtttcg (probe) FAM- cgggcagcctgtgagaccttga -RTQ
<i>Tnf</i>	(forward) catcttctcaaaattcgagtgacaa (reverse) tgggagtagacaaggtacaacc (probe) FAM- cacgtcgtagcaaacaccagaagtga -RTQ
<i>Il10</i>	(forward) ggttgccaagccttatcgga (reverse) acctgctccactgccttgc (probe) FAM- tgaggcgctgctgcatcgattctccc -RTQ
<i>Tgfb1</i>	(forward) tgacgtcactggagttgacgg (reverse) ggttcattgtcatggatggtgc (probe) FAM-ttcagcgcctcactgctcttgacag-RTQ
<i>Arg1</i>	(forward) aaggtctctacatcacagaa (reverse) gaagcaagccaaggtaa
<i>Il1b</i>	(forward) caaccaacaagtgatattctccatg (reverse) gatccacactctccagctgca
<i>Il6</i>	(forward) ctgatgctggtgacaaccac (reverse) gccactcctctgtgactcc

Амплификацию осуществляли на термоциклере DTprime-4 (ДНК-технология, Россия) по программе: начальная денатурация с инактивацией антител к полимеразе 94°C (5 минут), последующее циклирование — 94°C (10 с), 62°C (20 с), 72°C (5 с) в течение 40 циклов. Детекция флуоресценции в канале FAM выполнялась автоматически на этапе отжига праймеров при 62°C каждого цикла. Значение экспрессии мРНК каждого исследованного гена вычисляли относительно референсного гена *Actb*, используя метод $\Delta\Delta C_p$ по формуле:

$$N = 2^{(C_p(\text{норм.гена}) - C_p(\text{иссл. гена}))}$$
; где $C_p(\text{норм. гена})$ – значение порогового цикла нормировочного гена, автоматически определяемое прибором, $C_p(\text{иссл. гена})$ – значение порогового цикла исследуемого гена, автоматически определяемое прибором.

2.15. Анализ антител, специфично связывающихся с антигенами карциномы 4Т1

Сывороточные антитела, связывающиеся с поверхностными и внутриклеточными антигенами клеток карциномы 4Т1, исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА). Использовали планшеты MaxiSorp (Кат. №: 442404, NUNC, США). В лунках планшета адсорбировали лизат клеточной линии 4Т1. Для этого в каждую лунку вносили 100 мкл лизата с концентрацией 5 мкг/мл, инкубировали в течение 12 часов при 4 °С. После блокировали раствором PBS с 4% БСА в лунки планшета вносили разведения исследуемых сывороток, инкубировали в течение 2 часов. Отмывали PBS с 0,05% полисорбата Твин-20 (англ. Tween-20), затем инкубировали с козьими антителами к тяжелым и легким цепям IgG мыши, конъюгированными с биотином (Кат. №: 103008, Bio-Rad, США). Опять отмывали PBS с 0,05% Tween-20 и инкубировали со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (Кат. №: 710005, Bio-Rad, США). Добавляли субстрат

пероксидазы хрена – ТМБ (Кат. №: HE111-01, TransGen, Китай) Реакцию останавливали раствором 0,05 М серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм.

Сывороточные антитела, специфичные к поверхностным антигенам клеток карциномы 4Т1, детектировали проточной цитометрией. Клетки линии 4Т1 инкубировали с различными разведениями сывороток от мышей контрольной и экспериментальной групп, начиная с 1:30, 30 минут при 4°C, трижды промывали раствором Хэнкса с 6% FBS, 2 мМ ЭДТА. Затем обрабатывали козьими антителами к мышинным IgG, мечеными Alexa Fluor-488 (Кат. №: A32723, Invitrogen, США) 30 минут при 4°C. Флуоресценцию анализировали на цитометре FACS Aria II.

2.16. Статистический анализ

Статистический анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения Graph-Pad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc., США). При первичной статистической обработке определяли среднее значение (M), дисперсию (s^2), медиану (Me), квартили (25; 75%), минимальные (min) и максимальные (max) значения в каждой выборке. Анализ характера распределений выявил ненормальное распределение данных во всех группах, поэтому для последующего статистического сопоставления применяли непараметрические тесты. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни. Для анализа различия между двумя связанными выборками применяли критерий Вилкоксона. Для анализа трех и более связанных групп использовали метод Фридмана, для трех и более несвязанных выборок применяли критерий Краскела-Уоллиса (непараметрический дисперсионный анализа) и тест Данна для множественных сравнений. Корреляцию между двумя группами определяли с помощью рангового теста Спирмена. Анализ выживаемости оценивали по

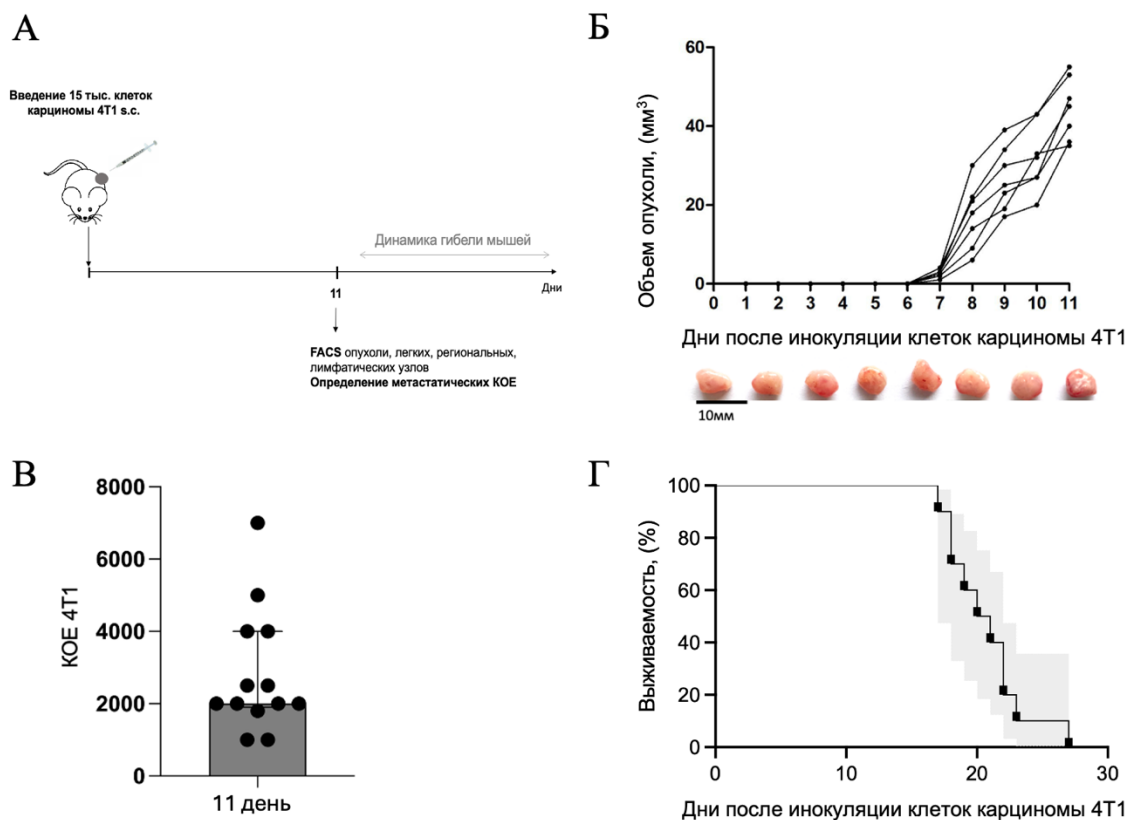
Каплан-Мейеру с использованием лог-рангового критерия. Различия между выборками при значениях $p < 0,05$ считались статистически значимыми. Данные представляли в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Характеристика экспериментальной модели солидной опухоли молочной железы у мышей BALB/c

В качестве экспериментальной модели метастатической карциномы была выбрана клеточная линия 4T1, полученная из агрессивного РМЖ мыши. Она характеризуется быстрым ростом, спонтанным метастазированием и адекватно воспроизводит различные аспекты прогрессии заболевания у человека, имитируя РМЖ 4 стадии [109, 131].

Для характеристики экспериментальной модели солидной опухоли подкожно вводили 15 тысяч клеток карциномы 4T1 молочной железы сингенным мышам линии BALB/c. У 100% мышей развивались солидные опухоли (рисунок 1 А, Б).



А – Схема экспериментальной модели карциномы 4T1; Б – динамика роста опухолей у индивидуальных мышей после подкожного введения 15 тысяч клеток карциномы 4T1 (N = 10); В – количество КОЕ, обнаруженное в легких мышей на 11-й день после

подкожного введения 15 тысяч клеток карциномы 4T1; Г – выживаемость животных после подкожной инокуляции 15 тысяч клеток карциномы 4T1 (N = 10). Серым цветом показана зона 95% доверительного интервала.

Рисунок 1 – Экспериментальная модель солидной опухоли молочной железы 4T1

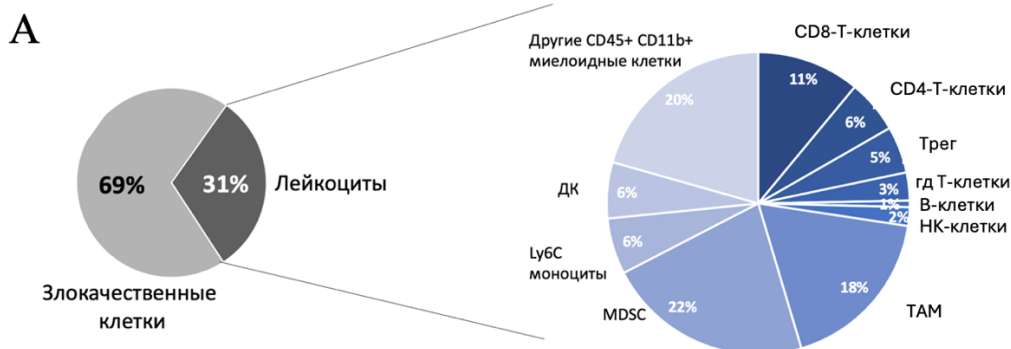
Солидная опухоль становилась заметной на 6–7 день, достигая линейных размеров 4–6 мм к 11 дню, далее прогрессивно росла до размеров 1 см и более. Уже через полторы недели после введения опухолевых клеток, несмотря на небольшой размер первичной опухоли, метастатические клетки в изобилии были распространены по организму. Причина метастатической болезни – ранняя диссеминация клеток карциномы 4T1 из первичного опухолевого узла. В частности, на 11-й день после подкожного введения клеток карциномы 4T1 была исследована ткань легкого для определения наличия и количества метастатических клеток опухоли. Методом лимитирующих разведений было определено, что в легких к этому сроку уже обнаруживается от 1 до 7 тысяч (в среднем 2 тысячи) метастатических КОЕ карциномы 4T1 (рисунок 1 В). Через 18–20 дней после инокуляции злокачественных клеток мыши с прогрессивно растущей карциномой 4T1 начинали погибать (рисунок 1 Г). Этот факт свидетельствует о том, что к 11-му дню после инокуляции метастатические клетки карциномы 4T1 уже распространились в отдаленные органы, где они дали рост множественных метастазов, что впоследствии и вызвало 100% гибель животных.

Модель карциномы 4T1 отличается выраженной аккумуляцией MDSC в периферической крови и тканях, преимущественно субпопуляций Ly6C⁺ (моноцитарные MDSC) и Ly6G⁺ (гранулоцитарные MDSC). На терминальных этапах патологии содержание миелоидных клеток супрессоров в крови достигает 60%, что служит диагностическим индикатором прогрессии [123]. В 4T1-опухоленосителях MDSC синтезируют растворимые иммуносупрессоры, включая MMPs, ответственные за инвазивный потенциал клеток 4T1 как *in vitro*, так и *in vivo*, и блокаду цитотоксических Т-клеточных реакций [25]. Дополнительные исследования демонстрируют, что цитокины, такие как

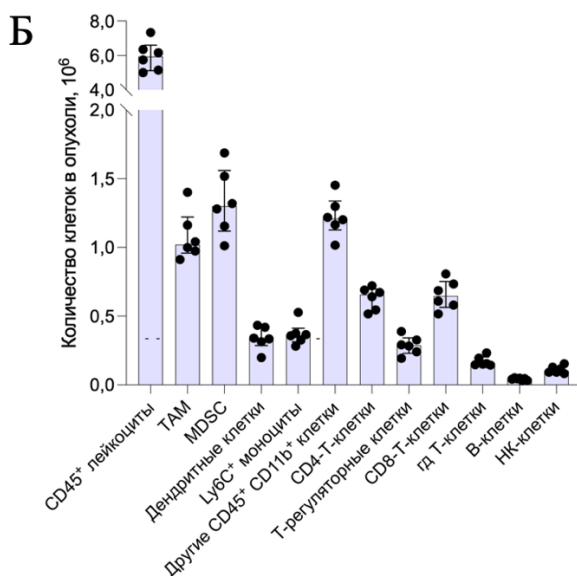
TGF- β , IL-6 и TNF- α , вырабатываемые MDSC, играют ключевую роль в процессе метастазирования [138].

Чтобы объективно охарактеризовать модель и иммуносупрессивный характер опухолевого микроокружения и метастатических ниш к 11-му дню исследовали клеточный состав опухоли, легочной ткани и региональных ЛУ методом проточной цитофлуориметрии.

Иммуносупрессивное микроокружение опухоли формируется под влиянием как злокачественных клеток, так и нормальных клеточных популяций, а также их секретируемых факторов. Ключевую роль в поддержании иммуносупрессии играют TAM, внутриопухолевые ДК и MDSC, рекрутируемые опухолевым процессом. На диаграмме представлено относительное содержание больших популяций миелоидных и лимфоидных клеток в иммунном инфильтрате опухоли 4T1 на 11-й день после подкожного введения 15 тысяч клеток линии 4T1 (рисунок 2). К этому дню клеток иммунного инфильтрата CD45⁺ лейкоцитов, было около 30%. Среди миелоидных клеток, прежде всего, определяли относительное содержание TAM (CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ I-A/I-E⁺), моноцитов (CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁻ Ly6G⁻ Ly6C⁺), MDSC (CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁻ CD11c⁻ Ly6G⁺ Ly6C^{low}) и ДК (CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁻ Ly6G⁻ Ly6C⁻ I-A/I-E⁺ CD11c⁺). В лимфоидной популяции определяли содержание CD4-Т-клеток (CD45⁺ CD11b⁻ CD3⁺ CD4⁺), CD8-Т-клеток (CD45⁺ CD11b⁻ CD3⁺ CD8⁺), Treg (CD45⁺ CD11b⁻ CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺), В-клеток (CD45⁺ CD11b⁻ CD3⁻ CD19⁺), и НК-клеток (CD45⁺ CD11b⁻ CD3⁻ CD19⁻ CD49b⁺) (рисунок 2 А, Б).



Клетки	Фенотип	Относительные значения в опухоли, Ме (Q1; Q3)
Миелоидные клетки	CD45 ⁺ CD11b ⁺	72,8 (69,5; 76,6)
ДК	CD45 ⁺ CD11b ⁺ F4/80 ⁺ Ly6G ⁺ Ly6C ⁺ I-A/I-E ⁺ CD11c ⁺	6,2 (4,7; 6,7)
TAM	CD45 ⁺ CD11b ⁺ F4/80 ⁺ I-A/I-E ⁺	18,2 (17,3; 18,9)
MDSC	CD45 ⁺ CD11b ⁺ F4/80 ⁺ CD11c ⁺ Ly6G ⁺	22,3 (21,1; 23,2)
Моноциты	CD45 ⁺ CD11b ⁺ F4/80 ⁺ Ly6G ⁺ Ly6C ⁺	6 (5,1; 7,5)
CD8-T-клетки	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	10,9 (10,3; 11,8)
CD4-T-клетки	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁺	6,5 (3,9; 7,7)
Треги	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	4,9 (4,1; 5,4)
гдТ-клетки	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁺ TCRgd ⁺	2,9 (2,5; 3,2)
В-клетки	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁺ CD49b ⁺ CD19 ⁺	0,7 (0,6; 0,9)
НК-клетки	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁺ CD19 ⁺ CD49b ⁺	1,9 (1,5; 2,3)



А – относительные значения и фенотипическая характеристика иммунных клеток в опухоли; Б - абсолютные значения иммунных клеток в опухоли.

Рисунок 2 – Клеточный состав опухоли на 11 день после введения опухолевых клеток карциномы 4Т1

Миелоидные клетки доминировали в составе иммунного инфильтрата опухоли, их суммарное содержание достигло 72% (69,5; 76,6) от всех CD45⁺ лейкоцитов в ткани опухоли (рисунок 2 А). F4/80⁺ TAM составили 18% (17,3; 18,9), Ly6C⁺ моноциты – 6% (5,1; 7,5), Ly6G⁺ MDSC – 22% (21,1; 23,2), а CD11c⁺ ДК – 6% (4,7; 6,7) от всех лейкоцитов, инфильтрирующих опухоль (рисунок 2 А). Хорошо известны иммуносупрессивные свойства опухолевых МФ, моноцитов, MDSC и ДК. Их большое количество характерно для

карциномы 4Т1. Напротив, инфильтрация лимфоидными клетками была незначительной. Содержание CD8-Т-клеток составило 11% (10,3; 11,8), CD4-Т-клеток – 6% (3,9; 7,7), среди которых доминировали Трег – 5% (4,1; 5,4), НК-клеток – 2% (1,5; 2,3), а В-клеток – 0,7% (0,6; 0,9) от всех лейкоцитов.

Также, был изучен клеточный состав ЛУ, дренирующей опухоль, ткани легких и проведено сравнение с наивными здоровыми мышами для определения влияния опухолевого процесса на органы-мишени метастазирования. На рисунке 3 представлен клеточный состав дренирующей опухоль ЛУ.

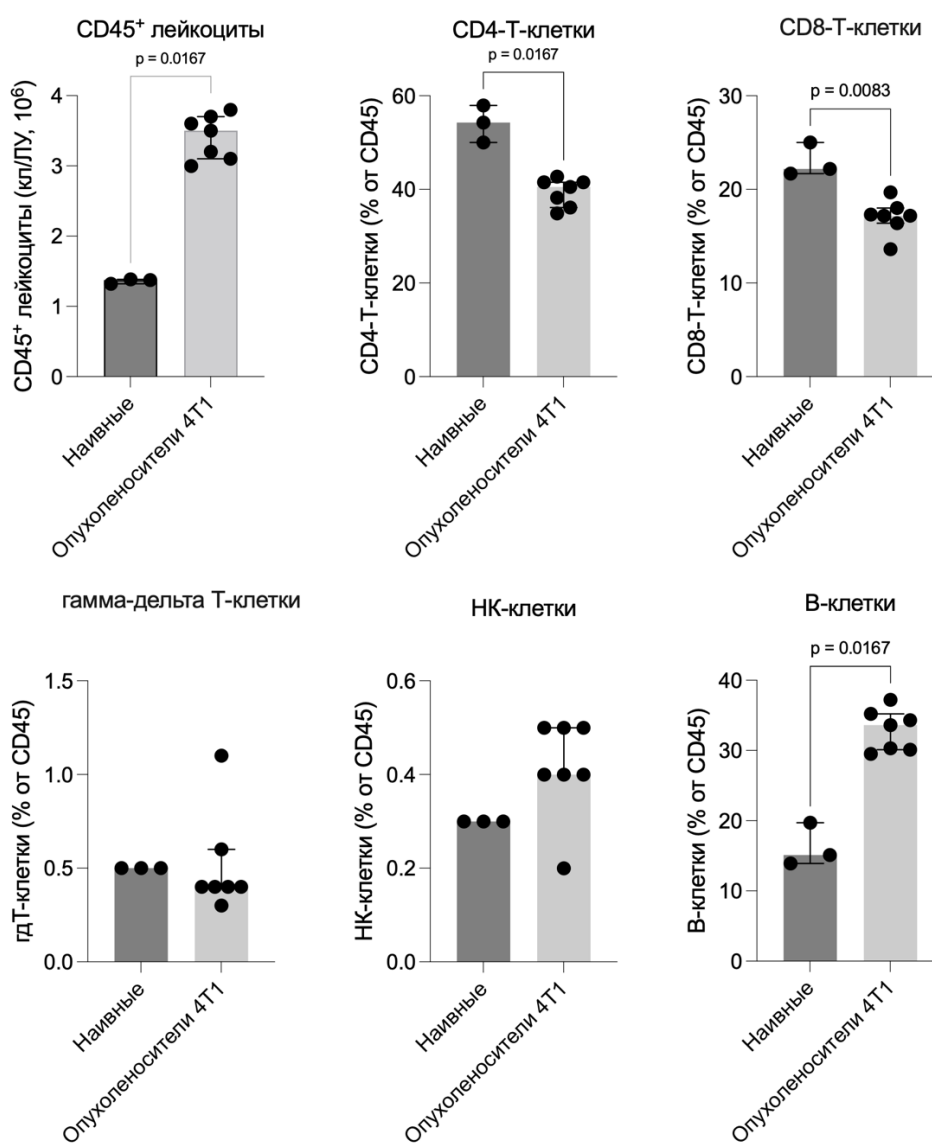


Рисунок 3 – Содержание различных типов лимфоидных клеток в дренирующей опухоль ЛУ у мышей с карциномой 4Т1 (n=7) по сравнению с наивными здоровыми мышами (n=3)

Общее количество $CD45^+$ лейкоцитов в среднем увеличилось в 3 раза. При исследовании фенотипа Т-клеток наблюдалось снижение количества $CD4^-$ и $CD8^-$ Т-лимфоцитов в среднем в 1,5 раза в расчете на ЛУ. Примечательно, что под влиянием роста солидной опухоли происходила инфильтрация В-клетками. Содержание гамма-дельта Т-клеток и НК-клеток не изменилось по сравнению с наивными здоровыми мышами.

В результате роста карциномы 4Т1 количество $CD45^+$ лейкоцитов, инфильтрирующих ткань легких, возрастало в среднем в 3 раза (рисунок 4).

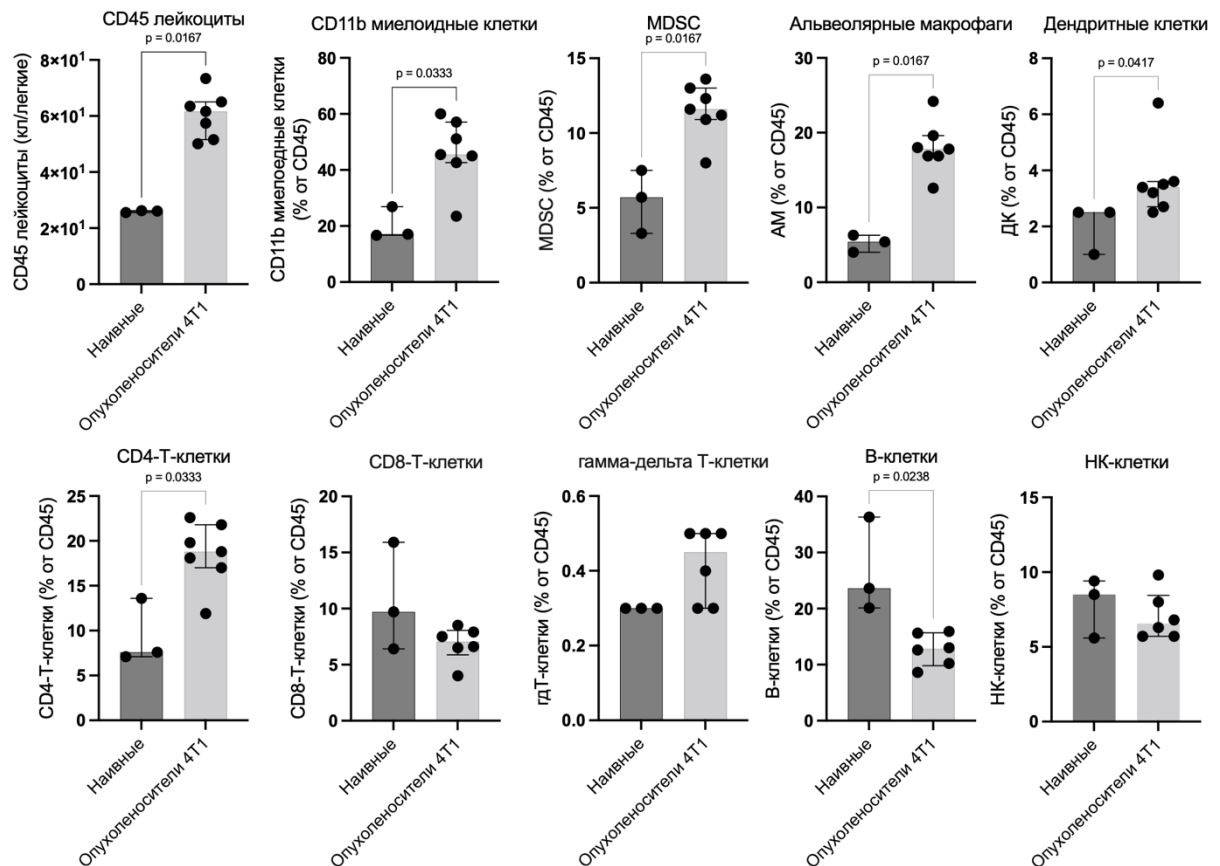


Рисунок 4 – Содержание различных типов лимфоидных и миелоидных клеток в ткани легких у мышей с карциномой 4Т1 (n=7) по сравнению с наивными здоровыми мышами (n=3)

Большая часть вновь пришедших клеток была представлена $CD11b^+$ миелоидными клетками, среди которых доминировали $CD11b^+ F4/80^+$ МФ. Происходила инфильтрация $Ly6G^+ Ly6C^{low}$ MDSC, содержание этих клеток увеличивалось в 2 раза, достигая 12% от всех лейкоцитов в ткани легких. Очевидным было и нарастание содержания $CD11c^+$ ДК. Интересно, что

карцинома 4Т1 увеличивала содержание CD4-Т-клеток, возможно, большая часть из которых была представлена Трег. Но их содержание не анализировалось.

Таким образом, экспериментальная модель карциномы молочной железы 4Т1 характеризуется прогрессивным и быстрым ростом солидной опухоли, агрессивным метастазированием, 100% летальностью и преобладанием миелоидных клеток-супрессоров в опухолевой ткани и метастатических нишах. Важно отметить, что в модели карциномы 4Т1 иммуносупрессивное окружение доминирует как в самой опухоли, так и во всем организме. В этих условиях любая иммунотерапия сталкивается с проблемой преодоления такой мощной иммуносупрессии, которая защищает быстро растущую и очень активно метастазирующую опухоль.

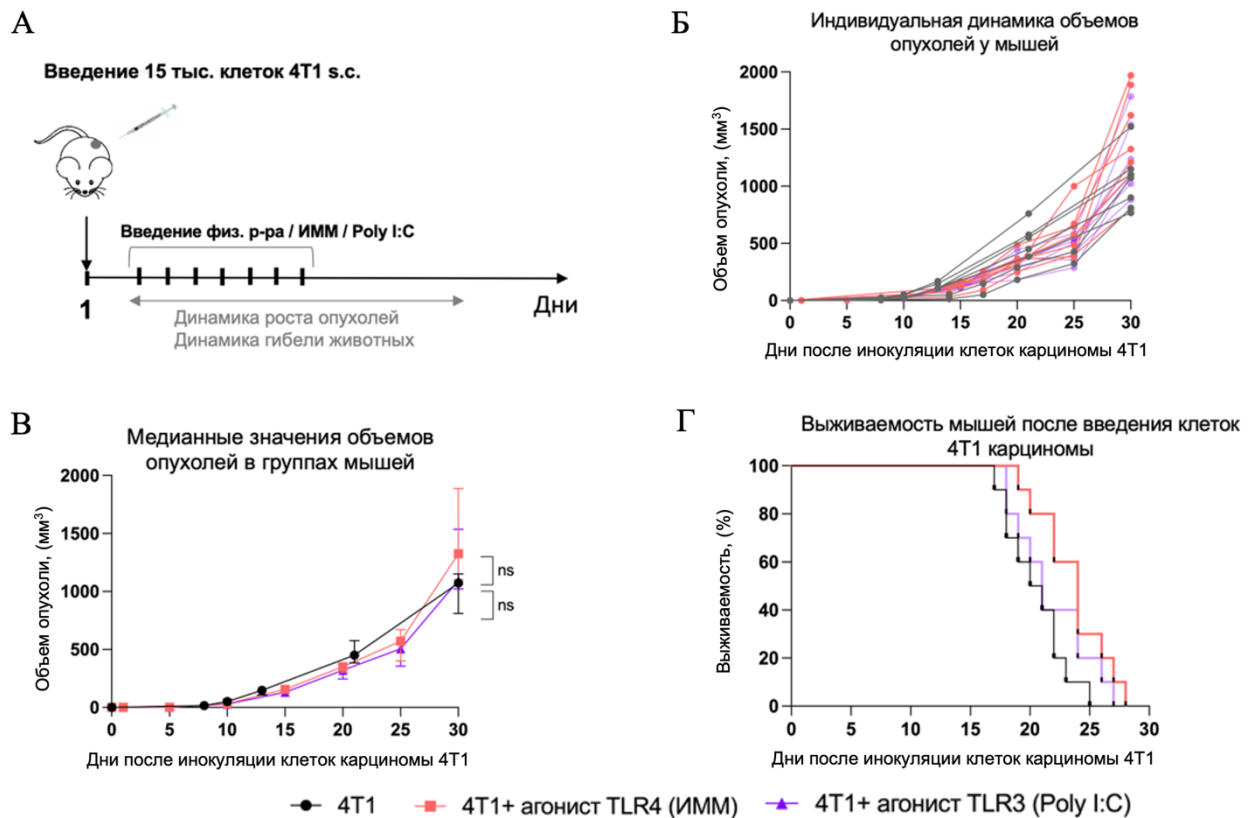
3.2. Исследование влияния агонистов TLR3 и TLR4 на рост 4Т1 карциномы *in vivo*

В качестве агониста TLR3 использовали полирибозиновою кислоту – Poly I:C – синтетический комплекс дцРНК. Известно, что он непосредственно активирует ДК, а также запускает НК-клетки для уничтожения опухолевых клеток. Помимо распознавания эндосомным TLR3 [39, 164] он индуцирует усиление экспрессии ИФН I типа, и активирует несколько ядерных и цитоплазматических ферментных систем (олигоденилатсинтазу OAS, дцРНК-зависимую протеинкиназу, RIG I хеликазу и MDA5), которые участвуют в противовирусных и противоопухолевых защитных реакциях [92].

В качестве агониста TLR4 использовали растительный кислый пептидогликан – ИММ. Кислый пептидогликан, выделенный из растительного сырья, имеет молекулярную массу более 1 млн Да, оказывает прямое активирующее действие на ДК и МФ [8]. ИММ действует на клетки через рецептор TLR4, что было доказано с использованием специальных

клеточных линий НЕК-Blue (Invivogen, США), экспрессирующих только один из рецепторов: TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 или TLR9 [153]. Сами препараты не оказывали значительного влияния на жизнеспособность и рост опухолевой линии 4Т1 [8, 30].

Для проверки гипотезы о возможном влиянии агонистов TLR на рост опухоли, мышам BALB/с подкожно вводили 15 тысяч клеток карциномы 4Т1 для инициации роста солидной опухоли. Через 3 дня после инокуляции начинали курс внутрибрюшинных инъекций ИММ в дозе 14 мкг, что соответствовало оптимальной иммуностимулирующей дозе ИММ для мышей [7] или инъекций Poly I:C в дозе 3 мкг на мыш. Инъекции ИММ и Poly I:C повторяли каждые 4–5 дней, общим числом 7 введений (рисунок 5 А).



А – экспериментальная схема; Б – динамика роста опухолей у индивидуальных мышей после подкожного введения 15 тысяч клеток карциномы 4Т1 в контрольной группе мышей (серые кривые, n=7), в группе, получившей терапию агонистом TLR4 ИММ (розовые кривые, n=7), в группе, получившей терапию агонистом TLR3 Poly I:C (фиолетовые кривые, n=7); В – медианные значения объемов опухолей в группах мышей; Г - выживаемость животных после подкожного введения 15 тысяч клеток карциномы 4Т1 без терапии, с последующей терапией агонистом TLR4 ИММ или с последующей терапией агонистом TLR3 Poly I:C.

Рисунок 5 – Влияние экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR3 и TLR4 на рост карциномы 4Т1

Полученные результаты свидетельствуют о том, что инъекционное введение агониста TLR4 ИММ в дозе 14 мкг или агониста TLR3 Poly I:C в дозе 3 мкг на мышь не влияет на скорость роста солидных опухолей 4T1 (рисунок 5 Б, В). Несмотря на регулярные внутрибрюшинные инъекции агонистов TLR (ИММ и Poly I:C) опухоли возникали у 100% мышей. Скорость роста опухолей в группах, получавшей инъекции агониста TLR4 или агониста TLR3, не отличалась от скорости роста опухолей в контрольной группе, получавшей инъекции физиологического раствора. А также, терапия агонистом TLR4 и агонистом TLR3 не оказывала влияния на выживаемость мышей (рисунок 5 Г).

3.3. Исследование эффективности хирургического вмешательства путем резекции солидной карциномы 4T1

Как указано выше, карцинома 4T1 молочной железы очень агрессивна, мыши погибали достаточно быстро, к 25–35 дню после введения 15 тысяч опухолевых клеток. В клинической практике принято удалять злокачественные новообразования, чтобы снизить опухолевую нагрузку на организм. Первичная опухоль не только содержит основную массу злокачественных клеток, которые, в свою очередь, разгоняют иммуносупрессию, но и является источником непрерывно выстреливающих метастатических клеток. Поэтому далее исследовали влияние хирургической резекции первичного опухолевого узла на выживаемость мышей (рисунок 6). Мышам подкожно вводили 15 тысяч клеток карциномы 4T1 и на 11-й день выполняли хирургическую резекцию солидной опухоли.

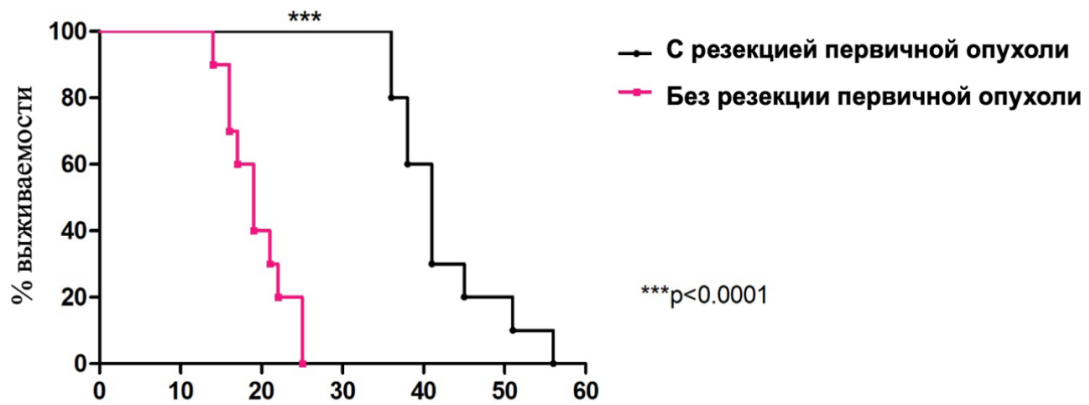


Рисунок 6 – Выживаемость животных после подкожного введения 15 тысяч опухолевых клеток 4Т1 с последующей резекцией первичной опухоли на 11-й день (n=10) или без резекции (n=10)

Сама по себе резекция первичной опухоли 4Т1 не снижала летальность, но увеличивала продолжительность жизни мышей более, чем в 2 раза. На рисунке 6 представлена кривая гибели мышей после хирургической резекции опухоли (4–6 мм) на 11-й день после инокуляции 15 тысяч клеток карциномы 4Т1. Резекция солидной опухоли статистически значимо ($p=0,0001$) увеличивала медиану выживаемости мышей с 18 до 40 дней. Таким образом, сроки жизни мышей были на 25–30 дней больше по сравнению с животными, которым резекцию первичной опухоли не делали.

Несмотря на увеличение продолжительности жизни мышей и отсутствия в месте резекции рецидивов, наблюдается 100% гибель животных. Это означает, что после хирургического удаления первичной опухоли все без исключения мыши погибали от множественных метастазов в легкие, ЛУ, селезенку и другие органы. Вероятной причиной развития метастатической болезни являлась ранняя диссеминация клеток карциномы 4Т1 из первичного опухолевого узла. Уже к моменту резекции, метастатические клетки в изобилии были диссеминированы по организму. Для того, чтобы подтвердить предположение о том, что мыши гибнут от множественных метастазов, методом лимитирующих разведений определили, что в селезенке, региональном ЛУ и легких к 45-му дню после введения опухолевых клеток и резекции первичной опухоли, к моменту гибели, обнаруживается более 15000,

60 и 250000 метастатических КОЕ карциномы 4Т1, соответственно (рисунок 7).

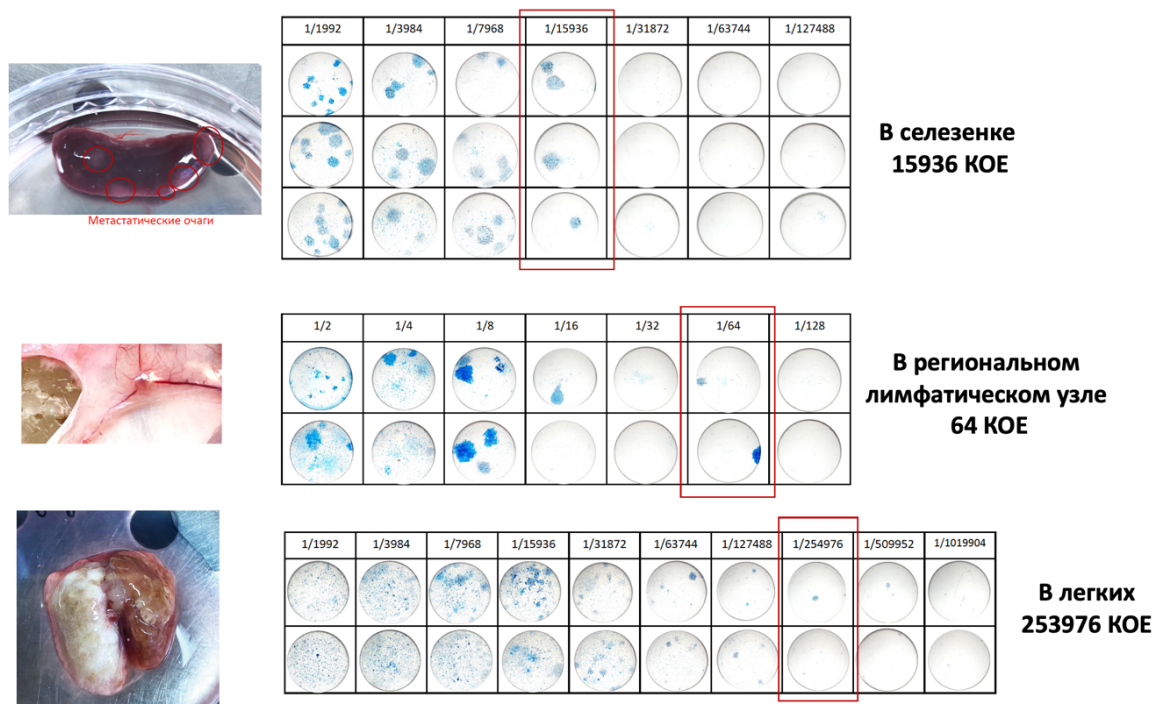


Рисунок 7 – Фотографии репрезентативных лунок по определению содержания количества КОЕ в селезенке, региональном ЛУ и легких мышей к 45-му дню после введения 15 тысяч клеток карциномы 4Т1 и резекции первичного опухолевого узла

Этот факт свидетельствует о том, что на 11-й день после введения опухолевых клеток, в момент резекции первичной опухоли, метастатические клетки карциномы 4Т1 уже распространились в отдаленные органы, где они дали рост множественных метастазов, что и вызвало 100% гибель животных.

Удаление первичной опухоли – это лишь временное облегчение в результате уменьшения опухолевой нагрузки, исходящей от опухоли иммуносупрессии, а также снижение скорости метастазирования. Все вместе создает «окно возможностей» – временное облегчение ситуации, когда можно попытаться воздействовать на иммунную систему с целью оказать противоопухолевое воздействие.

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

3.4.1. Влияние применения экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции первичной опухоли на выживаемость животных

Выполнение хирургической резекции первичной опухоли увеличило выживаемость мышей в среднем на 1 месяц. Однако резекция опухоли 4T1 сама по себе не предотвращала прогрессирование метастатического процесса. В связи с этим в дальнейшем исследовали эффективность комбинированного подхода — иммунотерапии агонистами TLR после хирургической резекции первичной опухоли.

Для этого мышам подкожно вводили 15 тысяч клеток карциномы 4T1. На 11-й день первичные опухоли удаляли хирургически. Резецированные опухоли были идентичными по размеру и массе, которая варьировалась от 9 до 16 мг (рисунок 8).

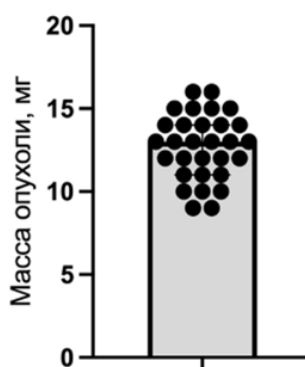


Рисунок 8 – Масса опухолей мышей на 11-й день после подкожного введения 15 тысяч клеток карциномы 4T1

Мыши рандомизировано распределялись по экспериментальным группам. Со следующего дня после хирургической резекции первичной опухоли, проводили экспериментальную иммунотерапию

перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR по схеме представленной на рисунке 9, в трех вариантах: 1) лечение агонистом TLR3 (Poly I:C); 2) лечение агонистом TLR4 (ИММ); 3) комбинированное лечение двумя агонистами TLR3 и TLR4 (TLR3+TLR4 или IMM+Poly I:C). Животным контрольной группы вводили физиологический раствор в те же сроки, что и агонисты TLR. Инъекции повторяли каждые 4–5 дней. Курс иммунотерапии состоял из 7 инъекций. В процессе терапии и после ее окончания проводили мониторинг выживаемости экспериментальных мышей (рисунок 9).

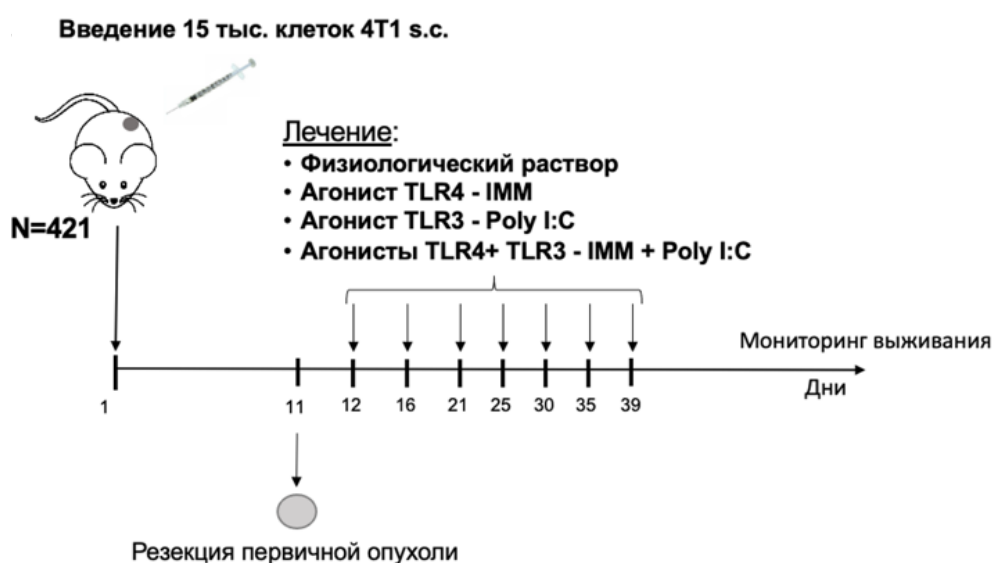


Рисунок 9 – Дизайн эксперимента по иммунотерапии карциномы 4Т1 путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR

В контрольной группе мышей, получавшей инъекции физиологического раствора, гибель животных началась на 22-й день эксперимента, а завершилась на 61-й день, когда погибла последняя особь. Медиана продолжительности жизни мышей в контрольной группе составила 50 дней (рисунок 10).

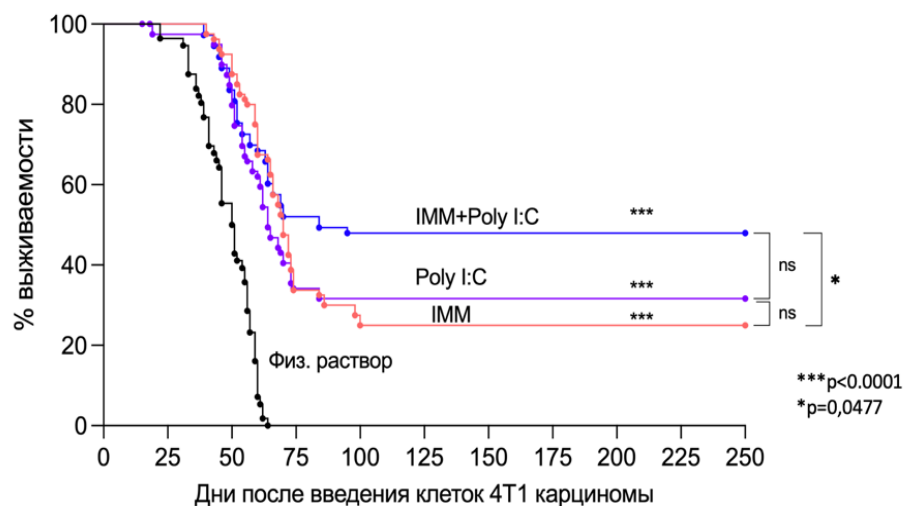


Рисунок 10 – Суммарные результаты 5-ти независимых экспериментов по динамике выживаемости мышей после резекции первичной карциномы 4Т1 и последующего курса инъекций агонистов TLR. Общее количество мышей N= 421

В группе мышей, получавших иммунотерапию агонистом TLR4 (IMM), гибель животных происходила позже, чем в контрольной группе. Продолжительность жизни мышей в этой группе увеличилась в среднем на 10 дней. Важно, что 25% мышей, леченых агонистом TLR4, выжили и оставались без каких-либо признаков заболевания в течение 250 дней наблюдения (рисунок 10). Эти животные обоснованно отнесены к *complete responders*, то есть полностью излечившимся от метастатической болезни («ответчики» на иммунотерапию).

В группе мышей, получавших иммунотерапию агонистом TLR3 (Poly I:C), динамика гибели была такой же, как в группе леченых агонистом TLR4. При этом продолжительность жизни увеличилась в среднем на 4 дня. Полностью излечившихся (*complete responders*) при лечении агонистом TLR3 оказалось 32% мышей (рисунок 10).

При комбинированной иммунотерапии двумя агонистами TLR4 и TLR3 (IMM+Poly I:C) динамика гибели мышей была самой медленной: продолжительность жизни увеличилась в среднем на 45 дней. Полностью излечившихся оказалось 50% мышей (рисунок 10).

Различия в выживаемости мышей, леченых агонистами TLR, от выживаемости мышей контрольной группы, получавших инъекции физиологического раствора, были статистически значимыми. Между группами, в которых использовали агонист TLR4 или агонист TLR3, различия были статистически не значимыми. Терапевтическая эффективность иммунотерапии двух агонистов (TLR4+TLR3) была статистически значимо выше эффективности монотерапии одиночным агонистом TLR4. Синергическое сочетание агонистов TLR3+TLR4 имеет значительные преимущества по сравнению с отдельными агонистами. Результаты подтверждались в 5-ти независимых экспериментах (рисунок 11).

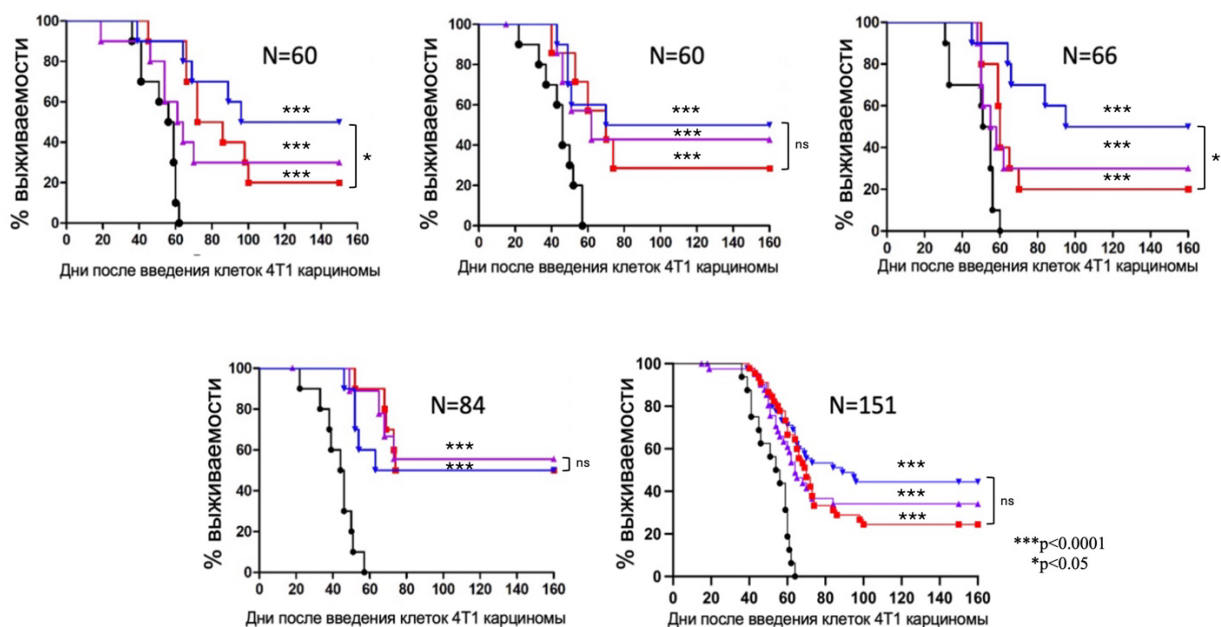


Рисунок 11 – Результаты 5-ти независимых экспериментов по динамике гибели мышей после резекции первичной опухоли карциномы 4Т1 и последующего курса инъекций физиологического раствора (кривая черного цвета) или иммунотерапии агонистом TLR3 Poly I:C (кривая фиолетового цвета), агонистом TLR4 IMM (кривая красного цвета), комбинации агонистов TLR4+TLR3 (кривая синего цвета). N – общее количество мышей, участвующих в эксперименте

У всех *complete responders* рецидивы опухоли не возникали. Мыши выглядели вполне здоровыми в течение 250 дней после начала лечения. Такой длительный период наблюдения составляет примерно 2/3 продолжительности жизни мышей BALB/c, что позволяет заключить, что у 25–50% животных предпринятая экспериментальная терапия путем перепрограммирования

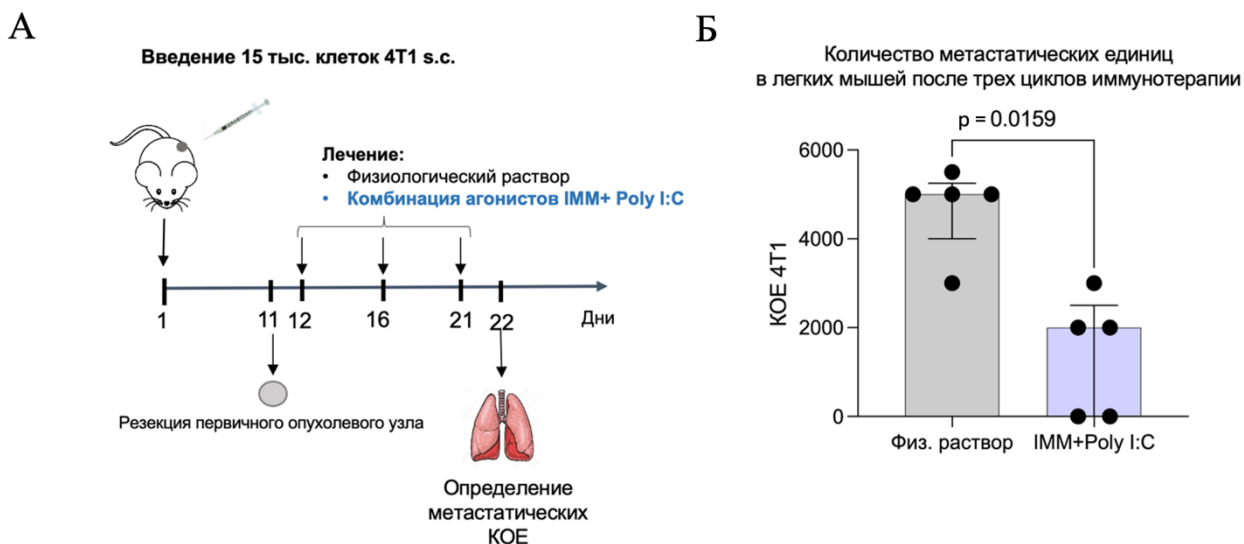
миелоидных клеток агонистами TLR позволила достичь полного излечения от метастатической карциномы 4T1. У остальных 50–75% животных рецидивы возникали, и метастатическая болезнь развивалась, но существенно медленнее, чем у мышей с резекцией первичной опухоли без последующей терапии агонистами TLR3 и TLR4.

Полученные результаты свидетельствуют об эффективности комбинированного 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.

3.4.2. Влияние иммунотерапии агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции первичной опухоли на процесс метастазирования карциномы 4T1 в ткани легких

С целью изучения механизмов действия агонистов TLR на процесс метастазирования карциномы 4T1 в ткани легких исследовали наличие и количество метастатических КОЕ.

Резекцию первичной опухоли проводили на 11-й день после подкожного введения 15 тысяч клеток 4T1. После резекции мышам делали внутрибрюшинные инъекции IMM (14 мкг) + Poly I:C (3 мкг), всего 3 инъекции в 12-й, 16-й и 21-й дни. Контрольная группа мышей в те же сроки получала внутрибрюшинные инъекции физиологического раствора. На 22-й день животных выводили из эксперимента. Извлекали легкие, из ткани которых готовили суспензию клеток. В полученной суспензии методом лимитирующих разведений в культуре клеток *in vitro* определяли содержание метастатических опухолевых КОЕ (рисунок 12).



А – схема иммунотерапии; Б – количество КОЕ в легких на 22 день после 3-х инъекций физиологического раствора в контрольной группе или комбинации двух агонистов IMM+Poly I:C в экспериментальной группе.

Рисунок 12 – Влияние экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR на процесс метастазирования карциномы 4Т1

После 3-х инъекций комбинации агонистов TLR4 и TLR3 у 4 из 5 мышей статистически значимо снизилось содержание метастатических КОЕ в легких, по сравнению с содержанием метастатических КОЕ в легких мышей контрольной группы, получивших 3 инъекции физиологического раствора ($p = 0,0159$). У 2 из 5 мышей после лечения агонистами TLR в легких вообще не было обнаружено метастатических КОЕ (рисунок 12 Б). Это вполне согласуется с процентом ответчиков на иммунотерапию, *complete responders*, по выживаемости мышей в экспериментах, представленных выше (рисунок 10).

Таким образом, было доказано, что перепрограммирование миелоидных клеток агонистами TLR после хирургической резекции опухоли приводит к уменьшению метастатических единиц в легких, а в некоторых случаях к полному избавлению от метастатической болезни.

3.5. Исследование механизмов раннего иммунного ответа у животных в процессе проведения иммунотерапии после хирургического вмешательства

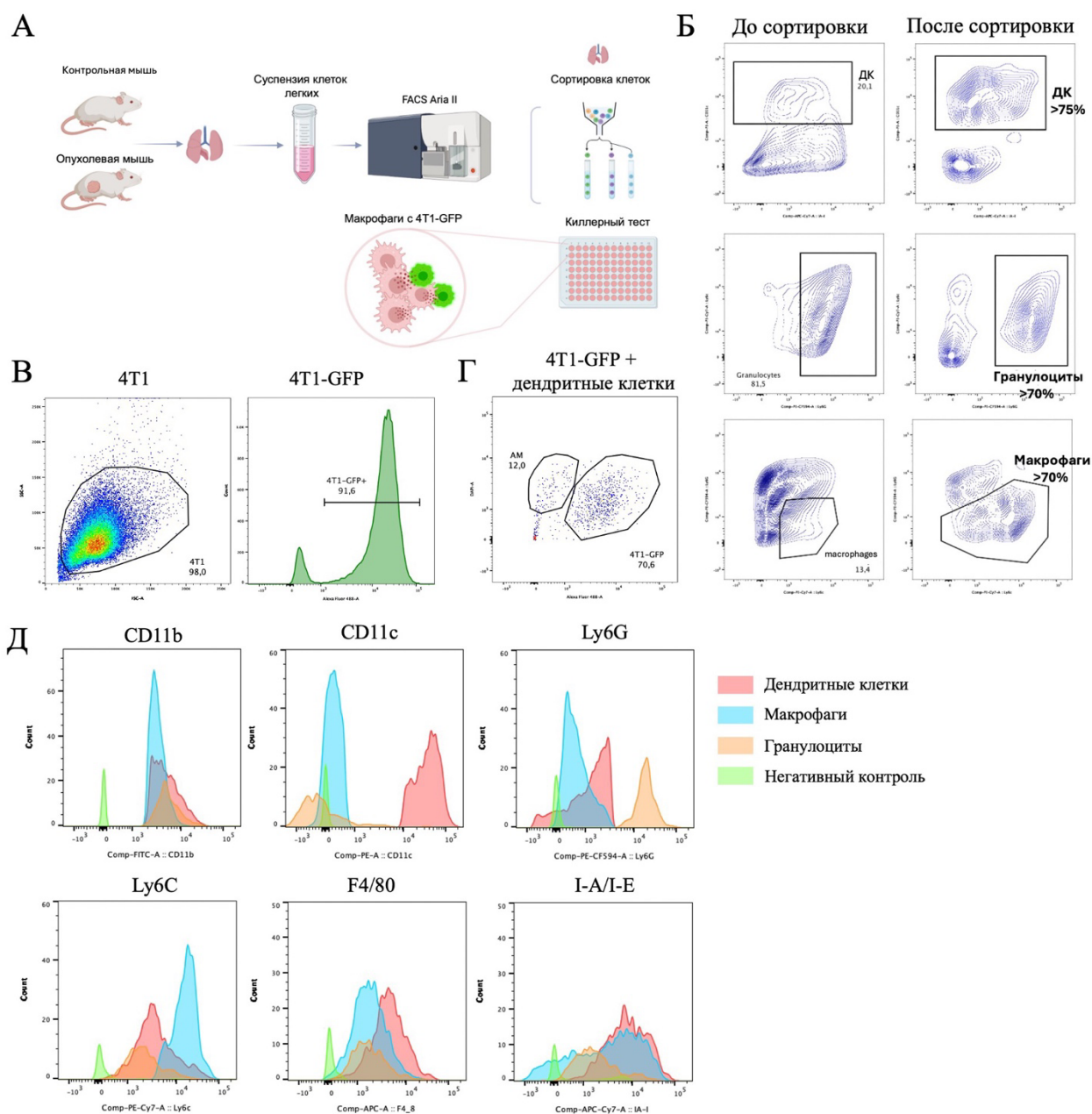
3.5.1. Исследование противоопухолевой активности миелоидных клеток *in situ*

Каковы же механизмы терапевтического эффекта агонистов TLR при метастатической болезни 4T1? Полное излечение 25–50% животных от метастатической болезни могло быть связано с цитотоксическим эффектом тканевого микроокружения на единичные КОЕ карциномы 4T1, распространившиеся по организму еще до резекции первичной опухоли. Несколько тысяч метастатических КОЕ, выявленных в ткани легких на 11-й день после подкожной инокуляции 15 тысяч клеток карциномы 4T1, могли погибнуть и не дать развиваться метастатической болезни в результате цитотоксического действия клеток микроокружения, индуцированных противоопухолевым действием агонистов TLR.

Ранее было показано, что агонисты TLR4 и TLR3 индуцируют транскрипционное перепрограммирование МФ и ДК в противоопухолевое состояние *in vitro* [4, 5, 8, 10, 12, 17, 19, 20, 30]. TLR4-активированные МФ и ДК оказывали выраженный цитотоксический эффект на клетки различных опухолевых линий [30]. Поэтому была выдвинута гипотеза, что подобная активация миелоидных клеток в тканях, куда попали метастатические КОЕ, может приводить к эффективной элиминации злокачественных клеток *in situ*, предотвращая рост метастатических опухолей во множестве отдаленных органов и тканей.

Для подтверждения гипотезы о цитотоксической активности миелоидных клеток из наивных здоровых и мышей-опухоленосителей извлекали легкие, один из основных органов-мишеней метастазирования

карциномы 4Т1 (рисунок 13 А). Известно, что в легочной ткани мышей преобладают множество миелоидных клеток, различающиеся своими фенотипическими характеристиками и функциями. Например, одними из ключевых клеточных типов являются альвеолярные МФ, гранулоциты/MDSC, интерстициальные МФ, ДК. Поэтому из ткани лёгких мышей выделяли очищенные популяции ДК, МФ и гранулоцитов методом сортировки на проточном флуориметре-сортировщике (рисунок 13 Б). Для подтверждения их фенотипических характеристик использовали панель антител против различных поверхностных маркеров, специфичных для миелоидных клеток (рисунок 13 Д). Согласно Vagaev A. et al. $CD45^+ CD11c^+ F4/80^+ Ly6C^- Ly6G^- I-A/I-E^+$ клетки представляют собой ДК, $CD45^+ CD11b^+ CD11c^- F4/80^+ Ly6C^+ Ly6G^- I-A/I-E^+$ – МФ [30], $CD45^+ CD11b^+ CD11c^- F4/80^- Ly6C^- Ly6G^+ I-A/I-E^-$ – гранулоциты [75]. Эти данные подтверждены и в текущем исследовании (рисунок 13 Д). Противоопухолевые свойства выделенных клеточных популяций оценивали в цитотоксическом тесте. Для анализа активности тканевые МФ и ДК помещали в лунки планшета с 200 опухолевыми клетками карциномы 4Т1-GFP, экспрессирующую зеленый флуоресцентный белок (рисунок 13 В, Г). В часть культур вносили IMM (10 мкг/мл), Poly I:C (5мкг/мл) или комбинацию двух агонистов IMM+Poly I:C для активации их цитотоксических свойств.



А – схема эксперимента, $n=8$; Б – стратегия сортировки $CD11b^+$ миелоидных клеток и степени очистки отсортированных популяций из ткани легких мышей: ДК, гранулоциты, МФ. Степень очистки популяций составляла 75%, 70%, 70%, соответственно;

В – репрезентативные цитометрические изображения гейтирования живых 4T1-GFP; Г – репрезентативное цитометрическое изображение совместной культуры ДК и клеток 4T1-GFP; Д – фенотипическая характеристика трех типов миелоидных клеток, отсортированных из ткани легких мышей, по распределению поверхностных маркеров.

Рисунок 13 – Фенотипическая характеристика миелоидных клеток, сортированных из ткани легких мышей

На рисунке 14 представлены данные о противоопухолевом действии TLR-активированных $CD11c^+$ ДК в отношении клеток карциномы 4T1-GFP.

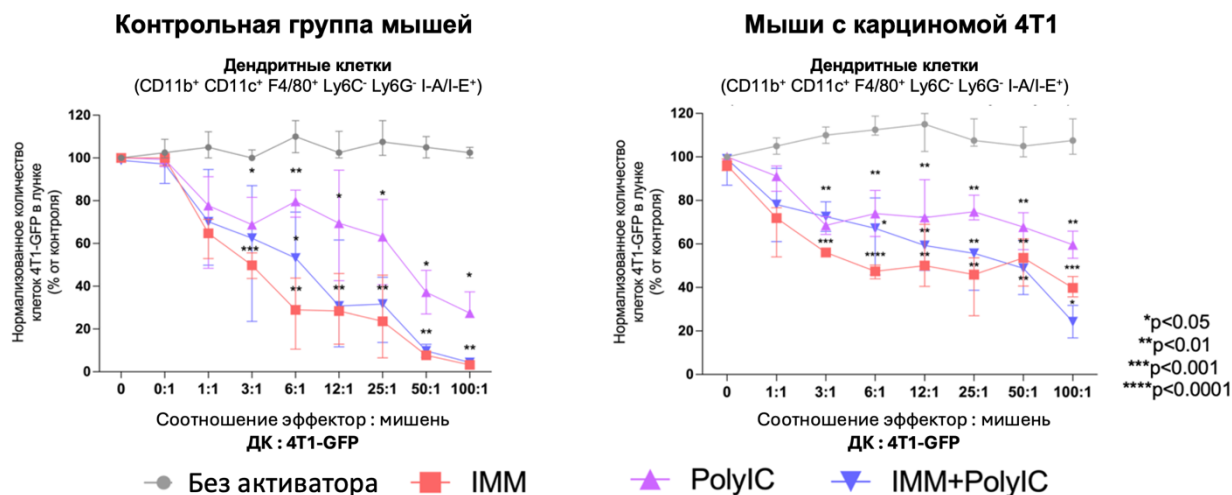


Рисунок 14 – Цитотоксическое действие *in vitro* TLR-активированных ДК, выделенных из ткани легких мышей контрольной группы и мышей с карциномой 4Т1, на клетки карциномы 4Т1-GFP

Совместное культивирование клеток 4Т1-GFP с ДК в присутствии как отдельных агонистов TLR (IMM или Poly I:C), так и в их комбинации приводило к сильному ингибированию жизнеспособности и роста клеток карциномы 4Т1-GFP. ДК, выделенные из ткани легких мышей контрольной группы, были активированы агонистами TLR сильнее, чем ДК, выделенные из ткани легких опухолевых мышей. Контрольная группа мышей – мыши того же возраста и пола, что мыши с карциномой 4Т1. Противоопухолевая активность ДК прямо зависела от соотношения эффекторов и мишеней. Уже начиная с отношения 3:1 наблюдался значительный противоопухолевый эффект, вплоть до полной ликвидации карциномы 4Т1. ДК, выделенные из легочной ткани мышей с карциномой 4Т1, под влиянием TLR агонистов, были способны подавлять рост опухолевых клеток карциномы 4Т1 на 60%.

Аналогично ДК, совместное культивирование опухолевых клеток 4Т1-GFP с тканевыми F4/80⁺ МФ в присутствии агонистов TLR3 или TLR4, а также их комбинации, вызывало выраженное подавление жизнеспособности и пролиферации злокачественных клеток 4Т1-GFP (рисунок 15).

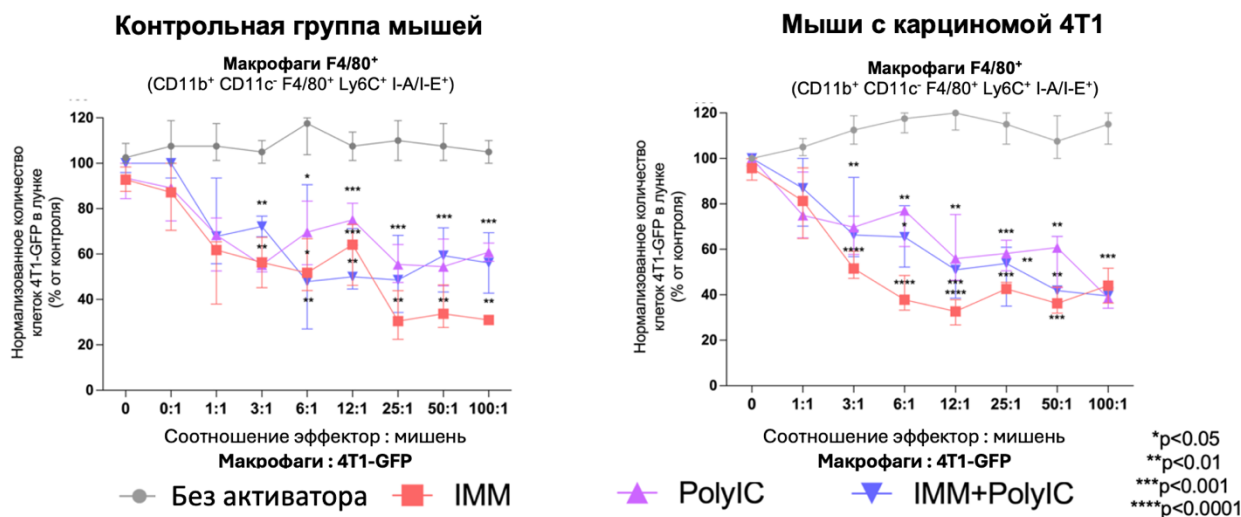


Рисунок 15 – Цитотоксическое действие TLR-активированных F4/80⁺ МФ, выделенных из ткани легких мышей контрольной группы и мышей с карциномой 4T1, на клетки карциномы 4T1-GFP

МФ, выделенные из ткани легких наивных здоровых мышей контрольной группы, показывали противоопухолевую активность уже начиная с соотношения 3:1. Контрольная группа мышей – мыши того же возраста и пола, что мыши с карциномой 4T1. Тканевые МФ подавляли рост опухолевых клеток на 40%. При дальнейшем увеличении количества эффекторов, максимальным противоопухолевый эффект достигался в среднем в 50% (рисунок 15).

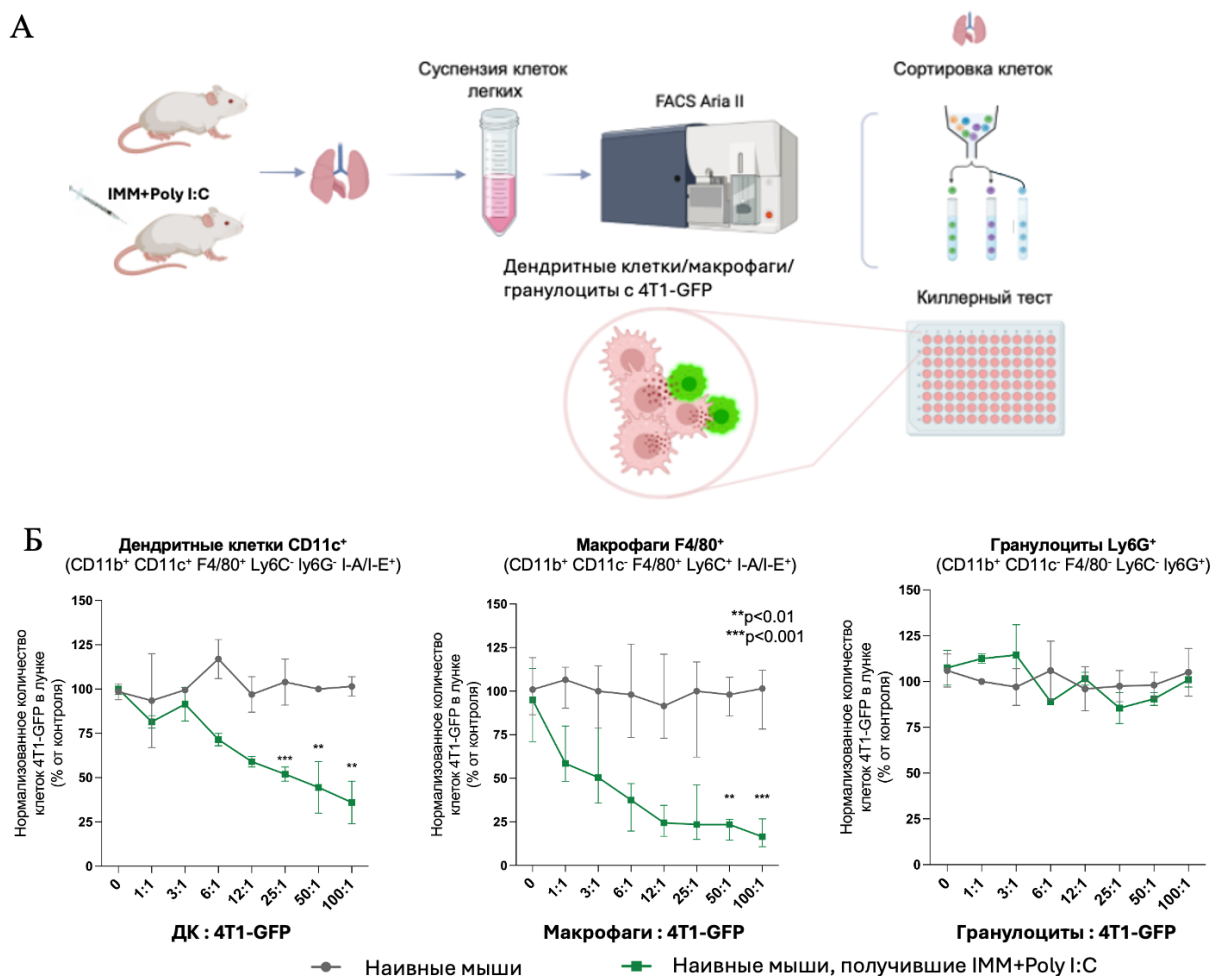
МФ, выделенные из ткани легких мышей с карциномой 4T1, под действием TLR агонистов показывали схожую противоопухолевую активность в отношении клеток карциномы 4T1-GFP. Они также начинали ингибировать рост опухолевых клеток, начиная с соотношения 3:1. При наибольшей концентрации эффекторов максимальный противоопухолевый эффект в 60% достигался при стимулировании МФ всеми вариантами агонистов: IMM, Poly I:C, IMM+Poly I:C (рисунок 15). Результаты были подтверждены в 4-х независимых экспериментах.

Таким образом, установлено, что в *in vitro* модели совместное культивирование клеток карциномы 4T1-GFP с TLR-активированными CD11c⁺ ДК или F4/80⁺ МФ обеспечивает выраженное подавление жизнеспособности и пролиферации опухолевых клеток 4T1 (рисунок 14, 15).

Следующим этапом явилась оценка противоопухолевого эффекта при перепрограммировании миелоидных клеток агонистами TLR в *in vivo* модели.

Для этого выделяли легкие из наивных здоровых мышей, а также из наивных мышей, которым за 120 минут до забоя вводили внутривенно комбинацию агонистов IMM+Poly I:C. Затем выделяли очищенные популяции ДК CD45⁺ CD11c⁺ F4/80⁺ Ly6C⁻ Ly6G⁻ I-A/I-E⁺, МФ CD45⁺ CD11b⁺ CD11c⁻ F4/80⁺ Ly6C⁺ Ly6G⁻ I-A/I-E⁺, гранулоцитов CD45⁺ CD11b⁺ CD11c⁻ F4/80⁻ Ly6C⁻ Ly6G⁺ I-A/I-E⁻ методом сортировки на проточном флуориметре-сортировщике. Противоопухолевые свойства выделенных клеточных популяций оценивали в цитотоксическом тесте, как было описано выше.

На рисунке 16 представлены данные цитотоксического действия TLR-активированных CD11c⁺ ДК, F4/80⁺ МФ, Ly6G⁺ гранулоцитов, выделенных из ткани легких наивных здоровых мышей и наивных мышей, которым за 120 минут до забоя ввели IMM+Poly I:C в отношении клеток карциномы 4T1-GFP.



А – схема эксперимента; Б – противоопухолевое цитотоксическое действие ДК, МФ, гранулоцитов относительно опухолевых клеток 4Т1-GFP.

Рисунок 16 – Цитотоксическое действие TLR-активированных CD11c⁺ ДК, F4/80⁺ МФ, Ly6G⁺ гранулоцитов, выделенных из ткани легких наивных здоровых мышей и наивных мышей, которым за 120 минут до забоя ввели IMM+Poly I:C, в отношении клеток карциномы 4Т1-GFP

Гранулоциты не оказывали никакого эффекта на рост опухолевых клеток. Однократное *in vivo* введение агонистов IMM и Poly I:C не стимулировано активацию цитотоксических свойств этих клеток. Напротив, введение *in vivo* IMM+Poly I:C способствовало перепрограммированию ДК и МФ в активированное, противоопухолевое состояние. В частности, выраженный противоопухолевый эффект наблюдался у ДК с соотношения 25:1, а в случае с МФ 50:1 (рисунок 16).

Таким образом, подобное перепрограммирование CD11c⁺ ДК и F4/80⁺ МФ в тканях, куда мигрировали метастатические КОЕ, может приводить к

эффективной элиминации злокачественных клеток *in situ*, предотвращая рост метастатических опухолей во множестве отдаленных органов и тканей.

3.5.2. Исследование Т-клеточных реакций в процессе иммунотерапии агонистами TLR3 и TLR4 после резекции первичной опухоли

Показано, что экспериментальная иммунотерапия агонистами TLR после хирургической резекции первичной опухоли позволяет достичь полного избавления от метастатической карциномы у 25–50% животных. Доказано, что перепрограммирование тканевых МФ и ДК агонистами TLR в ткани легких приводит к эффективному подавлению жизнеспособности и роста опухолевых клеток в метастатических нишах. Однако, исследование не было ограничено изучением функций миелоидных клеток. Было проведено детальное исследование противоопухолевых Т-клеточных реакций в первые несколько недель иммунотерапии агонистами TLR после резекции первичной опухоли. В экспериментальной модели метастатической болезни подкожно вводили 15 тысяч клеток карциномы 4Т1. На 11-й день первичные опухоли удаляли хирургически. Начиная со следующего дня после резекции первичной опухоли, проводили иммунотерапию двумя агонистами TLR3 и TLR4 (ИММ+Poly I:C). Контрольная группа в эти же сроки получала физиологический раствор. На первой, второй, третьей неделях после резекции первичной опухоли и начала иммунотерапии выделяли селезенку и дренирующий опухоль ЛУ для исследования Т-клеточных реакций в ответ на антигены карциномы 4Т1 по продукции ИФН- γ методом ELISpot (рисунок 17 К).

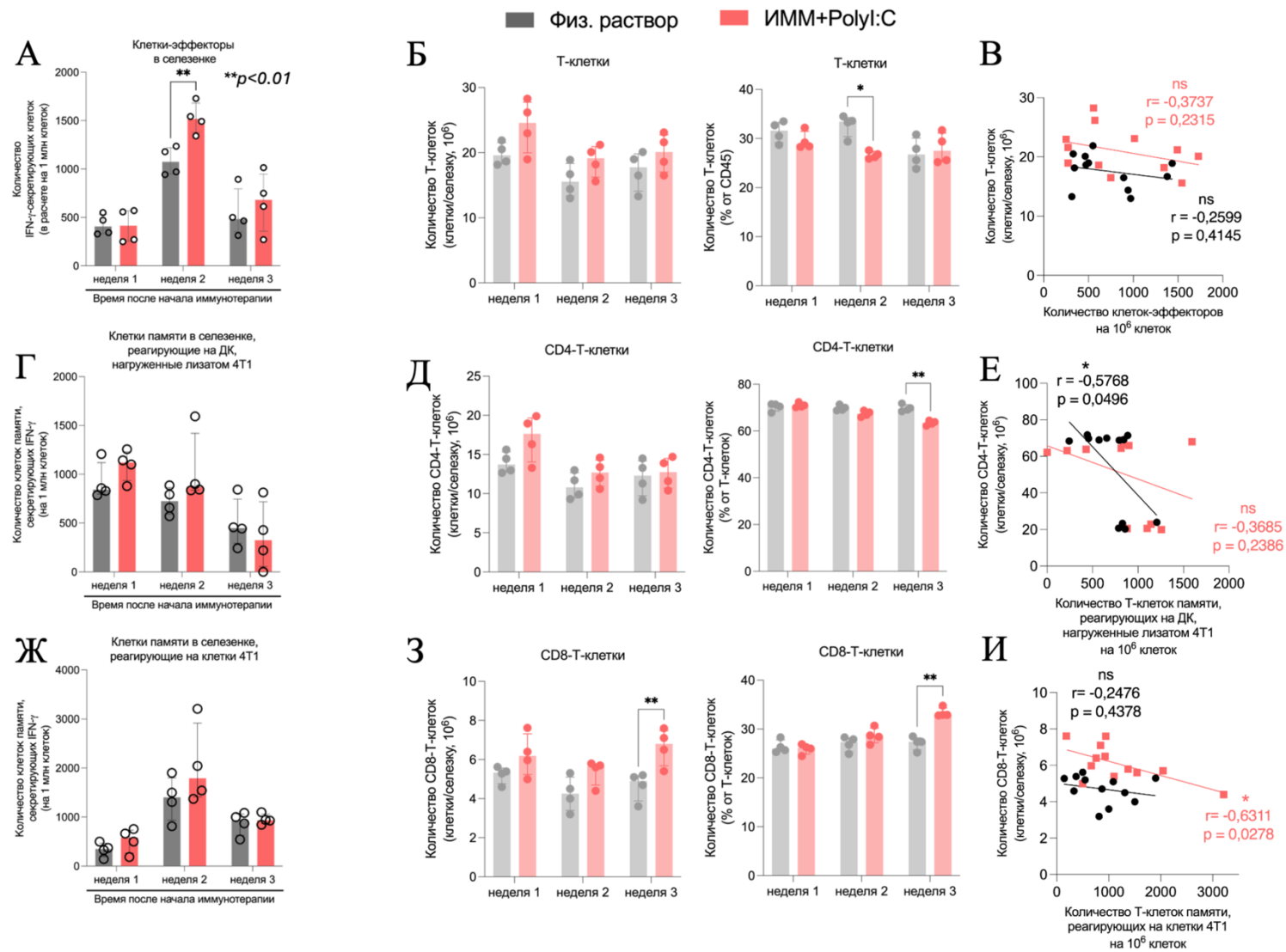
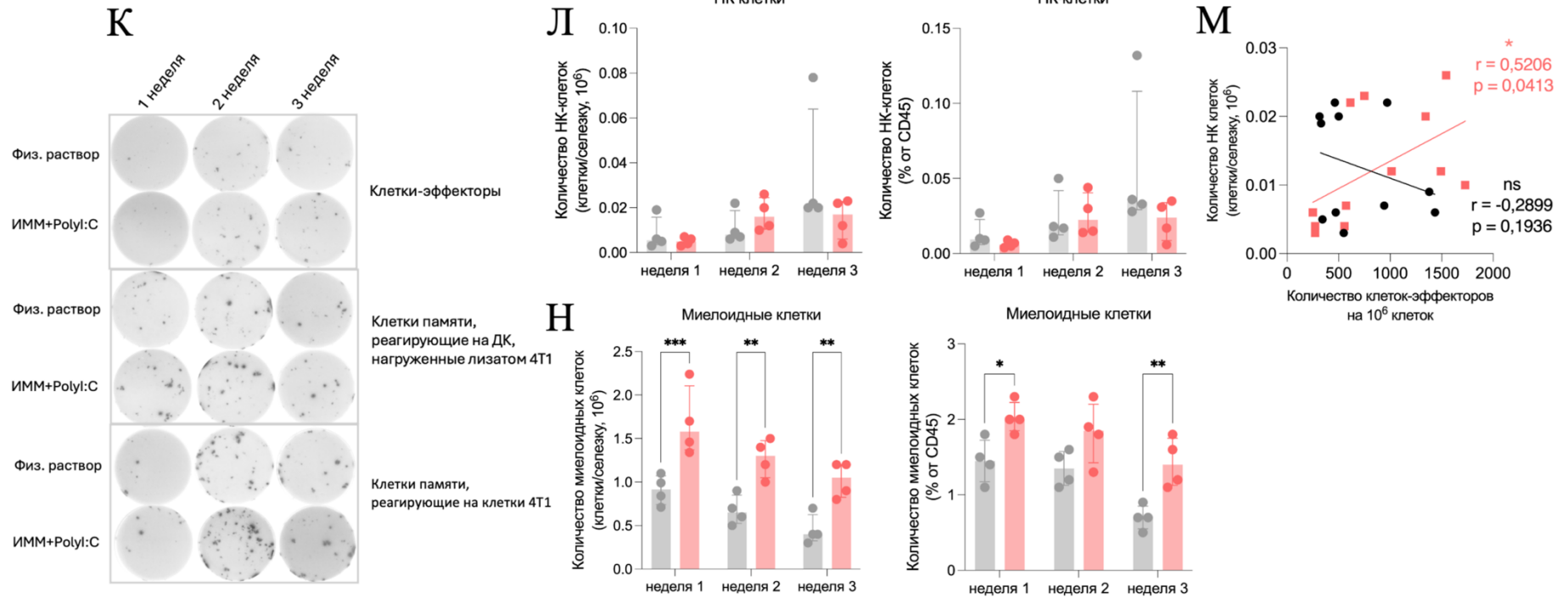


Рисунок 17 – Т-клеточные реакции в селезенке мышей на первых трех неделях проведения иммунотерапии агонистами TLR ИММ и Poly I:C или введения физиологического раствора после резекции первичной опухоли



А – динамика клеток-эффекторов у мышей, получавших агонисты TLR (красный цвет) или физиологический раствор (серый цвет) после резекции первичной опухоли; Б – абсолютное и относительное содержание Т-клеток; В – корреляция между количеством Т-клеток и количеством клеток-эффекторов; Г – динамика CD4-Т-клеток памяти, реагирующих на антигены карциномы 4Т1 продукцией ИФН-γ; Д – абсолютное и относительное содержание CD4-Т-клеток; Е – корреляция между количеством CD4-Т-клеток и количеством CD4-Т-клеток памяти, реагирующих на антигены карциномы 4Т1; Ж – динамика CD8-Т-клеток памяти, реагирующих на живые опухолевые клетки 4Т1; З – абсолютное и относительное содержание CD8-Т-клеток; И – корреляция между количеством CD8-Т-клеток и количеством CD8-Т-клеток памяти, реагирующих на клетки карциномы 4Т1; К – репрезентативные изображения лунок ELISpot, демонстрирующие продукцию ИФН-γ Т-клетками-эффекторами или Т-клетками памяти в первые три недели экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR; Л – абсолютное и относительное содержание НК-клеток; М – корреляция между количеством НК-клеток и количеством клеток-эффекторов; Н – абсолютное и относительное содержание CD11b⁺ миелоидных клеток.

Продолжение рисунка 17 – Т-клеточные реакции в селезенке мышей на первых трех неделях проведения иммунотерапии агонистами TLR ИММ и Poly I:C или введения физиологического раствора после резекции первичной опухоли

Специфические противоопухолевые Т-клеточные иммунные реакции оценивали по содержанию Т-клеток-эффекторов и Т-клеток памяти. Эффекторные Т-клетки, формирующиеся на ранних этапах антиген-специфического ответа, не требуют *ex vivo* стимуляции, поскольку уже прошли антигенную активацию в организме мышей-опухоленосителей. Т-клетки памяти, представляющие собой «молчащие» клетки, прекратили пролиферацию и продукцию цитокинов. Такие клетки требуют *ex vivo* реактивации антиген-презентирующими клетками.

В первые три недели экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR ИММ и Poly I:C после хирургической резекции первичной опухоли исследовали Т-клеточные реакции на опухолевые антигены в селезёнке мышей.

Интересен положительный эффект резекции опухоли и иммунотерапии агонистами TLR. В течение всего периода проведения иммунотерапии в селезенке мышей наблюдалось высокое содержание CD11b⁺ миелоидных клеток ($p < 0.01$, рисунок 17 Н). Через две недели в 4 раза возрастало количество клеток-эффекторов ($p < 0,01$, рисунок 17 А). Т-клетки в селезенке демонстрировали сильный системный иммунный ответ против антигенов опухоли 4Т1. Содержание ИФН- γ секретирующих Т-клеток-эффекторов достигало 2,85% от всех Т-клеток. Без резекции и иммунотерапии их количество было минимально – 1,25%. Это отчетливо видно через одну неделю после начала терапии. К концу третьей недели терапии содержание Т-клеток-эффекторов снижалось в 2 раза, но их количество всё равно превышало их содержание в первые дни после резекции. Абсолютное содержание Т-клеток в селезенке практически не изменялось в течение всего периода наблюдения (рисунок 17 Б). Не было обнаружено зависимости между общим содержанием Т-клеток в селезенке и количеством клеток-эффекторов, продуцирующих ИФН- γ (рисунок 17 В). Интересно заметить, что есть прямая зависимость между содержанием НК-клеток и количеством клеток-эффекторов, продуцирующих ИФН- γ в ответ на TLR-активированные ДК

($r = 0,5106$, $p = 0,0413$, рисунок 17 М). Концентрация НК-клеток в селезёнке была минимальной — около 20 тысяч клеток, что соответствовало 0,05% от общего числа $CD45^+$ клеток (рисунок 17 Л). Вероятно, столь низкая доля объясняется тем, что в селезёнке эффекторная популяция представлена как Т-лимфоцитами, так и НК-клетками, совместно обеспечивающими продукцию ИФН- γ .

Антиген-специфические CD4-Т-клетки памяти, реагирующие на ДК, нагруженные лизатом 4Т1 обнаруживались уже на первой неделе после резекции и начала иммунотерапии агонистами TLR и демонстрировали мощный иммунный ответ против антигенов опухоли 4Т1 (рисунок 17 Г). Их содержание было 1,9% от всех $CD45^+$ клеток в селезенке. Мыши, получавшие физиологический раствор, также показывали сильную иммунную реакцию CD4-Т-клеток памяти на антигены карциномы 4Т1. К концу третьей недели терапии их количество снизилось в 3,5 раза, но у части мышей концентрация CD4-Т-клеток памяти оставалось на том же высоком уровне, что и на первой неделе после резекции и начала иммунотерапии. Абсолютное и относительное содержание CD4-Т-клеток снижалось на протяжении трех недель терапии (рисунок 17 Д). Наблюдалась обратная корреляция между общим содержанием CD4-Т-клеток в селезенке и количеством CD4-Т-клеток памяти, продуцирующих ИФН- γ в ответ на ДК, нагруженные лизатом 4Т1 ($r = -0,5768$, $p = 0,0496$, рисунок 17 Е). Чем ниже было содержание CD4-Т-клеток, тем больше количество антиген-специфических CD4-Т-клеток памяти обнаруживалось в селезенке. Это может быть связано с количеством антиген-специфических CD4-Т-клеток, которые попали в лунки планшета ELISpot.

Антиген-специфические CD8-Т-клетки памяти, реагирующие на опухолевые клетки 4Т1, продукцией ИФН- γ обнаруживались, начиная со второй недели после резекции и начала иммунотерапии агонистами TLR ИММ и Poly I:C (рисунок 17 Ж). Такой мощный иммунный ответ CD8-Т-клеток памяти был в 3 раза сильнее, чем на первой неделе и составлял 1,2% от всех CD8-Т-клеток в селезенке. Среднее количество CD8-Т-клеток памяти,

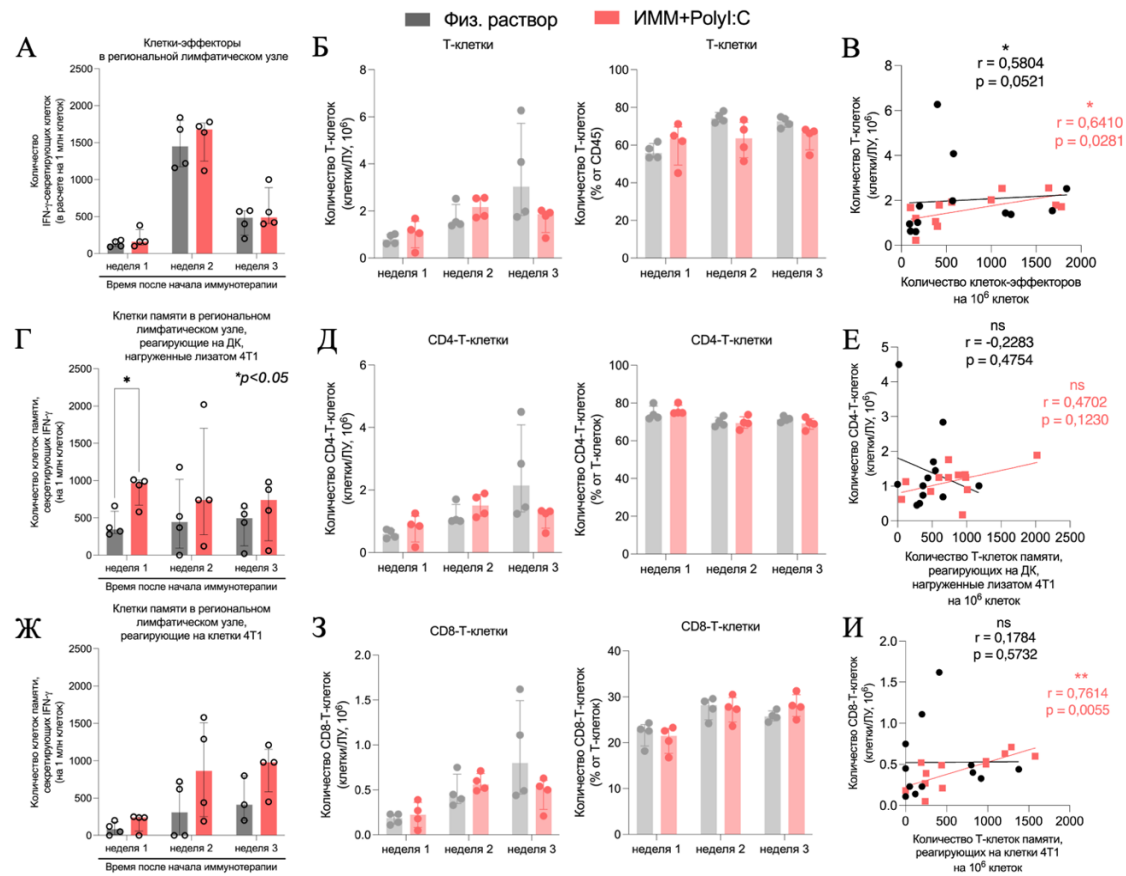
секретирующих ИФН- γ , превышало 1700 (в расчете на 1 млн соответствующих Т-клеток). К концу третьей недели терапии содержание CD8-Т-клеток памяти снижалось в 1,9 раза, но их количество всё равно превышало их содержание в первые дни после резекции. Абсолютное и относительное количество CD8-Т-клеток возрастало на протяжении трех недель после резекции опухоли и иммунотерапии ($p < 0,01$, рисунок 17 З). Также, как с CD4-Т-клетками памяти, наблюдалась обратная корреляция между общим содержанием CD8-Т-клеток в селезенке и количеством CD8-Т-клеток памяти, продуцирующих ИФН- γ в ответ на клетки карциномы 4T1 ($r = -0,6311$, $p = 0,0278$, рисунок 17 И). Чем ниже было содержание CD8-Т-клеток, тем больше антиген-специфических CD8-Т-клеток памяти обнаружилось в селезенке. Это может быть связано с количеством антиген-специфических CD8-Т-клеток, которые попали в лунки планшета ELISpot.

Концентрация CD11b⁺ миелоидных клеток у мышей после резекции первичной опухоли и иммунотерапии агонистами TLR была значительно выше, чем у мышей в контрольной группе, получавшей физиологический раствор на протяжении всего периода наблюдения (рисунок 17 Л). Такое увеличение количества миелоидных клеток в совокупности с Т-клеточными реакциями может свидетельствовать об эффективном иммунном ответе против антигенов опухоли.

Таким образом, данные показывают, что уже через одну неделю после резекции опухоли у мышей контрольной группы, которой вводили физиологический раствор, в селезенке появляется противоопухолевая реакция CD4-Т-клеток, но не CD8-Т-клеток. В то же время мыши, получавшие иммунотерапию агонистами TLR после резекции опухоли демонстрируют интенсивные противоопухолевые реакции как CD4-Т-клеток, так и CD8-Т-клеток. Так, TLR-активированные ДК способствовали увеличению интенсивности иммунных реакций антиген-специфических Т-клеток.

Еще одним органом интереса, в котором в первые три недели введения экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR ИММ и Poly I:C после

хирургической резекции первичной опухоли исследовали, Т-клеточные реакции на опухолевые антигены был дренирующий первичную опухоль ЛУ (рисунок 18).



А – динамика клеток-эффекторов; Б – абсолютное и относительное содержание Т-клеток; В – корреляция между количеством Т-клеток и количеством клеток-эффекторов; Г – динамика CD4-Т-клеток памяти, реагирующих на антигены карциномы 4Т1; Д – абсолютное и относительное содержание CD4-Т-клеток; Е – корреляция между количеством CD4-Т-клеток и количеством CD4-Т-клеток памяти, реагирующих на ДК, нагруженных лизатом клеток 4Т1; Ж – динамика CD8-Т-клеток памяти, реагирующих на живые клетки 4Т1; З – абсолютное и относительное содержание CD8-Т-клеток; И – корреляция между количеством CD8-Т-клеток и CD8-Т-клеток памяти, реагирующих на клетки карциномы 4Т1.

Рисунок 18 – Динамика противоопухолевых Т-клеточных реакций в дренирующей опухоль ЛУ в первые три недели иммунотерапии агонистами TLR IMM и Poly I:C или введения физиологического раствора после резекции первичной опухоли

В дренирующей опухоли ЛУ, как и в селезенке, был мощный ответ Т-клеток-эффекторов на второй неделе после резекции опухоли и иммунотерапии агонистами TLR. Через две недели в 11 раз возрастало количество клеток-эффекторов ($p < 0,0029$, рисунок 18 А). Содержание ИФН- γ секретирующих Т-клеток-эффекторов достигало 0,4% от всех Т-клеток в ЛУ. Количество Т-клеток-эффекторов в первую неделю терапии было минимально – 0,04%. К концу третьей недели терапии содержание Т-клеток-эффекторов снижалось в 3 раза, но их количество всё равно превышало их содержание в первые дни после резекции. Абсолютное и относительное содержание Т-клеток в дренирующей ЛУ практически не изменялось в течение всего периода наблюдения, но была заметна тенденция к их увеличению (рисунок 18 Б). Была обнаружена зависимость между общим содержанием Т-клеток в дренирующей опухоли ЛУ и количеством клеток-эффекторов, продуцирующих ИФН- γ ($r = 0,6410$, $p = 0,0281$, рисунок 18 В). Интересно заметить, что увеличение содержания Т-клеток в ЛУ прямо связано с увеличением количества клеток-эффекторов, продуцирующих ИФН- γ в ответ на стимуляцию ДК. Такая корреляция может свидетельствовать об активных иммунных реакциях, происходящих в дренирующей опухоли ЛУ.

Антиген-специфические CD4-Т-клетки памяти, реагирующие на ДК, нагруженные лизатом 4Т1, в большом количестве обнаруживались уже на первой неделе после резекции опухоли и начала иммунотерапии агонистами TLR ($p < 0,05$, рисунок 18 Г). Их содержание было 0,1% от всех CD4-Т-клеток в дренирующей опухоли ЛУ. Мыши, получавшие физиологический раствор, также показывали противоопухолевую иммунную реакцию CD4-Т-клеток памяти на антигены карциномы 4Т1, но не столь интенсивную. На протяжении всех трех недель наблюдения количество CD4-Т-клеток памяти оставалось на том же высоком уровне, что и на первой неделе после резекции и начала иммунотерапии. Абсолютное содержание CD4-Т-клеток увеличивалось на протяжении трех недель терапии (рисунок 18 Д). Не наблюдалась корреляция между общим содержанием CD4-Т-клеток в селезенке и количеством

CD4-Т-клеток памяти, продуцирующих ИФН- γ в ответ на ДК, нагруженные лизатом 4Т1. Мыши, получавшие иммунотерапию агонистами TLR, демонстрировали прямую зависимость между содержанием CD4-Т-клеток и количеством CD4-Т-клеток памяти, продуцирующих ИФН- γ в дренирующей опухоли ЛУ ($r = 0,4702$, $p = 0,1230$, розовая кривая, рисунок 18 Е). Интересно, что мыши, получавшие физиологический раствор, демонстрировали обратную зависимость. Это может свидетельствовать об интенсивном противоопухолевом иммунном ответе антиген-специфических CD4-Т-клеток памяти у мышей, получавших иммунотерапию агонистами TLR ИММ и Poly I:C.

Антиген-специфические CD8-Т-клетки памяти, реагирующие на опухолевые клетки 4Т1, продукцией ИФН- γ , обнаруживались в дренирующей ЛУ, начиная со второй недели после резекции опухоли и начала иммунотерапии агонистами TLR ИММ и Poly I:C (рисунок 17 Ж). Такой мощный иммунный ответ CD8-Т-клеток памяти был в 4 раза сильнее, чем на первой неделе и составлял 0,05% от всех CD8-Т-клеток в ЛУ. Среднее количество CD8-Т-клеток памяти, секретирующих ИФН- γ , превышало 900 (в расчете на 1 млн соответствующих Т-клеток) на второй и третьей неделе терапии. Абсолютное и относительное количество CD8-Т-клеток возрастало на протяжении трех недель после резекции опухоли и иммунотерапии (рисунок 18 З). Наблюдалась прямая корреляция между общим содержанием CD8-Т-клеток и количеством CD8-Т-клеток памяти, продуцирующих ИФН- γ в ответ на клетки карциномы 4Т1 в дренирующей опухоли ЛУ ($r = 0,7614$, $p = 0,0055$, розовая кривая, рисунок 17 И). Чем выше было содержание CD8-Т-клеток, тем больше антиген-специфических CD8-Т-клеток памяти обнаружилось в ЛУ. Это может быть связано с интенсивными противоопухолевыми иммунными реакциями CD8-Т-клеток памяти у мышей, получавших иммунотерапию агонистами TLR ИММ и Poly I:C.

Таким образом, данные показывают, что уже через одну неделю после резекции опухоли у мышей контрольной группы, которой вводили

физиологический раствор, в дренирующей опухоли ЛУ появляется реакция CD4-Т-клеток, но не CD8-Т-клеток. В то же время мыши, получавшие иммунотерапию агонистами TLR ИММ и Poly I:C демонстрируют мощные противоопухолевые реакции как CD4-Т-клеток, так и CD8-Т-клеток. Так, TLR-активированные ДК способствовали увеличению интенсивности иммунных реакций антиген-специфических Т-клеток во вторичных лимфоидных органах.

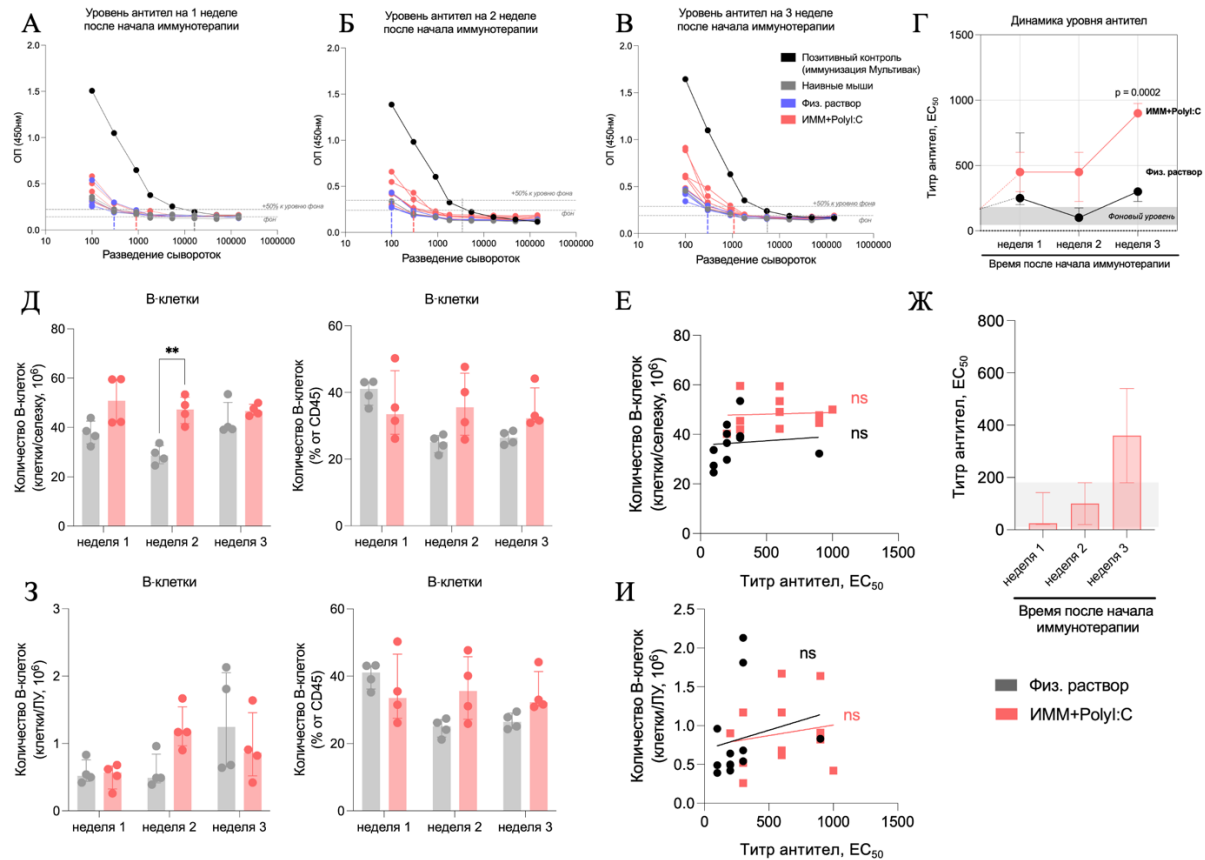
3.5.3. Исследование динамики противоопухолевых антител в процессе иммунотерапии агонистами TLR3 и TLR4

Наряду с Т-клеточными реакциями против опухолевых антигенов, исследовалось наличие антител, специфично связывающихся с антигенами карциномы 4Т1. Известно, что В-клетки играют ключевую роль в гуморальном иммунитете, дифференцируясь в плазматические клетки, которые вырабатывают антитела против антигенов опухоли. В ЛУ и селезенке происходит накопление В-клеток, продуцирующих иммуноглобулины классов М и G, что напрямую связано с процессом антителообразования. При антигенной стимуляции, в том числе опухолевыми антигенами, происходит клональная экспансия В-клеток, их активация и дифференцировка в плазматические клетки, что приводит к увеличению продукции антител.

В экспериментальной модели метастатической болезни подкожно вводили 15 тысяч клеток карциномы 4Т1. На 11-й день опухоли удаляли хирургически. Начиная со следующего дня проводили иммунотерапию двумя агонистами TLR3 и TLR4 (ИММ+Poly I:C). Контрольная группа в эти же сроки получала физиологический раствор. На первой, второй, третьей неделях после резекции первичной опухоли и начала иммунотерапии получали сыворотку из периферической крови мышей для исследования уровня IgG-антител, способных связываться с поверхностными и внутриклеточными антигенами

карциномы 4Т1. Титры антител исследовали в реакции ИФА, а также исследовали связывание антител с антигенами на поверхности клеток карциномы 4Т1 методом проточной цитофлуориметрии.

На рисунке 19 А-Г представлены измерения уровня противоопухолевых IgG-антител в сыворотках крови мышей в первые три недели проведения иммунотерапии агонистами TLR ИММ и Poly I:C после резекции первичной опухоли.



А – содержание противоопухолевых IgG-антител на первой неделе проведения экспериментальной иммунотерапии после резекции опухоли, Б – содержание противоопухолевых IgG-антител на второй неделе; В – содержание противоопухолевых IgG-антител на третьей неделе; Г – динамика титра антител; Д – абсолютное и относительное содержание В-клеток в селезенке; Е – Корреляция между количеством В-клеток в селезенке и титром сывороточных противоопухолевых IgG-антител; Ж – динамика уровня противоопухолевых IgG-антител EC₅₀, специфически связывающихся с поверхностными антигенами карциномы 4Т1, серый цвет показывает уровень антител у животных контрольной группы; З – абсолютное и относительное содержание В-клеток в региональных ЛУ; И – корреляция между количеством В-клеток в региональных ЛУ и титром сывороточных противоопухолевых IgG-антител.

Рисунок 19 – Динамика сывороточных противоопухолевых IgG-антител в первые три недели иммунотерапии агонистами TLR ИММ и Poly I:C или введения физиологического раствора после резекции первичной опухоли

Анализ взаимодействия сывороточных IgG-антител с антигенами лизата злокачественных клеток 4Т1 показал, что у мышей, которым вводили физиологический раствор антитела практически не вырабатываются. Значения близки к уровню антител у наивных здоровых мышей. У мышей, леченых агонистами TLR накапливалось большое количество противоопухолевых IgG-антител к поверхностным и внутриклеточным антигенам злокачественных клеток 4Т1 к третьей неделе ($p < 0,05$, рисунок 19 Г, Ж). Уровень антителообразования повышался почти на порядок: у мышей, которым вводили физиологический раствор титр составлял 1:100-200, в то время как у «лучших ответчиков» на иммунотерапию наблюдалось соотношение 1:800-1000. При этом этот уровень оставался значительно ниже титра антител после иммунизации вакциной Мультивак (иммунизация лизатом клеток карциномы 4Т1 в течение трех недель) из тех же клеток карциномы 4Т1 [3, 6]. Титры позитивной сыворотки составлял приблизительно 1:4000 - 1:5000 (рисунок 19 А, Б, В).

Возможно выдвинуть предположение, что уровень антителообразования, может быть связан с концентрацией В-клеток в селезенке и региональном ЛУ. При проверке этой гипотезы обнаружили, что в селезенке мышей, получавших иммунотерапию агонистами TLR после резекции опухоли наблюдалось повышенное абсолютное содержание В-клеток, по сравнению с мышами, получавшими физиологический раствор (рисунок 19 Д). Относительное содержание этих клеток не изменялось в течение трёх недель наблюдения (рисунок 19 Д). Корреляционный анализ не выявил зависимости между числом В-клеток в селезенке и уровнем антител (рисунок 19 Е). В региональных ЛУ, дренирующих опухоль, также отмечалось увеличение абсолютного содержания В-клеток у мышей, получавших иммунотерапию агонистами TLR после резекции опухоли (рисунок 19 З). Доля В-клеток не изменялась в течение трех недель терапии. Корреляционный анализ не выявил зависимость между числом В-клеток в ЛУ и уровнем антител (рисунок 19 И).

Полученный результат подтверждает, что применение иммунотерапии агонистами TLR IMM и Poly I:C после хирургической резекции опухоли эффективно не у всех мышей. В данном случае титры 1:900 достигнуты у 2 из 4 мышей. Экспериментальная иммунотерапия перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 после хирургического удаления первичной опухоли инициирует продукцию противоопухолевых IgG-антител, которые становятся вполне заметны через 3 недели после начала терапии.

3.6. Исследование механизмов формирования долговременной иммунной памяти у выживших животных после проведения экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR после резекции первичной опухоли

3.6.1. Анализ скорости роста опухоли при повторном введении опухолевых клеток 4T1 у мышей, излечившихся от метастатической болезни – модель рецидива

Ранее было доказано, что полное излечение 25–50% животных от метастатической болезни связано с цитотоксическим эффектом тканевого микроокружения на единичные КОЕ карциномы 4T1, а также с интенсивными Т-клеточными реакциями на опухолевые антигены и антителообразованием. Выжившие мыши продолжали жить без каких-либо признаков рецидивирующего заболевания на протяжении 250 дней наблюдения. Поэтому было выдвинуто предположение о том, что у таких животных могла сформироваться долговременная иммунная защита на антигены карциномы 4T1 после проведения экспериментальной иммунотерапии путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR после хирургической резекции первичной опухоли.

Для подтверждения гипотезы о формировании долговременной иммунной памяти, мышам, которые полностью избавились от

метастатическом болезни (далее *complete responders* или *responders*) после проведения иммунотерапии агонистами TLR после хирургической резекции первичной опухоли на 250-й день были повторно введены 15 тысяч клеток карциномы 4Т1, имитировав возникновение рецидива (модель рецидива, рисунок 20). Таким образом, были сформированы 4 группы животных: группа, ранее леченая агонистом TLR4 IMM (*complete responders* оказалось 12 мышей), группа, леченая агонистом TLR3 Poly I:C (*complete responders* 9 мышей), и группа, ранее получавшая комбинацию двух агонистов TLR4+TLR3 (IMM+Poly I:C) (*complete responders* – 12 мышей). В качестве контроля взяли группу наивных здоровых мышей, которым впервые вводили 15 тысяч клеток карциномы 4Т1 (рисунок 20). Иммунотерапию во время повторного прививания опухолевых клеток 4Т1, в модели рецидива, не проводили.

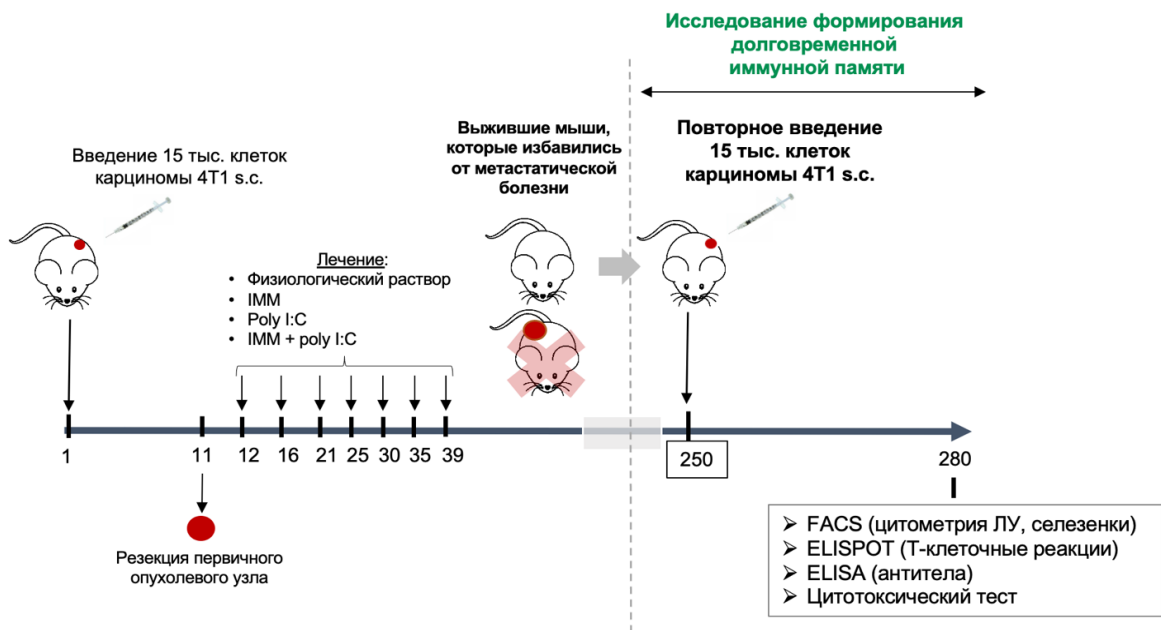
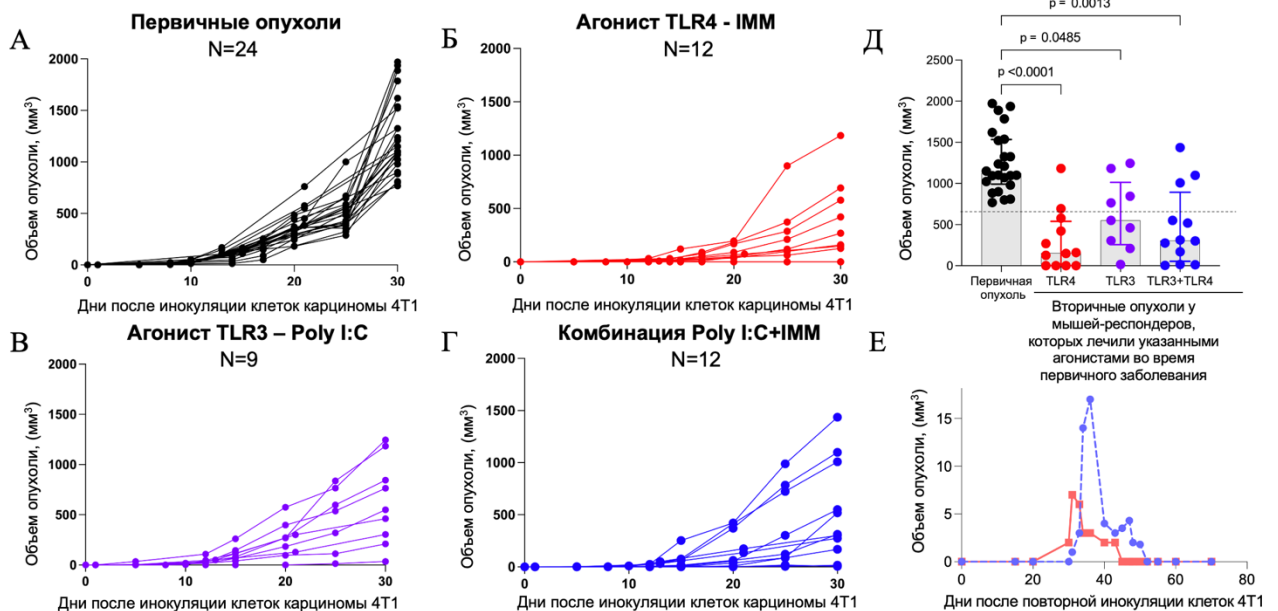


Рисунок 20 – Схема по изучению формирования долговременной иммунной памяти в экспериментальной модели рецидива карциномы 4Т1 у мышей, излечившихся от метастатической болезни после проведения иммунотерапии агонистами TLR после хирургической резекции опухоли

Наличие таких экспериментальных групп позволяло сравнить вероятность развития опухоли и скорость ее роста у мышей, ранее излечившихся от первичной метастатической болезни карциномы 4Т1 (резекция и иммунотерапия агонистами TLR), и мышей, у которых эта опухоль

развивается впервые. В случае замедленного роста опухоли или его отсутствия после повторного, вторичного, введения опухолевых клеток можно сделать предположение о формировании долговременной (250 дней) иммунной памяти против антигенов опухоли 4Т1 во время успешного лечения первичной опухоли.

Динамику роста опухолей исследовали на протяжении 30 дней после введения клеток карциномы 4Т1 (рисунок 21). Иммунотерапию во время повторного прививания опухолевых клеток 4Т1, в модели рецидива, не проводили. В контрольной группе мышей, которым впервые вводили опухолевые клетки 4Т1, у всех без исключения вырастала опухоль. Средний объем возникающих опухолей достигал – 1126 мм³ (рисунок 21 А).



А – индивидуальная динамика роста первичных опухолей у мышей контрольной группы; Б – индивидуальная динамика роста вторичных опухолей-рецидивов у мышей, *complete responders*, выживших после резекции первичной опухоли и иммунотерапии агонистом TLR4 IMM; В – индивидуальная динамика роста вторичных опухолей-рецидивов у мышей, *complete responders*, выживших после резекции первичной опухоли и иммунотерапии агонистом TLR3 Poly I:C; Г – индивидуальная динамика роста вторичных опухолей-рецидивов у мышей, *complete responders*, выживших после резекции первичной опухоли и иммунотерапии агонистами TLR3 и TLR4; Д - объемы индивидуальных опухолей на 30-й день; Е – индивидуальная динамика роста вторичных, рецидивных, опухолей у мышей «ответчиков» на иммунотерапию.

Рисунок 21 – Динамика роста вторичных, рецидивных, опухолей в группах мышей, ранее леченных иммунотерапией агонистами TLR

В группе, излечившихся от метастатической болезни с помощью монотерапии агонистом TLR4 IMM с целью перепрограммирования клеток опухолевого микроокружения, рост вторичных опухолей был значительно медленнее, чем в контрольной группе (первичные опухоли). Внешний размер опухолей, измеренный при жизни животных, уменьшался в среднем на 82% ($p < 0,0001$, рисунок 21 Д). При этом, у 3 из 12 мышей, вторичная опухоль не вырастала (рисунок 21 Б). А также, у одной мыши при вторичном введении опухолевых клеток 4Т1 опухоль выросла до 8 мм³, а затем регрессировала (рисунок 21 Е).

В группе, излечившихся от метастатической болезни с помощью монотерапии агонистом TLR3 Poly I:C, наблюдался не такой значительный противоопухолевый эффект, как при монотерапии IMM. Рост солидной карциномы достоверно замедлялся ($p = 0,0485$, рисунок 21 Д). Внешний размер был уменьшен на 51% по сравнению с контрольной группой (рисунок 21 В).

В группе мышей, излечившихся от метастатической болезни с помощью комбинации IMM и Poly I:C, наблюдался такой же сильный противоопухолевый эффект, как при монотерапии IMM (рисунок 21 Г). Ингибирование роста опухоли составило 73% по внешнему размеру опухолей ($p = 0,0013$, рисунок 21 Д). При этом, у 3 из 12 мышей, вторичная опухоль не вырастала. А также, у одной мыши при вторичном введении опухолевых клеток 4Т1 опухоль выросла до 18,5 мм³, а затем регрессировала (рисунок 21 Е). Таким образом, эффективность формирования иммунной памяти в отношении антигенов карциномы 4Т1 была значительно выше при лечении IMM или сочетанием двух агонистов IMM+Poly I:C. Этот вывод подтвердился при анализе размеров вторичных опухолей.

На 30 сутки производили забой животных, измеряли размеры индивидуальных опухолей (рисунок 21 Д). Медиана объемов вторичных опухолей в группах, предварительно леченых иммунотерапией агонистами

TLR, была в 3–8 раз меньше медианы объемов первичных опухолей у мышей из контрольной группы.

Замедленный рост вторичных опухолей у мышей, полностью излеченных от метастатической болезни экспериментальной иммунотерапией путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR после резекции первичной опухоли, а также регрессия вторичной опухоли у двух мышей, свидетельствуют о том, что во время терапии первичной опухоли развилась иммунная память в отношении карциномы 4T1, вполне вероятно, за счет адаптивных иммунных реакций на антигены опухоли.

3.6.2. Анализ клеточного состава дренирующих опухоль лимфатических узлов и селезенки у мышей-*responders*

Замедленный рост вторичных опухолей сопровождался изменением клеточного состава дренирующих опухоль ЛУ. При исследовании клеточного состава дренирующих опухоль ЛУ мышей-*responders* методом проточной цитофлуориметрии наблюдалась усиленная инфильтрация CD45⁺ лейкоцитами (рисунок 22).

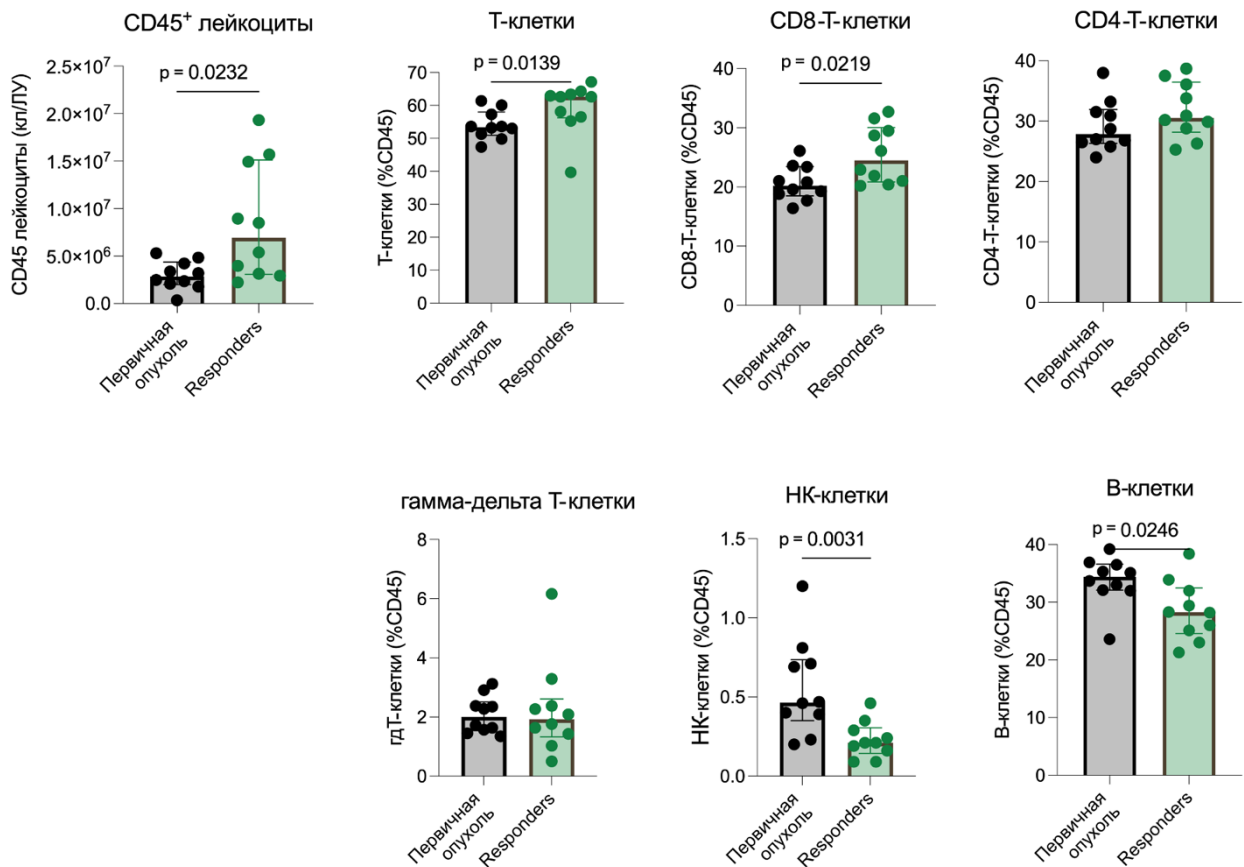


Рисунок 22 – Изменения в относительном содержании лимфоидных клеток в дренирующей опухоль ЛУ у мышей с первичной опухолью (n=10) и у мышей, излечившихся от метастатической болезни после хирургической резекции первичной опухоли и иммунотерапии агонистами TLR– *responders* (n=10)

Количество CD45⁺ лейкоцитов возросло в среднем в 2,6 раза (p=0,0232). Большая часть вновь пришедших клеток была представлена Т-лимфоцитами, среди которых доминировали CD4-Т-клетки. Увеличение количества CD4-Т-клеток наблюдалось, но не достигало достоверных значений из-за индивидуальных разбросов. У 6 из 10 мышей-*responders* было очевидное повышение содержания CD4-Т-клеток в ЛУ (рисунок 23). Количество CD8-Т-клеток возросло в 2,8 раза (p=0,0219). Примечательно, что относительное содержание НК-клеток и В-клеток уменьшилось в дренирующей ЛУ мышей-*responders* со вторичными опухолями, по сравнению с мышами контрольной группы с первичной опухолью (рисунок 22). Однако абсолютное количество этих клеток у 6 из 10 мышей было высоким (рисунок 23).

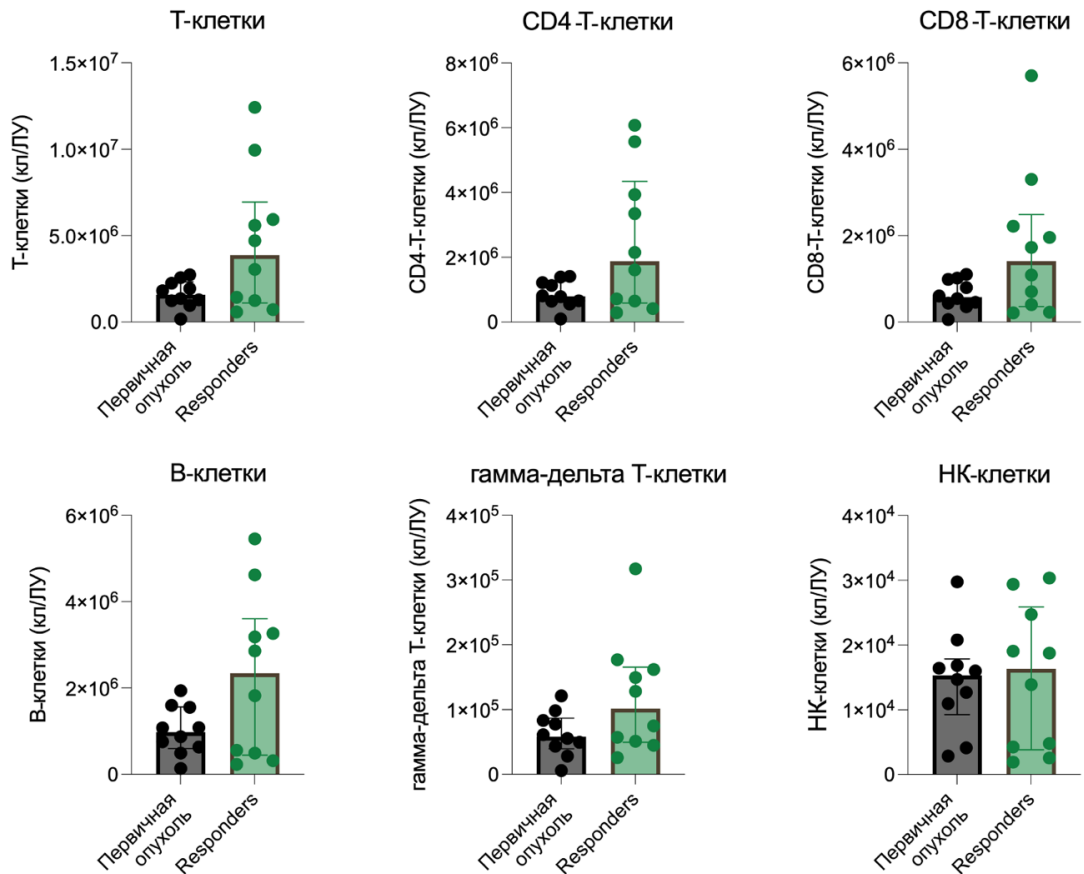


Рисунок 23 – Изменения в абсолютном содержании лимфоидных клеток в дренирующей опухоли ЛУ у мышей с первичной опухолью (n=10) и у мышей, излечившихся от метастатической болезни после хирургической резекции первичной опухоли и иммунотерапии агонистами TLR– *responders* (n=10)

Полученный результат подтверждает, что проведение экспериментальной иммунотерапии перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR после хирургической резекции опухоли эффективно, но иммунная защита у мышей-*responders* отличается.

Также, был изучен клеточный состав селезенки при развитии рецидива злокачественного образования. У мышей-*responders*, излечившихся от метастатической болезни после проведения экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR3, TLR4, TLR3+TLR4, перепрограммирующей миелоидные клетки после хирургической резекции опухоли, наблюдалось снижение инфильтрации CD45⁺ лейкоцитами (рисунок 24 А). Интересно, что анализ клеточного состава селезенки также показал значительные повышения относительного количества как

Количество CD8-T-клеток возрастало в 1,8 раза ($p=0,0138$, рисунок 24 Б), а количество CD4-T-клеток увеличивалось в 1,2 раза ($p=0,0138$, рисунок 24 Б). Примечательно, что относительное содержание НК-клеток, В-клеток и гамма-дельта Т-клеток не изменялось в селезенках мышей-*responders* со вторичными опухолями, по сравнению с мышами с первичными опухолями (рисунок 24). В абсолютных концентрациях различия между группами не достоверны из-за большого разброса в индивидуальных значениях.

Таким образом, полученные данные подтверждают эффективность подхода, сочетающего иммунотерапию перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR – ИММ и Poly I:C после хирургического удаления опухоли при лечении первичной метастатической болезни. Однако, существуют различия в иммунном ответе между отдельными мышами-ответчиками.

3.6.3. Анализ противоопухолевой цитотоксической активности CD8-T-клеток, инфильтрирующих опухоль и дренирующий опухоль лимфатический узел, после повторного введения клеток карциномы 4T1 у мышей-*responders*

Замедленный рост вторичных опухолей сопровождался высокой инфильтрацией Т-клеток в дренирующую опухоль ЛУ. Поэтому была проведена оценка противоопухолевой цитотоксической активности CD8-T-клеток во вторичных опухолях и дренирующей опухоль ЛУ.

Для исследования цитотоксической активности CD8-T-клетки выделяли из опухолевой ткани и дренирующей ЛУ методом сортировки на проточной флуориметре-сортировщике. Чистота сортированной популяции составила 98%. Различное количество CD8-T-клеток вносили в культуры клеток 4T1-GFP, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок, для совместного

культивирования в течение 4 суток. Отношение количества CD8-Т-клеток к количеству 4Т1-GFP в начальный момент культивирования составило 50:1. В совместной культуре Т-клетки оказывали цитотоксическое действие на клетки карциномы 4Т1-GFP (рисунок 25).

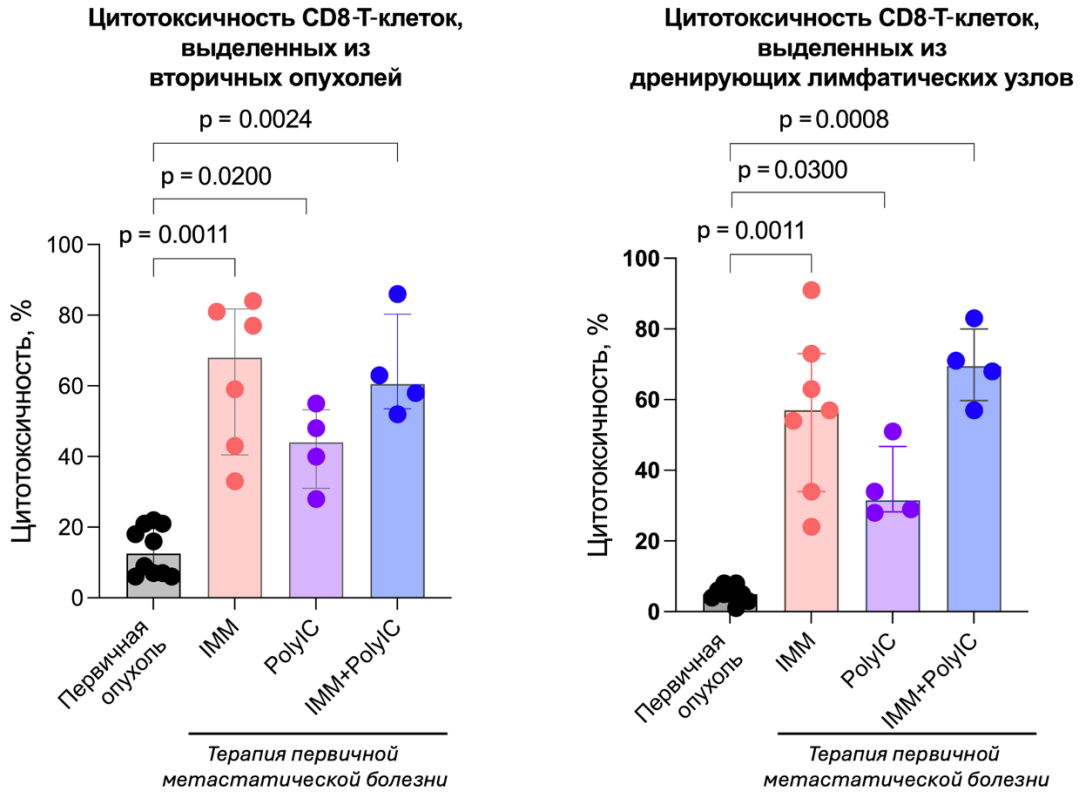


Рисунок 25 – Цитотоксичность сортированных CD8-Т-клеток из вторичной опухоли и дренирующих ЛУ в отношении клеток 4Т1-GFP у мышей, ранее леченых иммунотерапией агонистами TLR (IMM, Poly I:C, IMM+Poly I:C), по сравнению с CD8-Т-клетками, выделенными сортировкой из первичной опухоли и дренирующих ЛУ мышей контрольной группы

Как было описано выше, у мышей *complete responders*, успешно вылеченных от первичной метастатической карциномы 4Т1 путем резекции первичной опухоли и последующей иммунотерапией агонистами TLR, после второго введения опухолевых клеток карциномы 4Т1-рецидива заболевания, рост опухолей замедлялся или отсутствовал вовсе. Была выделена очищенная популяция CD8-Т-клеток из вторичных опухолей и дренирующих опухоль ЛУ, с целью оценки их цитотоксического действия при совместном культивировании с клетками карциномы 4Т1-GFP. Оказалось, что внутриопухолевые CD8-Т-клетки из вторичных опухолей и CD8-Т-клетки из

дренирующих ЛУ мышей *complete responders* обладают высоким уровнем противоопухолевой цитотоксической активности в отношении клеток 4T1-GFP (рисунок 25). Особенно активны противоопухолевые CD8-Т-клетки во вторичных опухолях и дренирующих ЛУ у мышей, ранее леченых агонистом TLR4 IMM или сочетанием двух агонистов IMM+Poly I:C, которые с высокой эффективностью, более 60%, подавляли рост клеток карциномы 4T1-GFP. CD8-Т-клетки у мышей, ранее получавших монотерапию Poly I:C, проявляли средние цитотоксические свойства в диапазоне 30-50% в отношении клеток карциномы 4T1-GFP.

Полученные данные свидетельствуют, что иммунотерапия первичной метастатической болезни мышей перепрограммированием миелоидных клеток агонистами TLR4, TLR3 или их сочетанием способствует формированию адаптивной противоопухолевой Т-клеточной памяти, проявляющейся в виде инфильтрации ткани рецидивной опухоли и дренирующих ЛУ противоопухолевыми цитотоксическими CD8-Т-клетками.

3.6.4. Анализ Т-клеточных реакций, специфичных к антигенам карциномы 4Т1 в опухоли, дренирующем лимфатическом узле и селезенке у мышей-*responders*

Ранее были показаны изменения в клеточном составе дренирующих опухоль ЛУ и селезенке. Количественный состав Т-клеток увеличивался у мышей со вторичными опухолями, но ничего не известно об их антигенной специфичности. Было предположено, что у мышей, излечившихся от первичной метастатической болезни после проведения экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR, образуются CD4- и CD8-Т-клетки, которые специфично могут распознавать антигены карциномы 4Т1 и способствуют формированию долговременной иммунной защиты.

Для изучения специфических Т-клеточных реакций на 30-й день после повторного введения опухолевых клеток карциномы 4Т1, развития рецидива, в *complete responders*, выделяли опухоль, селезенку и дренирующие опухоль ЛУ. С помощью сортировки на проточном флуориметре-сортировщике из суспензии клеток опухоли, селезенки, ЛУ получали очищенные популяции CD4- и CD8-Т-клеток (чистота – 93 %).

На рисунке 26 представлены результаты исследования Т-клеточных реакций в ответ на антигены карциномы 4Т1 в первичных опухолях у мышей контрольной группы и во вторичных опухолях у мышей *complete responders*, излечившихся от метастатической болезни после иммунотерапии агонистами TLR (IMM, Poly I:C).

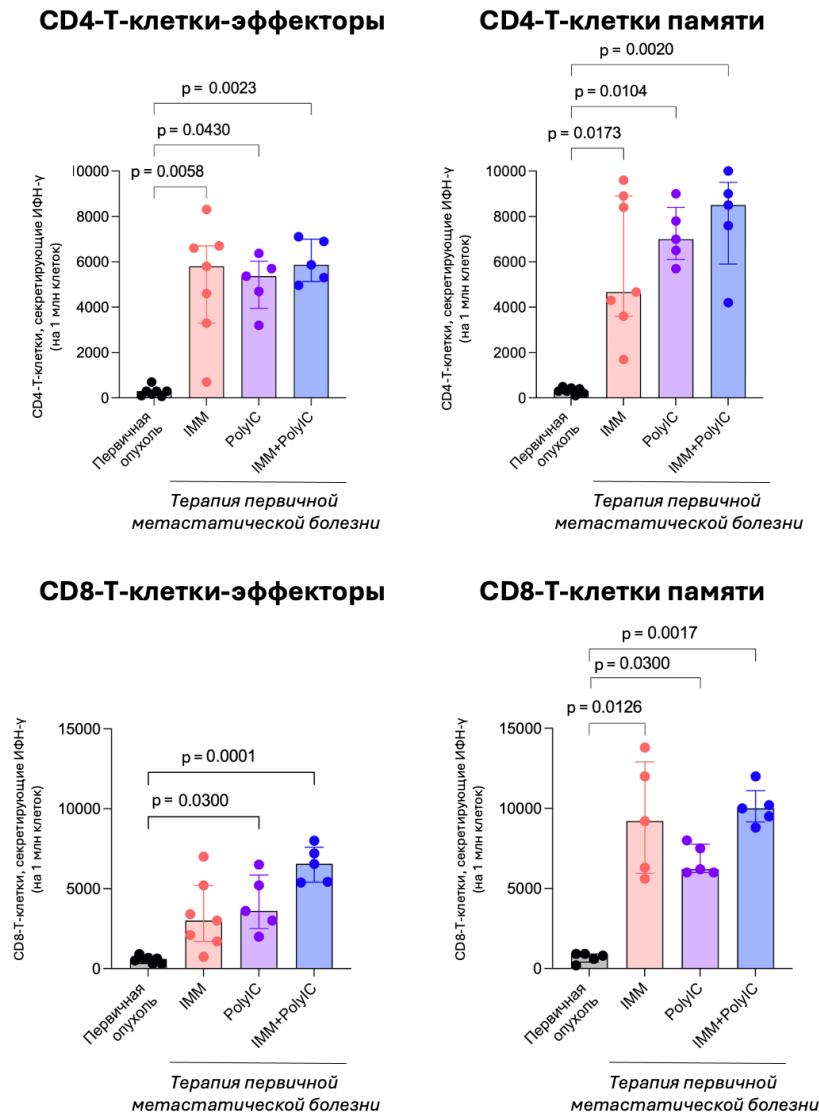


Рисунок 26 – Т-клеточные реакции, специфичные к антигенам карциномы 4Т1, во вторичных опухолях мышей *complete responders*, излечившихся от

метастатической болезни после проведения хирургической резекции и иммунотерапии IMM, Poly I:C, IMM+Poly I:C и у мышей контрольной группы с первичной опухолью

Специфический Т-клеточный ответ анализировался по количеству Т-клеток-эффекторов и Т-клеток памяти. Т-клетки памяти реактивировали *ex vivo* с помощью антиген-презентирующих клеток.

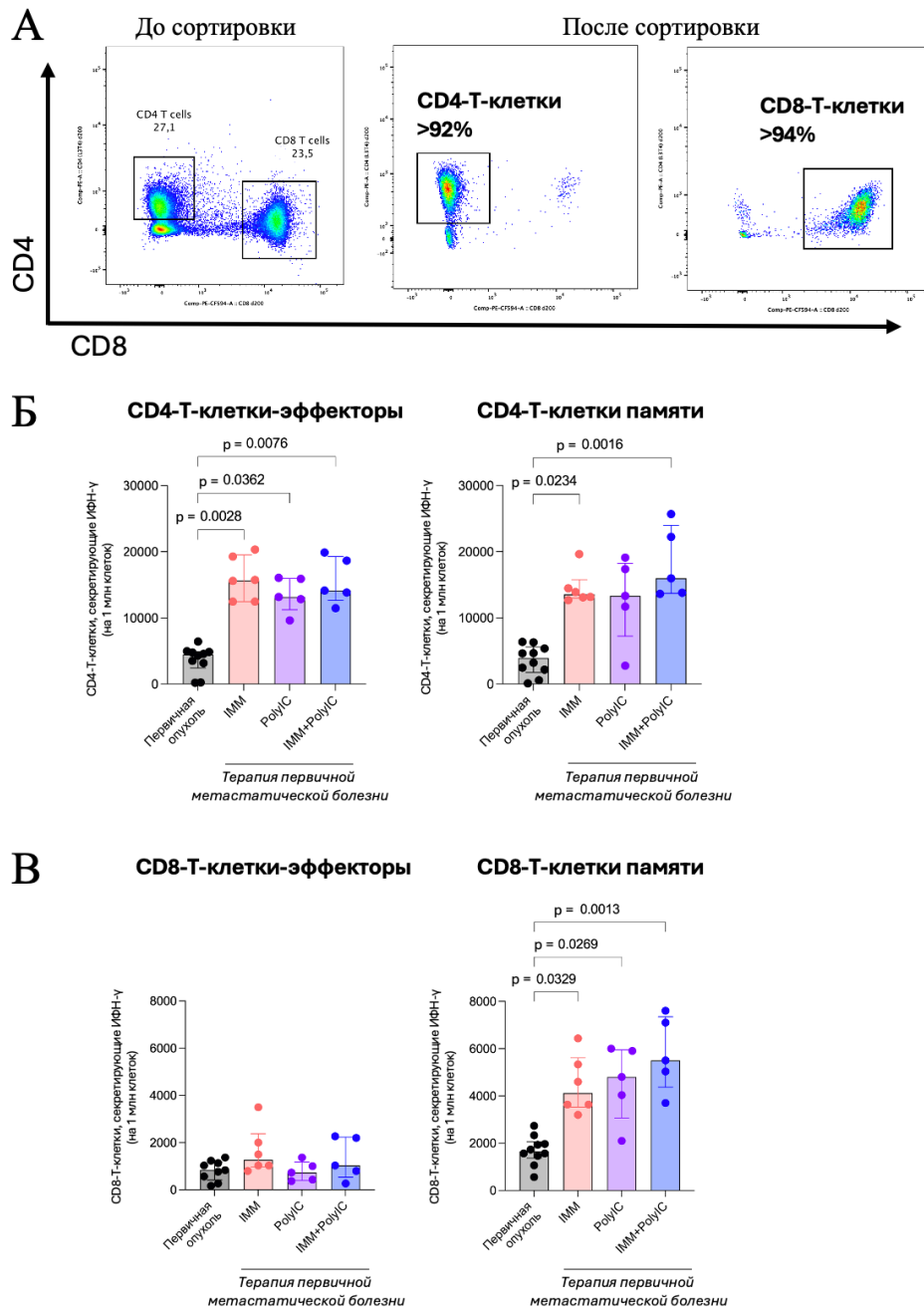
Во вторичных опухолях мышей *complete responders* было обнаружено большое количество Т-клеток, специфически реагирующих на антигены карциномы 4Т1. Т-клетки во вторичных опухолях демонстрировали мощный иммунный ответ против антигенов опухоли 4Т1 (рисунок 26).

Количество CD4-Т-клеток-эффекторов, секретирующих ИФН- γ , превышало 5500 (в расчете на 1 млн соответствующих Т-клеток) для всех *complete responders* независимо от того, чем их лечили во время первичной метастатической болезни. Среднее количество CD8-Т-клеток-эффекторов, секретирующих ИФН- γ , превышало 4000 (в расчете на 1 млн соответствующих Т-клеток), но интенсивность продукции ИФН- γ зависела от предыдущей терапии во время развития метастатического процесса. Количество CD8-Т-клеток-эффекторов у мышей *responders*, получавших IMM+Poly I:C было в 11,7 раз больше, чем у мышей с первичной опухолью, в 2 раза больше, чем при монотерапии агонистом TLR4 IMM и в 1,6 раза больше, чем при монотерапии агонистом TLR3 Poly I:C.

Количество антиген-специфичных CD4-Т-клеток памяти, способных распознавать антигены карциномы 4Т1 и в ответ на это распознавание секретировать ИФН- γ , также зависело от предыдущей терапии во время развития метастатического процесса (рисунок 26). Содержание CD4-Т-клеток памяти во вторичной опухоли у мышей *responders*, получавших иммунотерапию IMM+Poly I:C во время первичного метастатического процесса было 24,6 раз выше, чем у мышей из контрольной группы (первичная опухоль), в 1,3 раза и 1,2 раза выше по сравнению с мышами, получавшим терапию IMM или Poly I:C во время первичного метастатического процесса

соответственно. Количество антиген-реактивных CD8-Т-клеток памяти, способных распознавать антигены карциномы 4Т1 составило ~ 8740 (на 1 млн соответствующих клеток), что в 12,9 раз больше, чем у мышей, которые первый раз встретились с антигенами карциномы 4Т1 (первичная опухоль).

Специфические Т-клеточные реакции в дренирующей опухоли ЛУ были такие же интенсивные, как и во вторичных опухолях у мышей *complete responders* (рисунок 27).



А – стратегия сортировки CD4-Т-клеток и CD8-Т-клеток, и степени очистки отсортированных популяций из дренирующей опухоли ЛУ. Степень очистки популяций

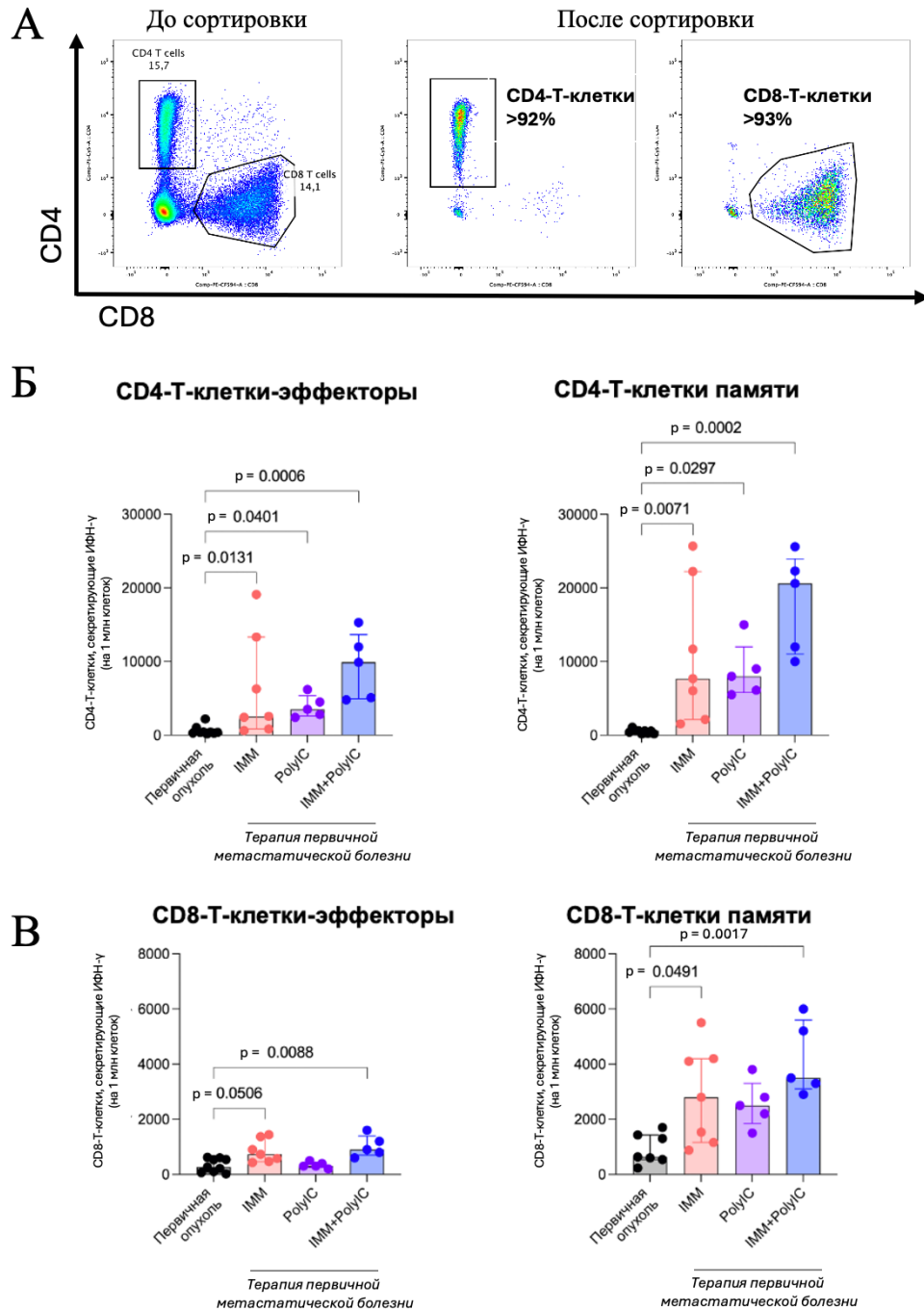
составляла 92%, 94%, соответственно; Б – количество CD4-Т-клеток-эффекторов и CD4-Т-клеток памяти; В – количество CD8-Т-клеток-эффекторов и CD8-Т-клеток памяти.

Рисунок 27 – Т-клеточные реакции, специфичные к антигенам карциномы 4Т1, в дренирующих опухоль ЛУ у мышей *complete responders*, излечившихся от метастатической болезни после проведения хирургической резекции и иммунотерапии IMM, Poly I:C, IMM+Poly I:C и у мышей контрольной группы с первичной опухолью

Количество CD4-Т-клеток-эффекторов, секретирующих ИФН- γ , превышало 13500 (в расчете на 1 млн соответствующих Т-клеток) для всех *complete responders* независимо от того, чем их лечили во время первичного опухолевого роста и метастатической болезни (рисунок 27 Б). Интенсивность продукции ИФН- γ была в 3,7 раза выше, чем у мышей с первичной опухолью. Среднее количество CD8-Т-клеток-эффекторов в ЛУ, секретирующих ИФН- γ , не изменялось в сравнении с мышами с первичной опухолью (рисунок 27 В).

Количество антиген-специфичных CD4-Т-клеток памяти в ЛУ, способных распознавать опухолевые антигены 4Т1 и в ответ на это распознавание секретировать ИФН- γ , не зависело от предыдущей терапии во время развития метастатического процесса. Содержание CD4-Т-клеток памяти в дренирующих опухоль ЛУ у мышей-*responders*, получавших иммунотерапию агонистами TLR во время лечения первичного метастатического заболевания, было 15200, что в 4,2 раз выше, чем у мышей контрольной группы с первичной опухолью (рисунок 27 Б). Количество антиген-реактивных CD8-Т-клеток памяти в ЛУ, способных распознавать антигены карциномы 4Т1 возрастало с 4400 до 5700 в зависимости от агониста TLR, используемого при терапии первичной метастатической болезни, что превышало ответы CD8-Т-клеток памяти у мышей с первичной опухолью более чем в 2,9 раз (рисунок 27 В).

На рисунке 28 представлены результаты исследования системных Т-клеточных реакций в селезенке мышей *complete responders*, излечившихся от первичной метастатической болезни после проведения хирургической резекции и иммунотерапии агонистами TLR (IMM, Poly I:C) и у контрольной группы мышей с первичной опухолью в ответ на антигены карциномы 4Т1.



А – стратегия сортировки CD4-T-клеток и CD8-T-клеток, и степени очистки отсортированных популяций. Степень очистки популяций составляла 92%, 93%, соответственно; Б – количество CD4-T клеток-эффекторов и CD4-T-клеток памяти; В – количество CD8-T-клеток-эффекторов и CD8-T-клеток памяти. Рисунок 28 – Т-клеточные реакции, специфичные к антигенам карциномы 4Т1 в селезенке мышей *complete responders*, излечившихся от метастатической болезни после проведения хирургической резекции и иммунотерапии IMM, Poly I:C, IMM+Poly I:C и у мышей контрольной группы с первичной опухолью

Специфические Т-клеточные реакции в селезенке не уступают в интенсивности продукции ИФН- γ этих же клеток во вторичных опухолях и

дренирующих опухоль ЛУ. Количество CD4-Т-клеток-эффекторов, секретирующих ИФН- γ , превышало 2500 (в расчете на 1 млн соответствующих Т-клеток) для всех *complete responders* независимо от того, чем их лечили во время первичной метастатической болезни (рисунок 28 Б). Интенсивность продукции ИФН- γ у мышей-*responders*, которых лечили киммунотерапией IMM+Poly I:C во время роста первичного метастатического процесса, была в 15,3 раза выше, чем у мышей с первичной опухолью. Среднее количество CD8-Т-клеток-эффекторов в селезенке, секретирующих ИФН- γ , превышало 735 (в расчете на 1 млн соответствующих Т-клеток), но интенсивность продукции ИФН- γ зависела от предыдущей терапии во время развития метастатического заболевания (рисунок 28 В). Количество CD8-Т-клеток-эффекторов у мышей-*responders*, получавших иммунотерапию IMM+Poly I:C было в 3,1 раза больше, чем у мышей с первичной опухолью, в 1,2 раза больше, чем при монотерапии агонистом TLR4 IMM и в 3 раза больше, чем при монотерапии агонистом TLR3 Poly I:C (рисунок 28 В).

Количество антиген-реактивных CD4-Т-клеток памяти, способных распознавать антигены карциномы 4Т1 и в ответ на это распознавание секретировать ИФН- γ , в среднем было 9000 у мышей, лечившихся монотерапией IMM или Poly I:C, и 18000 у мышей, которых лечили от метастатической болезни иммунотерапией агонистами IMM+Poly I:C (рисунок 28 Б). Интенсивность продукции ИФН- γ CD4-Т-клетками памяти у мышей, получавших IMM или Poly I:C была в 18,5 раз интенсивнее, а у мышей, получавших комбинацию IMM и Poly I:C в 37,4 раза сильнее, по сравнению с мышами, которые первый раз встретились с антигенами карциномы 4Т1 (первичная опухоль, рисунок 28 Б). Количество антиген-реактивных CD8-Т-клеток памяти, способных распознавать антигены карциномы 4Т1 возрастало с 2500 до 4100 в зависимости от агониста TLR, используемого при терапии первичной опухоли и метастатической болезни, что превышало ответы CD8-Т-клеток памяти у мышей с первичной опухолью более чем в 3,5 раза (рисунок 28 В).

Таким образом, все варианты экспериментальной иммунотерапии перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR первичной метастатической болезни вызывали интенсивные противоопухолевые адаптивные реакции CD4- и CD8-Т-клеток, направленные против антигенов карциномы 4Т1, которые способствовали формированию долговременной иммунной защиты спустя 280 дней, 8 месяцев, после первой встречи с опухолевым антигеном.

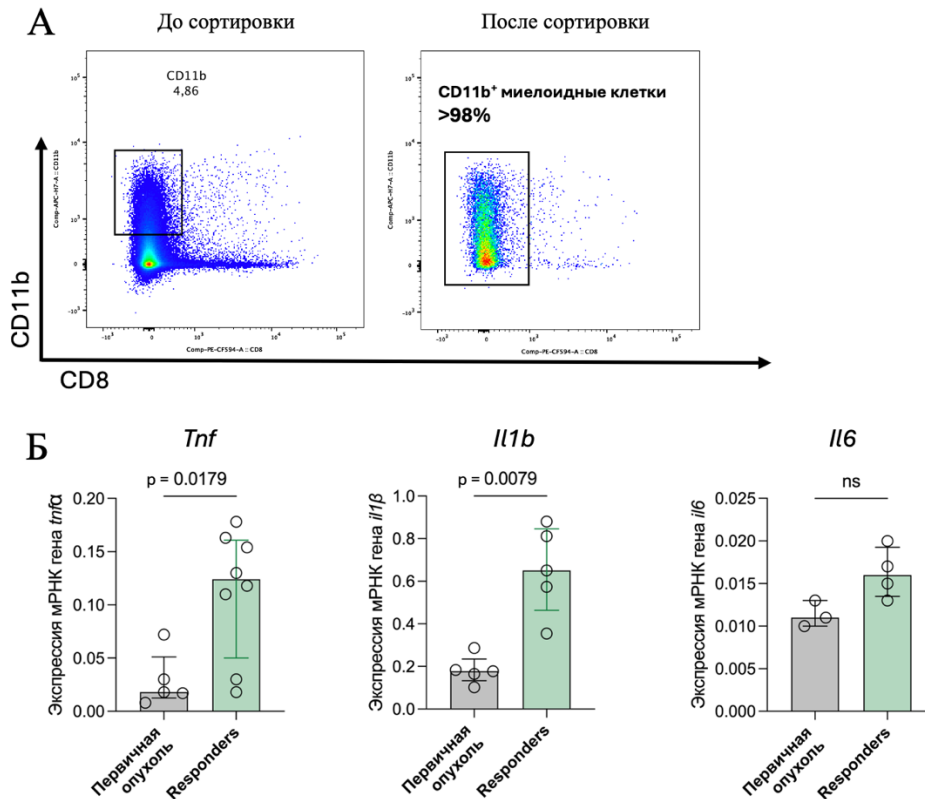
3.6.5. Анализ экспрессии факторов, определяющих функциональную поляризацию, в миелоидных клетках во вторичных опухолях у мышей-*responders*

Далее была проведена оценка функциональных свойств миелоидных клеток во вторичных опухолях у мышей *complete responders*, ранее ответивших на экспериментальную иммунотерапию агонистами TLR полным излечением от метастатической болезни. Известно, что миелоидные клетки, активно производящие цитокины TGF- β и IL-10, а также фермент Arg-1, являются иммуносупрессивными и способствуют прогрессии опухоли. Напротив, активированные МФ и ДК, производящие пероксинитрит и NO в результате активации фермента iNOS, а также секретирующие цитокин TNF- α , обладают прямым противоопухолевым действием и активно стимулируют адаптивные иммунные реакции Т-клеток против злокачественных клеток опухоли.

Для оценки различий противоопухолевого состояния миелоидных клеток от таких же клеток с иммуносупрессивной (про-опухолевой) активностью по профилю вырабатываемых ими цитокинов и ферментов были выполнены следующие эксперименты.

На 30-й день после повторного введения опухолевых клеток карциномы 4Т1 мышам *complete responders* из каждой индивидуальной вторичной

опухоли были выделены очищенные популяции $CD11b^+$ миелоидных клеток методом сортировки на проточном цитофлуориметре сортировщике. Чистота сортировки составила 98% (рисунок 29 А). Функциональные свойства выделенных клеточных популяций оценивали по уровню экспрессии функционально значимых генов.



А – стратегия сортировки $CD11b^+$ миелоидных клеток. Степень очистки составляла 98%;
 Б – экспрессия генов, отражающая провоспалительную активность миелоидных клеток.

Рисунок 29 – Экспрессия провоспалительных факторов в $CD11b^+$ миелоидных клетках, очищенных сортировкой из вторичных опухолей у мышей, леченых иммунотерапией агонистами TLR (*responders*), по сравнению с мышами с первичной опухолью, не получавших лечения

Очищенные сортировкой $CD11b^+$ миелоидные клетки, выделенные из индивидуальных опухолей, оценивали по экспрессии двух групп генов. Одна группа генов отражала провоспалительную активность миелоидных клеток опухоли – это цитокины TNF- α , IL-1 β , IL-6 (гены: *Tnf*, *Il1b*, *Il6*, соответственно, рисунок 29 Б). Другая группа генов кодирует факторы, по экспрессии которых можно судить о поляризации МФ в состояние M1 и M2, а ДК в состояние D1 и D2. Это гены *Inos*, *Arg1*, *Il10*, *Il12*, *Tgfb1*, кодирующие, соответственно, iNOS, Arg-1, цитокины IL-10, IL-12, TGF- β (рисунок 30).

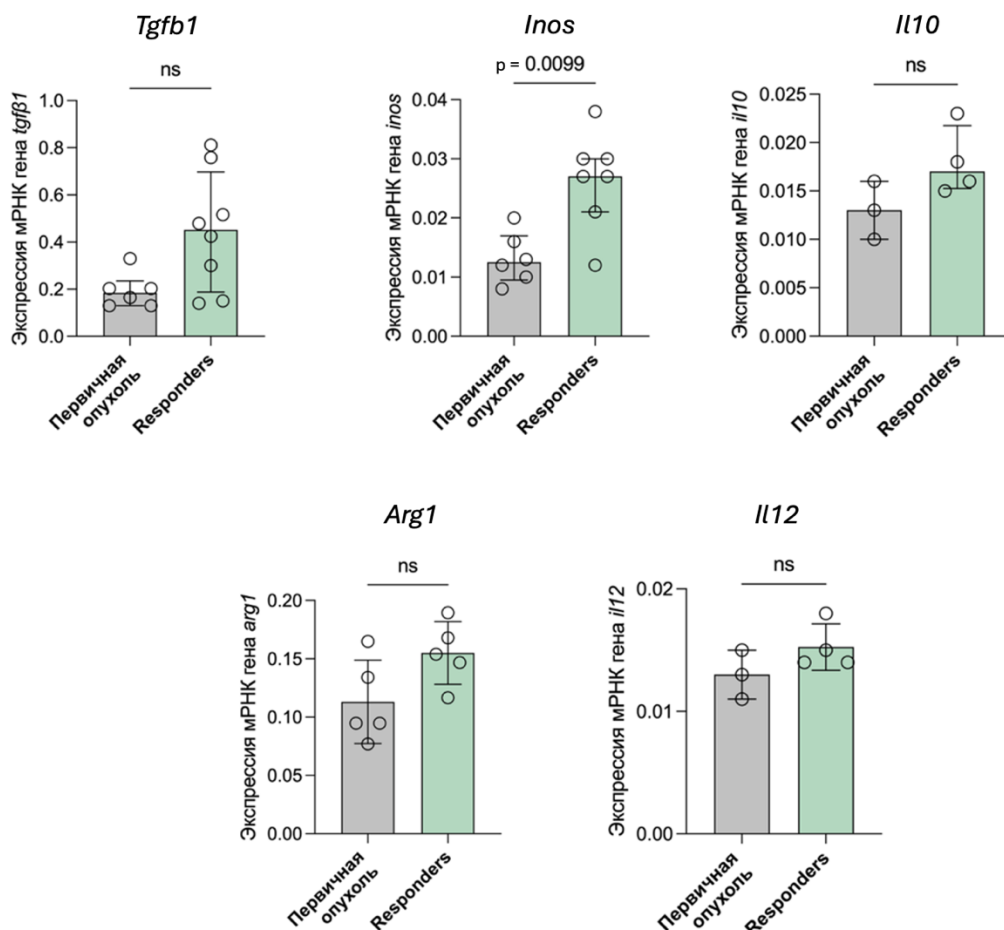


Рисунок 30 – Экспрессия факторов, определяющих функциональную поляризацию в $CD11b^+$ миелоидных клетках, очищенных сортировкой из вторичных опухолей у мышей, леченых агонистами TLR (*responders*), по сравнению с мышами с первичной опухолью, не получавших лечения агонистами

Результаты, представленные на рисунке 29, свидетельствуют о том, что миелоидные клетки в микроокружении вторичной опухоли у мышей-*responders*, которым после излечения от метастатической болезни повторно вводили опухолевые клетки 4T1, имитируя развитие рецидива, экспрессируют большое количество провоспалительных цитокинов $IL-1\beta$ и $TNF-\alpha$ (рисунок 29). Это несомненно является признаком провоспалительной активности миелоидных клеток.

Исследование экспрессии генов, кодирующих iNOS, Arg-1, цитокины TGF- β , IL-10, IL-12, со всей очевидностью показывает, что экспериментальная иммунотерапия агонистами TLR при лечении метастатической болезни способствует перепрограммированию миелоидных клеток из промоторов

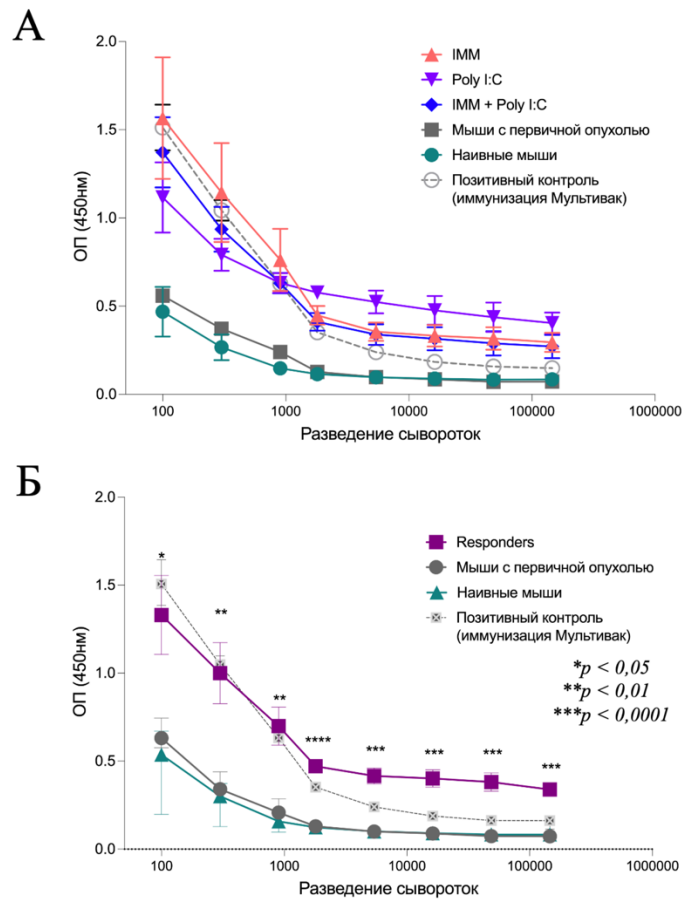
опухолевого роста в клетки, обладающие противоопухолевой активностью (рисунок 30).

Происходит функциональная поляризация миелоидных клеток в противоопухолевое состояние, характерное для M1 МФ и D1 ДК. Достоверно более высокий уровень экспрессии iNOS свидетельствует о более высокой противоопухолевой активности миелоидных клеток у мышей, которых ранее лечили агонистами TLR.

3.6.6. Анализ противоопухолевых антител, специфично связывающихся с антигенами карциномы 4T1 в модели рецидива

Наряду с Т-клеточными реакциями против антигенов карциномы 4T1, было исследовано наличие антител, специфично связывающихся с антигенами карциномы 4T1. Лечение первичной метастатической болезни у мышей экспериментальной иммунотерапией перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR4, TLR3 или их сочетанием способствует формированию противоопухолевых IgG-антител, которые при повторном введении опухолевых клеток появляются в сыворотках крови мышей *complete responders*. Антитела, способные связываться с антигенами лизата клеток 4T1, исследовали в реакции ИФА.

На рисунке 31 представлены измерения концентрации противоопухолевых антител в сыворотках крови мышей.



А – содержание противоопухолевых IgG-антител, специфично связывающихся с опухолевыми антигенами у мышей со вторичными опухолями, у мышей контрольной группы с первичными опухолями, не получавших лечения агонистами, у наивных здоровых мышей, у мышей, иммунизированных вакциной Мультивак; Б – среднее содержание противоопухолевых IgG-антител в группах мышей.

Рисунок 31 – Анализ сывороточных противоопухолевых IgG-антител, связывающихся с лизатом клеток карциномы 4T1

Анализ взаимодействия сывороточных антител с антигенами лизата злокачественных клеток карциномы 4T1 показал, что у мышей *complete responders*, леченых агонистами TLR при первичной метастатической болезни накапливалось большое количества антител к поверхностным и внутриклеточным антигенам злокачественных клеток 4T1. Титр антител, связывающихся с антигенами клеток карциномы 4T1 был выше 1:10 000 у всех *complete responders* независимо от того, чем их лечили во время первичной метастатической болезни (рисунок 31 А, Б). Такой высокий титр противоопухолевых IgG-антител был сопоставим с титром антител у мышей, иммунизированных противоопухолевой вакциной Мультивак (иммунизация

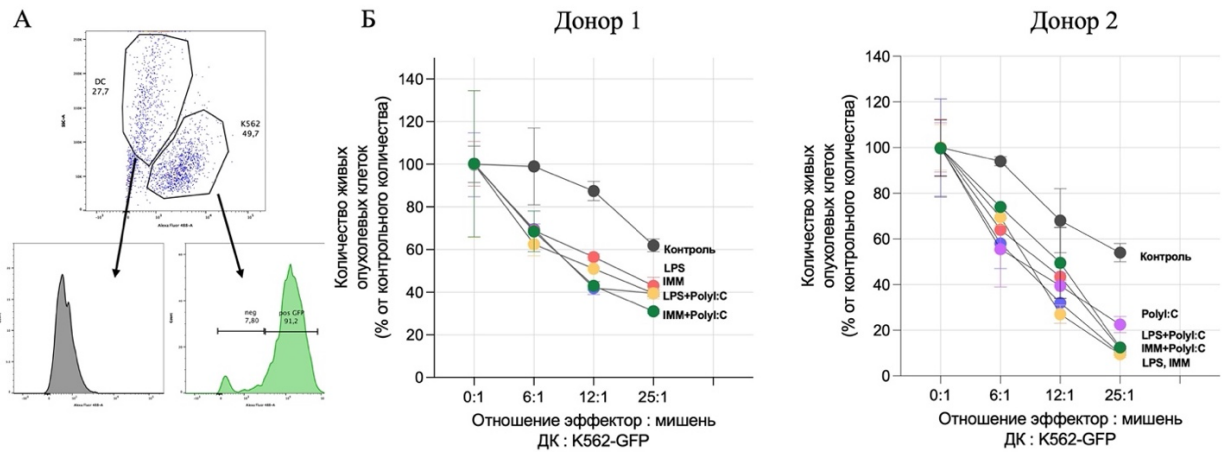
лизатом клеток карциномы 4Т1 в течение трех недель) [3, 6], что доказывает эффективность примененной иммунотерапии.

Таким образом, лечение карциномы 4Т1 экспериментальной иммунотерапией перепрограммированием миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции первичной опухоли индуцирует формирование IgG-антител, специфичных к антигенам опухоли.

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

В данном разделе в качестве примера представлены результаты эффективности иммунотерапии агонистами TLR на миелоидных клетках человека. Для этого были использованы ДК/МФ, выделенные из периферической крови двух здоровых доноров, которые культивировали с опухолевыми клетками K562-GFP, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок, для оценки их противоопухолевых свойств в цитотоксическом тесте. Для анализа активности ДК/МФ помещали в лунки планшета с 450 опухолевыми клетками K562-GFP (рисунок 32 А). В часть культур вносили ЛПС (200 нг/мл), IMM (200 нг/мл), Poly I:C (5 мкг/мл) или комбинацию двух агонистов IMM+Poly I:C/ЛПС+Poly I:C для активации их цитотоксических свойств.

На рисунке 32 представлены данные о противоопухолевом действии TLR-активированных ДК/МФ на клетки миелолейкоза человека K562-GFP.



А – репрезентативные цитометрические изображения совместной культуры ДК/МФ с опухолевыми клетками K562-GFP; Б – цитотоксическое действие ДК/МФ относительно опухолевых клеток K562-GFP по двум здоровым донорам.

Рисунок 32 – Цитотоксическое действие TLR-активированных ДК и МФ, выделенных из периферической крови здоровых доноров, на клетки миелолейкоза человека K562-GFP

Совместное культивирование клеток миелолейкоза человека K562-GFP с ДК/МФ, активированных агонистами TLR (ЛПС, IMM или Poly I:C) как по отдельности, так и в комбинации, приводило к выраженному подавлению жизнеспособности и роста опухолевых клеток K562-GFP. Цитотоксическая активность ДК/МФ была прямо пропорциональна соотношению эффекторов и мишеней: уже при соотношении 6:1 наблюдался значительный противоопухолевый эффект, вплоть до полной элиминации клеток K562-GFP. Влияние агониста TLR3 – Poly I:C – было неоднозначным, что не позволяет сделать однозначный вывод о его противоопухолевой активности. Наилучшая активация цитотоксических свойств ДК/МФ достигалась при комбинированном воздействии агонистов TLR3 и TLR4. ДК/МФ, полученные из периферической крови здоровых доноров, под влиянием TLR агонистов, были способны подавлять рост опухолевых клеток карциномы 4T1 на 80%.

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

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Современные представления в области опухолевого иммунитета предполагают интерпретацию злокачественных новообразований не как изолированных клональных популяций, а как сложных, динамически организованных биологических систем. Опухолевые клетки активно взаимодействуют с разнообразными иммунными, стромальными и эндотелиальными клетками, а также с компонентами внеклеточного матрикса. Иммуноterapia злокачественных новообразований, нацеленная на модуляцию компонентов опухолевого микроокружения, в последние годы привлекла значительное внимание как один из ключевых подходов к преодолению устойчивости опухолей к лечению [70, 177]. Особую роль в формировании иммуносупрессивной среды и регуляции противоопухолевого иммунного ответа играют миелоидные клетки — МФ и ДК, — обладающие высокой пластичностью и способностью адаптироваться к микроокружению опухоли [107]. Их функциональное состояние в значительной степени определяет исход взаимодействия между опухолью и клетками иммунной системы. При злокачественном росте эти клетки часто приобретают иммуносупрессивный, проангиогенный и провоспалительный фенотип, способствующий прогрессии опухоли и подавлению адаптивного иммунного ответа [48].

В условиях, когда традиционные подходы к иммунотерапии (включая ингибиторы контрольных точек и CAR-T-клетки) демонстрируют ограниченную эффективность при некоторых типах опухолей, в особенности солидных с выраженным иммуносупрессивным микроокружением, возрастает интерес к стратегиям переключения функций врождённых иммунных клеток [1, 16, 21, 74, 77, 78, 177]. Одним из перспективных подходов является использование агонистов Toll-подобных рецепторов, способных инициировать переориентацию миелоидных клеток из иммуносупрессивного в провоспалительный, противоопухолевый фенотип [55, 118, 177].

В связи с этим активная разработка стратегий перепрограммирования миелоидных клеток с целью восстановления их антигенпрезентирующих и провоспалительных свойств представляет собой перспективное направление современной онкоиммунологии.

4.1. Характеристика экспериментальной модели метастатической карциномы 4Т1

Модель карциномы молочной железы 4Т1 у мышей BALB/с широко используется в онкоиммунологических исследованиях как адекватная имитация трижды негативного подтипа РМЖ у человека [131]. Одним из ключевых свойств данной модели является её способность к спонтанному метастазированию преимущественно в лёгкие, что воспроизводит один из важнейших клинических аспектов агрессивных форм РМЖ [109, 131].

В настоящем исследовании установлено, что подкожное введение 15 тысяч клеток линии 4Т1 сопровождается быстрым прогрессированием опухоли и формированием множественных метастазов в лёгких уже к 11 дню после имплантации. Все животные погибали от множественных метастазов в среднем в течение 25–30 дней после введения злокачественных клеток. Средний темп роста опухоли и масса опухоли были сопоставимы с ранее опубликованными данными [76], что подтверждает воспроизводимость модели.

Как известно, развитие полноценной иммунной реакции в ответ на иммунизацию требует не менее 2-х недель [3]. Следовательно, ко времени ожидаемого противоопухолевого иммунного ответа у мышей с карциномой 4Т1 уже разовьется не только большая солидная опухоль, но и произойдет распространение множественных метастазов этой опухоли в ЛУ, селезенку, легкие и в другие органы.

Исследование клеточного состава опухолевого микроокружения показало преобладание миелоидных клеток, прежде всего МФ и MDSC, что соответствует иммуносупрессивному фенотипу так называемого «холодного» опухолевого микроокружения с низким уровнем воспаления и недостаточной эффективностью Т-клеточного ответа [53]. Доминирующее представительство CD11b⁺ миелоидных клеток, включая гранулоцитарные MDSC, и TAM, свидетельствует о поляризации клеток в сторону супрессивных подтипов, типичных для опухолей с высоким уровнем TGF- β и IL-10 [120, 132]. Одновременно в составе опухолевой ткани было обнаружено низкое количество CD8-Т-клеток и зрелых ДК (CD11c⁺), что может быть обусловлено наличием физических и метаболических барьеров к инфильтрации лимфоцитов, а также активной экспрессией хемокинов, удерживающих иммуносупрессивные популяции [90]. Схожий клеточный профиль был обнаружен в легких мышей, в которых преобладали CD11b⁺ миелоидные клетки: MDSC и альвеолярные МФ. Иначе говоря, в опухоли и метастатических нишах будет поддерживаться иммуносупрессивное микроокружение за счет инфильтрации регуляторными Т-клетками, незрелыми миелоидными предшественниками MDSC, TAM и другими типами миелоидных клеток способствующие росту злокачественных клеток и ингибированию цитотоксических реакций иммунными клетками.

Таким образом, полученные данные подтверждают, что модель 4Т1 у мышей BALB/с воспроизводит основные характеристики агрессивного, метастазирующего, иммуносупрессивного фенотипа опухолевого микроокружения, что делает её адекватной платформой для оценки эффективности подходов, направленных на перепрограммирование миелоидных клеток.

4.2. Влияние иммунотерапии агонистами TLR3 и TLR4 на рост и метастазирование опухоли, а также на выживаемость мышей-опухоленосителей

Toll-подобные рецепторы играют ключевую роль в активации врождённого иммунитета и запуске последующего адаптивного ответа, выступая в качестве сенсоров патоген-ассоциированных молекулярных структур и эндогенных сигналов опасности. Агонисты TLR рассматриваются как потенциальные иммунотерапевтические агенты, способные переориентировать иммуносупрессивные миелоидные клетки опухолевого микроокружения в провоспалительный и противоопухолевый фенотип [96, 167, 177].

Чтобы усилить иммунный ответ против антигенов опухоли были использовали агонисты врожденных Toll-подобных рецепторов – агонист TLR3 Poly I:C, агонист TLR4 ИММ. Как известно, Poly I:C непосредственно активирует ДК, а также запускает НК-клетки для уничтожения опухолевых клеток [39]. Помимо распознавания эндосомным TLR3 [39, 164], он индуцирует усиление экспрессии ИФН I типа и активирует несколько ядерных и цитоплазматических ферментных систем (OAS, RIG I хеликазу и MDA5), которые участвуют в противовирусных и противоопухолевых защитных реакциях [92]. Агонист TLR4 ИММ - кислый пептидогликан, выделенный из растительного сырья, имеет молекулярную массу более 1 млн Да, оказывает прямое активирующее действие на ДК и МФ [4, 10, 12, 19]. ИММ действует на клетки через рецептор TLR4, что было доказано с использованием специальных клеточных линий НЕК-Blue, экспрессирующих только один из рецепторов: TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 или TLR9 [30]. Важно, что сами препараты не оказывают значительного влияния на жизнеспособность и рост опухолевой линии 4T1 [8, 30].

В рамках настоящей работы мышам вводили опухолевые клетки 4T1 для индукции роста опухолей и проводили иммунотерапию ИММ и Poly I:C.

Полученные результаты не показали эффективности использования этого подхода. Введение агонистов TLR3 и TLR4 не влияло на частоту возникновения солидной опухоли 4T1, скорость ее роста и на выживаемость животных.

Прямой подход при использовании иммунотерапии агонистами TLR не показал успеха. Поэтому для повышения вероятности развития иммунного ответа против антигенов опухоли и заметного влияния иммунного ответа на прогрессию опухолевого заболевания, снижали антигенную нагрузку резекцией опухоли.

4.3. Эффективность экспериментального подхода: перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR после хирургической резекции опухоли

Перепрограммирование миелоидных клеток агонистами TLR после хирургической резекции опухоли представляет собой перспективную стратегию борьбы с метастатическим процессом и минимальными остаточными опухолевыми очагами. Учитывая агрессивный характер 4T1 карциномы, сопровождающейся ранним метастазированием в лёгкие, селезенку, печень и костный мозг, разработка таких комбинированных подходов является актуальной задачей онкоиммунологии [76, 131].

Хирургическая резекция опухоли существенно сокращала общую массу злокачественной ткани в организме мыши и увеличивала продолжительность жизни животных с карциномой 4T1 до 2 месяцев. Однако простое удаление опухоли не приводило к полному излечению от опухолевого процесса, что обусловлено наличием в нескольких тысячах 4T1 КОЕ в легких на момент удаления опухоли и 250 тысяч, 15 тысяч, 60 метастатических КОЕ в легких, дренирующем опухоль ЛУ и селезенке к моменту гибели животных, соответственно. Таким образом, оригинальность результата состоит в том, что

было показано развитие метастатического процесса после удаления первичной опухоли.

Как правило, злокачественные метастазирующие опухоли подавляют иммунные реакции, создают мощное иммуносупрессивное микроокружение, защищающее злокачественные клетки [8, 80]. Свой «побег» или защиту от иммунитета опухоли совершают самыми разными способами: нарушают презентацию опухолевых антигенов на злокачественных клетках, убирают с поверхности злокачественных клеток молекулы МНС, привлекают в опухоль клетки-регуляторы (супрессоры), тормозящие иммунные реакции, экспрессируют на клеточной поверхности или выделяют в жидкую фазу факторы, которые либо блокируют функцию иммунных клеток, либо индуцируют их гибель [113]. Словом, злокачественные опухоли прибегают к целому ряду разнообразных ухищрений, чтобы избежать иммунной атаки, заблокировать ее или вовсе не дать ей развиваться. В таких иммуносупрессивных условиях индуцировать иммунные реакции против антигенов опухоли непросто. Необходимо предпринять специальные меры: обеспечить высвобождение антигенов опухоли и презентацию антигенных эпитопов в комплексе с МНСI и МНСII на поверхности антиген-презентирующих клеток (МФ, ДК), активировать профессиональные антиген-презентирующие клетки, чтобы на их поверхности появились коактивационные рецепторы CD40, CD80, CD86, необходимые для индукции ответа Т-клеток, стимулировать продукцию антиген-презентирующими клетками цитокинов, которые необходимы для полноценной активации Т-клеток, распознавших антиген и получивших коактивационный сигнал через контакт с CD40, CD80, CD86 [8, 17, 30, 156]. Наконец, реализация полноценного адаптивного иммунитета против опухолевых антигенов требует преодоления иммуносупрессивной среды, формируемой прогрессирующим злокачественным процессом.

Считается, что после хирургической резекции опухоли происходит кратковременное снижение системного иммунного ответа, вызванное уменьшением антигенной нагрузки и провоспалительного сигнального фона

[46]. В такой ситуации дополнительная стимуляция рецепторов TLR может служить «вакциноподобным» усилителем, инициируя переактивацию миелоидных и лимфоидных клеток, направленную на элиминацию остаточных опухолевых клеток и метастазов [11].

Как было сказано ранее, простой резекции первичной опухоли было недостаточно для того, чтобы уменьшить опухолевую антигенную нагрузку на организм мышей, что в результате показало развитие множественных метастазов, что в дальнейшем сопровождалось гибелью всех животных. Поэтому на следующем этапе работы была предпринята попытка комбинированного лечения карциномы 4Т1 посредством резекции первичной опухоли и иммунотерапии агонистами IMM и Poly I:C. Известно, что прямое действие использованных агонистов TLR4 и TLR3 (IMM и Poly I:C) направлено на МФ и ДК [4, 5, 30, 156]. Поэтому воспользовались таким подходом для лечения злокачественного метастатического процесса с целью перепрограммирования миелоидных клеток из пособников опухоли в противоопухолевых киллеров. Было показано, что резекция солидной опухоли на 11-й день после подкожного введения 15 тысяч клеток линии 4Т1 в сочетании с семикратным введением агонистов TLR3 и/или TLR4 статистически значимо ($p=0,0001$) увеличивает медиану выживаемости мышей до 64 дней (Poly I:C), 70 дней (IMM) и 95 дней (IMM+Poly I:C). Но что важнее, такой подход приводил к выздоровлению от летальной метастатической болезни 25% мышей при монотерапии IMM, 32% при монотерапии Poly I:C и 50% при иммунотерапии IMM+Poly I:C. Таким образом, у 25–50% животных наблюдали полное выздоровление, они избавлялись от множественных метастазов и оставались клинически здоровыми в течение всего периода наблюдения – более 250 дней (приблизительно 2/3 жизни мышей). Таких мышей называли *complete responders* (*responders*) – то есть те, кто успешно ответил на иммунотерапию агонистами TLR и полностью избавился от метастатической болезни.

Таким образом, в проведённой работе было показано, что экспериментальная иммунотерапия путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR после хирургической резекции опухоли значительно повышает выживаемость мышей по сравнению как с хирургией без иммунотерапии, так и с монотерапией агонистами TLR. Данный эффект наиболее выражен при использовании комбинации Poly I:C и IMM, что предполагает активацию сразу нескольких ключевых сигнальных путей и восстановление контроля над метастатическими очагами после устранения иммуносупрессивного влияния первичной опухоли.

Ранее уже было показано, что резекция первичной опухоли способна продлевать жизнь мышей, а применение иммунотерапии агонистом TLR4 IMM способствовало выживаемости 30% мышей [129]. Однако оригинальность результата состоит в том, что были обнаружены более эффективные способы иммунотерапии посредством использования комбинированного лечения агонистами IMM и Poly I:C, и сроки наблюдения доказывают полное излечение от метастатической болезни без признаков рецидива заболевания.

В литературе имеется ряд свидетельств, что после резекции опухоли введение Poly I:C усиливает продукцию ИФН I типа, приводит к активации ДК и повышению представленности опухолевых антигенов CD8-Т-клеткам [17, 19, 165]. Аналогично, после резекции опухоли введение агониста TLR4 может восстанавливать активность МФ и НК-клеток, сниженных в условиях первичной опухоли [161].

В рамках настоящего исследования установлено, что наиболее выраженный противоопухолевый эффект достигается при иммунотерапии агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции опухоли, в то время как монотерапия демонстрировала эффективность в 2 раза ниже. Это согласуется с гипотезой о необходимости множественной стимуляции врождённого иммунитета для преодоления устойчивой иммуносупрессии в метастатических нишах. Вероятно, такая стратегия усиливает перекрёстную

презентацию антигенов, рекрутирование цитотоксических лимфоцитов и формирование эффекторной Т-клеточной памяти [36].

Особенно важно отметить, что применение агонистов TLR сопровождалось значительным уменьшением количества метастазов в лёгких. Это может быть обусловлено не только прямым иммуностимулирующим действием, но и подавлением циркулирующих опухолевых клеток через активацию противоопухолевых эффекторов врождённого и адаптивного иммунитета. Poly I:C, как синтетический аналог двухцепочечной РНК, активирует TLR3, преимущественно экспрессируемый на ДК и эпителиоцитах, индуцируя продукцию ИФН- β и последующую активацию цитотоксических клеток [156, 159]. ИММ, в свою очередь, активируя TLR4 на МФ и других миелоидных клетках, усиливает секрецию IL-12 и TNF- α , способствуя Th1-поляризации иммунного ответа [156].

Таким образом, полученные результаты подтверждают перспективность использования агонистов TLR3 и TLR4 в качестве средств иммунотерапии агрессивных солидных опухолей. В условиях модели карциномы 4Т1 их применение приводит к существенному ингибированию опухолевого роста, уменьшению метастазирования и увеличению выживаемости животных.

4.4. Активация противоопухолевых свойств миелоидных клеток под влиянием агонистов TLR

Одним из центральных механизмов реализации противоопухолевых эффектов агонистов TLR в настоящем исследовании стало их влияние на фенотип и функцию миелоидных клеток опухолевого микроокружения — в первую очередь МФ и ДК. В норме миелоидные клетки играют решающую роль в инициации и поддержании иммунного ответа, однако в условиях опухоли они нередко приобретают иммуносупрессивный фенотип, способствующий росту и метастазированию опухоли [71, 104].

Ранее были опубликованы работы, показывающие перепрограммирование функционального состояния МФ из проопухолевого M2-фенотипа в противоопухолевых бойцов M1-фенотипа агонистами TLR [8, 17, 30]. Цель перепрограммирования заключается в конверсии многочисленных клеточных компонентов микроокружения опухоли и метастатических ниш из факторов, способствующих прогрессирующему росту новообразования, в эффективных киллеров противоопухолевого ответа. МФ и ДК сами облагают сильными цитотоксическими свойствами. Ранее было показано, что существует два механизма противоопухолевой активности ДК: через синтез короткоживущих активных радикалов азота - пероксинитритов, а также через синтез долгоживущего ИФН первого типа – ИФН- β [17, 30]. Показано, что эти факторы индуцируют апоптоз опухолевых клеток, а также дополнительную супрессию их роста и пролиферации [17, 30]. Поэтому была проверена гипотеза о том, что использованные IMM и Poly I:C переключают программу миелоидных клеток в состояние M1/D1-киллеров в метастатических нишах, что приводит к полному излечению от метастатической болезни. Было выявлено, что выделенные сортировкой из ткани легких мышей контрольной группы и мышей с карциномой 4T1 *in vitro* TLR-активированные ДК CD45⁺ CD11c⁺ F4/80⁺ Ly6C⁻ Ly6G⁻ I-A/I-E⁺ и МФ CD45⁺ CD11b⁺ CD11c⁻ F4/80⁺ Ly6C⁺ Ly6G⁻ I-A/I-E⁺ обладают высокой противоопухолевой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток карциномы 4T1-GFP. Также, было показано, что при *in vivo* активации IMM+Poly I:C ДК CD45⁺ CD11c⁺ F4/80⁺ Ly6C⁻ Ly6G⁻ I-A/I-E⁺ и МФ CD45⁺ CD11b⁺ CD11c⁻ F4/80⁺ Ly6C⁺ Ly6G⁻ I-A/I-E⁺ высоко эффективно элиминируют клетки карциномы 4T1-GFP. Эти данные свидетельствуют о перераспределении функционального статуса миелоидного звена от иммуносупрессии к активному антиген-презентирующему и провоспалительному состоянию [137].

Конечно, это не единственный механизм, благодаря которому мыши выздоравливают от летального злокачественного процесса. Известно, что

ИММ и Poly I:C повышают экспрессию коактивационных молекул CD40, CD80, CD86, МНСII на поверхности ДК и МФ, стимулирует выработку иммуностимулирующих цитокинов и хемокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-10, IL-12, IL-8, моноцитарный хемотаксический фактор-1, макрофагальный воспалительный белок-1, RANTES) [4, 5, 8, 10, 11, 12, 17, 19, 20, 30, 156]. Эти МФ и ДК с помощью своих цитокинов могут активировать противоопухолевые свойства вторичных клеток-мишеней – Т-клеток и НК-клеток [8, 10, 153]. Совокупность этих механизмов обеспечивает высокую эффективность применения перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR4 и TLR3 при терапии карциномы 4T1.

4.5. Влияние экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR на Т- и В-клеточные звенья иммунитета

Наряду с активацией врождённых компонентов иммунной системы, успешная противоопухолевая терапия требует мощной мобилизации адаптивного иммунного ответа, прежде всего цитотоксических CD8-Т-клеток, CD4-Т-хелперов и, в ряде случаев, В-клеток. Одной из задач исследования являлась оценка способности терапии с применением TLR3 и TLR4 агонистов к активации этих ключевых звеньев иммунитета.

Молекулярные и клеточные механизмы, определяющие уровень иммунного ответа на антигены, хорошо изучены. Они ассоциированы с генами МНС и их продуктами, представленными на поверхности антиген-презентирующих клеток [35, 134]. Если небольшие фрагменты антигена в виде пептидов размером 8–10 аминокислотных остатков прочно удерживаются в белках МНС класса I, то такой комплекс МНС с антигенным пептидом будет распознаваться CD8-Т-клетками [155]. Аналогично, небольшие фрагменты антигена в виде пептидов размером от 13 до 25 аминокислотных остатков

последовательные этапы единого процесса адаптивного Т-клеточного ответа на антигенный стимул. После получения всех необходимых сигналов активации наивные Т-клетки подвергаются клоновой экспансии и дифференцировке в эффекторные Т-лимфоциты. Именно эффекторные Т-клетки обеспечивают противоопухолевую защиту за счет секреции цитокинов, цитотоксической активности и индукции высокоаффинных антител. Следовательно, эффективная индукция Т-клеток-эффекторов в ответ на иммунотерапию агонистами TLR после хирургической резекции первичной опухоли может обеспечить эффективное терапевтическое действие.

Т-клетки памяти формируются из эффекторных Т-лимфоцитов на поздних этапах адаптивного иммунного ответа и играют ключевую роль в терапевтической эффективности. Создание значительного пула Т-клеток памяти, способных распознавать опухолевые антигены и реактивироваться с генерацией новых эффекторных Т-клеток, обеспечивает долговременную защиту от рецидива. Обеспечивая персистенцию в организме на протяжении лет, Т-клетки памяти осуществляют иммунный надзор за латентными злокачественными клетками, предотвращая их реактивацию и метастатическую диссеминацию.

Дренирующие опухоль лимфатические узлы считаются не только «пассивным фильтром» для метастатических клеток, но и активным участником противоопухолевого иммунного ответа — именно здесь происходит презентация антигенов опухоли, активация Т-клеток, формирование памяти и, одновременно, создание местной иммуносупрессии.

В условиях иммунотерапии Poly I:C и IMM у мышей наблюдалось увеличение числа CD8-Т-клеток с фенотипом цитотоксических лимфоцитов, секретирующих ИФН- γ в селезенке, а также повышение доли CD4-Т-хелперов в ЛУ. Увеличение продукции ИФН- γ свидетельствовало о восстановлении цитотоксической функции, критически необходимой для лизиса опухолевых клеток [26].

Известно, что у мышей линии BALB/c специфические IgG-антитела начинают формироваться примерно к концу второй недели после первичной иммунизации, что соответствует классическому переключению с продукции IgM на IgG и развитию адаптивного иммунного ответа [29, 79]. Накопление IgG-антител отражает активацию В-клеток и процесс аффинной селекции в ЛУ [94]. Экспериментальная иммунотерапия способствовала повышению уровня антителообразования почти на порядок. Вместо титра 1:100-200, который наблюдался у мышей, получавших физиологический раствор, у лучших ответчиков на иммунотерапию титр составлял 1:800-1000. При этом этот уровень оставался значительно ниже титра антител после иммунизации вакциной Мультивак из тех же клеток карциномы 4Т1 [3, 6]. Титры позитивной сыворотки составляли приблизительно 1:5000.

Следовательно, экспериментальная иммунотерапия агонистами TLR демонстрирует мощные противоопухолевые реакции как CD4-Т-клеток, так и CD8-Т-клеток, а именно индукцию Th1- и цитотоксических CD8-Т-клеточных ответов против опухоли. А также, Th1-поляризация индуцирует выработку противоопухолевых IgG-антител. Но важно отметить, иммунотерапия агонистами TLR ИММ и Poly I:C после хирургической резекции опухоли эффективна не у всех мышей.

4.6. Эффективность экспериментальной иммунотерапии путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR – модель рецидива

В настоящем исследовании была использована модель рецидива опухоли, основанная на повторном введении опухолевых клеток мышам, успешно излечившимся от злокачественного процесса после экспериментальной иммунотерапии. Используемый подход обеспечивает воспроизведение клинически значимого этапа повторного прогрессирования

после первичного подавления опухолевого роста и создает условия для исследования механизмов резистентности и характеристик иммунного ответа в условиях рецидива. Повторное введение опухолевых клеток животным, ранее подвергшихся терапии, создаёт условия для оценки эффективности долгосрочной противоопухолевой защиты и выявления факторов, способствующих повторному росту опухоли. Модель рецидива является важным инструментом для тестирования новых подходов к иммунотерапии, направленных на предотвращение повторного возникновения опухоли и метастазирования. В частности, она позволяет исследовать влияние микроокружения и иммунного статуса после первичного лечения на развитие повторного злокачественного заболевания. Использование данной модели способствует выявлению ключевых клеточных и молекулярных механизмов, участвующих в формировании устойчивости опухоли к терапии. Кроме того, она даёт возможность оценить потенциал терапевтических стратегий в условиях повторного роста опухоли. Таким образом, модель рецидива опухоли у мышей является необходимым этапом для более полного понимания динамики опухолевого процесса и разработки эффективных методов профилактики повторного заболевания.

Следовательно, для более полного понимания динамики иммунного ответа и формирования иммунологической памяти при рецидиве опухоли важно рассмотреть модели с периодом наблюдения более 250 дней, 8 месяцев, что обеспечивает оценку долгосрочной защиты и устойчивости к повторному росту опухоли. В таблице 6 представлены основные характеристики таких моделей.

Таблица 6 – Сравнительная таблица экспериментальных моделей, в которых исследовалось формирование долгосрочной иммунологической памяти

№	PMID	Модель опухоли	Терапия	Период наблюдения	Ключевые параметры	Модель рецидива
1	PMID: 36635337	4T1	TLR5-агонист + ICB/ CBLB502	≥18 нед (60+ недель)	Сывороточные факторы: CXCL5, G-CSF, IL-15	Да
2	PMID: 30540940	MB49, B16F10	STING-агонист	>250 дней	Образование CD8-Т-клеточной памяти, индукция ИФН-γ, устойчивость к повторной опухоли	Да
3	PMID: 25428507	MC38	Anti-PD-1 + Anti-CTLA-4	до 300 дней	CD8-Т-клетки памяти, антиген-специфичные Т-клетки	Да
4	PMID: 28678784	B16F10	Неоантигенная мРНК-вакцина	200+ дней	Поликлональный CD8-Т-клеточный ответ	Да
5	PMID: 25527249	ТС-1 (HPV E7)	Вакцинация TriVax-HPV +PolyI:C +анти-CD40	>270 дней	CD8-E7-специфическая память	Да
6	PMID: 39849091	B16F10	TLR7/8 + анти-PD-1	250+ дней	CD8-Т-клетки памяти, индукция ИФН I типа	Да

В исследовании анализировались схожие параметры, что позволило получить данные о формировании устойчивого иммунного ответа у мышей после первичной иммунотерапии и повторного введения опухолевых клеток.

Как было указано выше, полное излечение 25–50% животных от метастатической болезни связано с цитотоксическим эффектом тканевого микроокружения на единичные КОЕ карциномы 4T1. Выжившие мыши продолжали жить без каких-либо признаков рецидивирующего заболевания на протяжении 250 дней наблюдения. Поэтому было сделано предположение, что у таких животных могла сформироваться долговременная иммунная память на антигены карциномы 4T1 после проведения иммунотерапии агонистами TLR

после хирургической резекции первичной опухоли. В связи с этим мышам *complete responders* повторно вводили клетки карциномы 4Т1.

Практически у всех *complete responders* наблюдался замедленный рост вторичной опухоли. В группе, излечившихся от метастатической болезни с помощью иммунотерапии перепрограммирования миелоидных клеток агонистом TLR4 IMM внешний размер опухолей, измеренный при жизни животных, уменьшался в среднем на 82%, у излечившихся с помощью терапии агонистом TLR3 Poly I:C на 51%, у излечившихся с помощью комбинации IMM и Poly I:C на 73% по сравнению с контрольной группой мышей с первичной опухолью. При этом у части мышей опухоль не вырастала вовсе или вырастала, а затем регрессировала. Таким образом, эффективность формирования иммунной памяти в отношении антигенов карциномы 4Т1 была значительно выше при экспериментальной иммунотерапии IMM или сочетанием двух агонистов IMM+Poly I:C.

4.7. Влияние экспериментальной иммунотерапии перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR на формирование долговременной иммунной памяти

Успешная противоопухолевая терапия требует не только активации врождённых компонентов иммунной системы, но и мощной мобилизации адаптивного иммунного ответа. В первую очередь это относится к Т-клеткам памяти и противоопухолевым антителам. Одной из задач данного исследования являлась оценка степени активации этих ключевых звеньев и формирования иммунологической памяти, обеспечивающей долгосрочный контроль над опухолью, при терапии с использованием агонистов TLR3 и TLR4.

Через 250 дней после первичного лечения мышам повторно вводились опухолевые клетки. У животных, ранее получавших иммунотерапию Poly I:C

и IMM, *complete responders*, отмечалась повышенная резистентность к повторному росту опухоли, сопровождающаяся активацией и повышенной инфильтрацией CD4- и CD8-Т-клеток. Содержание этих клеток возрастало более чем в 1,5 раза в дренирующей опухоли ЛУ и в селезенке. Это указывает на индукцию долговременной Т-клеточной памяти, обеспечивающей системный контроль над потенциальными рецидивами опухоли. Данный эффект подтверждается литературными данными, где показано, что активация TLR-сигнальных путей в условиях представления опухолевых антигенов способствует генерации стойкого пула памяти CD8-Т-клеток [3].

При таком подходе к иммунотерапии первичной метастатической болезни происходила не только усиленная инфильтрация Т-клетками дренирующей опухоли ЛУ. Очень важно, что CD8-Т-клетки инфильтрата вторичной опухоли и региональных ЛУ обладали усиленной противоопухолевой цитотоксической активностью. Особенно активны противоопухолевые CD8-Т-клетки во вторичных опухолях и дренирующей опухоли ЛУ мышей, леченых агонистом TLR4 IMM или сочетанием двух агонистов IMM+Poly I:C, которые с высокой эффективностью, более 60%, подавляли рост клеток карциномы 4T1-GFP. CD8-Т-клетки у мышей, которым проводили монотерапию Poly I:C во время первичной метастатической болезни, проявляли средние цитотоксические свойства в диапазоне 30-50% в отношении клеток карциномы 4T1-GFP. Полученные данные свидетельствуют, что экспериментальная иммунотерапия путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR первичной метастатической болезни способствует формированию адаптивной Т-клеточной памяти, которая при повторной инокуляции опухолевых клеток проявляется в инфильтрации ткани опухоли и дренирующей ЛУ противоопухолевыми цитотоксическими CD8-Т-клетками.

Экспериментальная иммунотерапия первичной метастатической болезни агонистами TLR индуцирует сильные Th1- и CD8-Т-клеточные ответы против антигенов карциномы 4T1. Было показано, что иммунотерапия

агонистами TLR первичной метастатической болезни индуцирует генерацию Т-клеток-эффекторов и Т-клеток памяти у мышей *complete responders* во вторичной опухоли, селезенке и дренирующей опухоль ЛУ. Следовательно, эффективная индукция Т-клеток-эффекторов в ответ на опухолевые антигены карциномы 4Т1 обеспечивает терапевтическую эффективность терапии перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR. Формирование значительного пула Т-клеток памяти, способных распознать антигены опухоли и реактивироваться, превращаясь в новые Т-клетки-эффекторы, представляет собой очень важный фактор защиты от рецидива опухоли. Полученные данные показывают, что во вторичной опухоли, селезенке и дренирующей опухоль ЛУ возникает более чем в 10 раз большее количество CD4- и CD8-Т-клеток памяти, чем у мышей с первичной опухолью, то есть у тех, кто первый раз встречается с опухолевыми антигенами карциномы 4Т1. Динамическое исследование Т-клеточного иммунного ответа показало, что вторичный иммунный ответ на повторную встречу с антигенами карциномы 4Т1 усиливался на порядки (таблица 7). В 17 раз и 30 раз усиливался ответ Т-клеток-эффекторов в селезенке и дренирующей ЛУ соответственно (таблица 7). Более мощный ответ наблюдался при исследовании CD4-Т-клеток памяти, которых было 63 и в 22 раза больше при вторичном ответе на опухолевые антигены (таблица 7). Эффекторные CD8-Т-клетки памяти, также, усилено проявляли противоопухолевую активность у мышей *complete responders* (таблица 7).

Такие высокие значения CD4- и CD8-Т-клеток, говорит о том, что у мышей *complete responders* приблизительно 1% всех Т-клеток способны эффективно узнавать опухолевые антигены. Такую интенсивность продукции ИФН- γ Т-клетками можно сравнить с иммунизацией аденовирусным вектором [111]. Такие антиген-специфические Т-клетки памяти остаются надолго и могут обеспечить надежную защиту от возможного повторного роста опухоли. Они осуществляют надежный иммунный контроль злокачественных клеток,

способных оставаться в латентном состоянии в течение нескольких лет, а затем реактивироваться и давать новые очаги злокачественного роста.

Для окончательного подтверждения формирования адаптивной долговременной иммунной памяти, было исследовано наличие противоопухолевых IgG-антител, специфично связывающихся с антигенами карциномы 4Т1. Иммунотерапия агонистами TLR первичной метастатической болезни у мышей способствовала формированию IgG-антител, специфично связывающихся с антигенами карциномы 4Т1, которые при повторном введении опухолевых клеток проявлялись в сыворотках крови мышей *complete responders*. Динамическое исследование уровня сывороточных противоопухолевых антител показало мощное усиление, в 2,6 раза, производства антител по сравнению с первичным иммунным ответом (таблица 7). Важно упомянуть, что требует дополнительного исследования точное идентифицирование антигенов клеток карциномы 4Т1, на которые развиваются сильные Т-клеточные и антительные иммунные реакции.

Таблица 7 – Сравнительная таблица первичного иммунного ответа у мышей, получавших иммунотерапию агонистами TLR (IMM+Poly I:C) во время первичной метастатической болезни и вторичного иммунного ответа у мышей, излечившихся от метастатической болезни, в селезенке, региональном ЛУ и сыворотке крови.

	Первичный иммунный ответ (дни после введения опухолевых клеток)			Вторичный иммунный ответ (дни после повторного введения опухолевых клеток)	Сравнение интенсивности ответа (30 (280) vs 32)
	18	25	32	30 дней после второй инокуляции клеток 4Т1 (280 дней после первой инокуляции клеток 4Т1)	
<i>Селезенка</i>					
Т-клетки-эффекторы	414 (256; 567)	1518 (1388; 1673)	682 (374; 935)	11500 (5760; 14840)	17
CD4-Т-клетки памяти	1121 (945; 1223)	871 (838; 1385)	325 (66; 699)	20600 (10800; 24280)	63
CD8-Т-клетки памяти	582 (280; 729)	1793 (1423; 2858)	936 (869; 1053)	3500 (3060; 5680)	4
<i>Региональный лимфатический узел</i>					
Т-клетки-эффекторы	160 (118; 314)	1680 (1276; 1762)	490 (406; 868)	14933 (13880; 21140)	30
CD4-Т-клетки памяти	965 (618; 1004)	740 (306; 1636)	740 (222; 950)	15967 (13700; 24313)	22
CD8-Т-клетки памяти	240 (72; 247)	865 (265; 1493)	980 (609; 1141)	5500 (4233; 7400)	6
<i>Антитела</i>					
Титр IgG-антител, ЕС₅₀	1:300	1:300	1:1000	1:10000	10

Примечание: Представлены данные по количеству Т-клеток-эффекторов, секретирующих ИФН-γ без дополнительной стимуляции, и Т-клеток памяти, секретирующих ИФН-γ в ответ на стимуляцию ДК/МФ, презентующими антигены карциномы 4Т1, а также по содержанию противоопухолевых IgG-антител в сыворотке крови. Для Т-клеточных ответов данные представлены в расчете на 1 млн соответствующих Т-клеток (медиана и 10/90 процентиля).

Таким образом, полученные данные демонстрируют, что экспериментальная иммунотерапия путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR способствует формированию полноценного, многоуровневого адаптивного противоопухолевого ответа, включающего индукцию цитотоксических CD8-Т-клеток, Th1 CD4-Т-клеток, продукцию противоопухолевых IgG-антител и развитие долговременной иммунной памяти.

4.8. Перепрограммирование миелоидных клеток: транскрипционные изменения

Транскрипционный анализ миелоидных клеток, выделенных из вторичных опухолей мышей *complete responders*, показал значительное усиление экспрессии генов, ассоциированных с провоспалительным ответом (*Tnf*, *Il1b*, *Inos*), а также снижение транскриптов, кодирующих иммуносупрессивные факторы (*Il10*, *Arg1*). Эти изменения характерны для M1-реполяризации МФ и активации зрелых D1-подобных ДК, способных эффективно презентировать опухолевые антигены [103]. Подобные транскрипционные сдвиги ранее наблюдались в работах, где Poly I:C индуцировал экспрессию ИФН генов через активацию сигнального пути TLR3–TRIF–IRF3 [85], а агонист TLR4 ЛПС активировал каскад TLR4–MyD88–NF-κB, усиливая продукцию TNF-α, IL-6 и других провоспалительных медиаторов [101]. Эти эффекты создают предпосылки для формирования эффективного адаптивного иммунного ответа. Кроме того, реполяризация миелоидных клеток может приводить к разрушению иммуносупрессивных связей в опухолевом микроокружении, включая подавление Трег и MDSC [51].

Полученные результаты подтверждают концепцию функционального перепрограммирования миелоидных клеток как ключевого механизма

противоопухолевого действия TLR агонистов, ранее предложенную в ряде экспериментальных исследований [141, 162]. Эти данные подчёркивают, что воздействие на миелоидные клетки может не только восстанавливать антигенпрезентирующую функцию, но и запускать каскад реакций, ведущих к устранению опухолевых клеток.

В совокупности, иммунотерапия Poly I:C и IMM приводит к глубокой перенастройке опухолевого врождённого иммунного микроокружения с формированием воспалительного профиля, способствующего активации адаптивного иммунного ответа и ограничению прогрессирования опухоли.

Представленные данные впервые показывают эффективность применения экспериментальной иммунотерапии путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции опухоли для терапии злокачественной метастатической карциномы молочной железы 4T1. Иммунотерапия перепрограммирует тканевые МФ и ДК в противоопухолевое цитотоксическое состояние. Данные показывают, что эти миелоидные клетки способны эффективно инициировать адаптивные иммунные реакции против антигенов опухоли 4T1, а адаптивные механизмы, опосредованные Т-клетками и противоопухолевыми антителами, обеспечивают элиминацию опухолевых метастазов. Данные об эффективной экспериментальной иммунотерапии агонистами TLR после хирургического удаления основной опухоли дают основания для дальнейших исследований в создании эффективных, персонализированных стратегий лечения злокачественных новообразований.

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 4Т1 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 4Т1 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 СОКРАЩЕНИЙ

- 4T1 – клеточная линия карциномы молочной железы мыши
- ДК – дендритные клетки
- ИММ – Иммуномакс, IMM
- ИФН – интерферон
- КОЕ– колониеобразующие единицы
- ЛУ – лимфатический узел
- МФ – макрофаги
- НК-клетки – натуральные киллеры
- РМЖ – рак молочной железы
- Трег – регуляторные Т-клетки
- Arg1 – аргиназа-1
- BMDC – дендритные клетки, полученные из костного мозга мышей
- BSA – бычий сывороточный альбумин, БСА
- CAF – Опухоль-ассоциированные фибробласты
- D1 – D1-подобные дендритные клетки, обладающих противоопухолевыми свойствами
- D2 – D2-подобные дендритные клетки, поддерживающие рост опухоли и способствующие метастазированию
- DAMPs – эндогенные сигналы опасности
- DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол
- GFP – зеленый флуоресцентный белок
- GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа
- Ig – иммуноглобулин
- IL – интерлейкин
- iNOS – индуцибельная NO-синтаза
- LPS – липополисахарид, ЛПС
- M-MDSC – моноцитарные миелоидные супрессорные клетки

- M1 – M1-подобные макрофаги, обладающие противоопухолевыми свойствами
- M2 – M2-подобные макрофаги, поддерживающие рост опухоли и способствующие метастазированию
- MDSC – миелоидные супрессорные клетки
- MHC – главный комплекс гистосовместимости
- MMPs – матричные металлопротеиназы
- PAMPs – патоген-ассоциированные молекулярные структуры
- PBMC – мононуклеарные клетки периферической крови
- PD-1 – белок программируемой клеточной смерти-1
- PD-L1 – лиганд программируемой клеточной смерти-1
- PGE₂ – простагландин E2
- PMN-MDSC – полиморфноядерные миелоидные супрессорные клетки
- Poly I:C – полирибозиновая кислота
- ROS – активные формы кислорода
- TAM – опухоль-ассоциированные макрофаги
- TAN – опухоль-ассоциированные нейтрофилы
- TGF- β – трансформирующий фактор роста бета
- Th1 – Т-хелперы-1 типа
- TLR – Toll-подобный рецепторы
- TLR3 – Toll-подобный рецептор 3 типа
- TLR4 – Toll-подобный рецептор 4 типа
- TME – опухолевое микроокружение
- VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атретханы, К.-С.Н. Миелоидные супрессорные клетки и провоспалительные цитокины как мишени терапии рака / К.-С.Н. Атретханы, М.С. Друцкая. – Текст: электронный // Биохимия. - 2016. - Т. 81, № 11. - С. 1520-1529. – URL: https://biochemistrymoscow.com/ru/archive/2016/81-11-1520/#_pdf (дата обращения: 22.11.2025).
2. Влияние TLR-агонистов на экспрессию в антиген-презентирующих клетках целевого белка – антигена, закодированного в аденовирусном векторе / А. В. Багаев, А. В. Пичугин, Е. С. Лебедева [и др.]. – Текст: электронный // Иммунология. – 2015. - Т. 36, № 4. - С. 188–195. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-tlr-agonistov-na-ekspressiyu-v-antigenprezentiruyuschih-kletkah-tselevogo-belka-antigena-zakodirovannogo-v-adenovirusnom/viewer> (дата обращения: 22.11.2025).
3. Иммуногенность мультиантигенной вакцины, приготовленной из лизата злокачественных клеток опухоли / Е. И. Ушакова, А. А. Федорова, Е. С. Лебедева [и др.]. – Текст: электронный // Иммунология. – 2022. - Т. 43, № 4. – С. 389-400. – URL: https://www.immunologiya-journal.ru/ru/jarticles_immunology/263.html?SSr=3801348bf015ffffff27c__07e6090c0f261e-614d (дата обращения: 22.11.2025).
4. Иммуномакс – агонист TLR4 – влияет на фенотип легочных макрофагов при респираторно-синцитиальной вирусной инфекции у мышей / А. А. Никонова, А. В. Пичугин, М. М. Чулкина [и др.]. – Текст: электронный // Acta Naturae. – 2018. – Т. 10, № 4. - С. 95–99. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/immunomaks-agonist-tlr4-vliyaet-na-fenotip-legochnyh-makrofagov-pri-respiratorno-sintsitialnoy-virusnoy-infektsii-u-myshey/viewer> (дата обращения: 22.11.2025).
5. Иммуномодулятор «иммуномакс» активирует дендритные клетки / А. В. Пичугин, А. В. Багаев, М. Чулкина [и др.]. – Текст: электронный // Иммунология. - 2015. – Т. 36, № 4. - С. 200-205. – URL:

<https://cyberleninka.ru/article/n/immunomodulyator-immunomaks-aktiviruet-dendritnye-kletki/viewer> (дата обращения: 22.11.2025).

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 [и др.]. – Текст: электронный // Иммунология. – 2022. – Т. 43, № 6. – С. 691–701.

– URL: https://www.immunologiya-journal.ru/ru/jarticles_immunology/290.html?SSr=370134da7107ffffff27c__07e80a09072529-54cd (дата обращения: 22.11.2025).

7. Клеточные механизмы иммуномодулирующего действия препарата «Иммуномакс» / Р. И. Атауллаханов, А. В. Пичугин, Н. М. Шишкова [и др.]. – Текст: электронный // Иммунология. – 2005. – Т. 26, № 2. – С. 111–120. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=9134114> (дата обращения: 22.11.2025).

8. 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 [и др.]. – Текст: электронный // Иммунология. - 2021. – Т. 42, № 5. - С. 490–501. – URL: https://www.immunologiya-journal.ru/ru/jarticles_immunology/188.html?SSr=17013465b218ffffff27c__07e50b16121132-6a90 (дата обращения: 22.11.2025).

9. Комбинированное применение трех агонистов рецепторов TLR4, TLR9 и NOD2 синергически увеличивает выработку белков-цитокинов макрофагами мыши / А. В. Пичугин, А. В. Багаев, Е. С. Лебедева [и др.]. – Текст: электронный // Иммунология. - 2018. - Т. 39, №4. - С. 172-177. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kombinirovannoe-primenenie-tryoh-agonistov-retseptorov-tlr4-tlr9-i-nod2-sinergichieski-uvelichivaet-vyrabotku-belkov-sitokinov> (дата обращения: 22.11.2025).

10. Кооперативное взаимодействие сигнальных путей рецепторов TLR4, TLR9 и NOD2 в макрофагах мыши / Е. С. Лебедева, А. В. Багаев, А. Я. Гараева [и др.] . – Текст: электронный // Иммунология. - 2018. – Т. 39, № 1. - С. 4–11. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kooperativnoe-vzaimodeystvie-signalnyh-putey-retseptorov-tlr4-tlr9-i-nod2-v-makrofagah-myshi> (дата обращения: 22.11.2025).

11. Лебедева, Е. С. Вакцины для лечения злокачественных новообразований / Е. С. Лебедева, Р. И. Атауллаханов, Р. М. Хаитов. – Текст: электронный // Иммунология. - 2019. - Т. 40, № 4. - С. 64-76. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vaktsiny-dlya-lecheniya-zlokachestvennyh-novoobrazovaniy> (дата обращения: 22.11.2025).

12. Механизмы усиления агонистами TLR4 экспрессии целевого белка в составе аденовирусного вектора в антиген-презентирующих клетках / Е. С. Лебедева, А. В. Багаев, М. М. Чулкина [и др.] . – Текст: электронный // Иммунология. - 2017. – Т. 38, № 6. - С. 295–306. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mehanizmy-usileniya-agonistami-tlr4-ekspressii-tselevogo-belka-v-sostave-adenovirusnogo-vektora-v-antigenprezentiruyuschih-kletkah> (дата обращения: 22.11.2025).

13. Опухоль-ассоциированные фибробласты и их значение в прогрессии злокачественных новообразований / Н. А. Олейникова, Н. В. Данилова, И. А. Михайлов [и др.] . – Текст: электронный // Архив патологии. – 2020. - Т. 82, № 1. - 68-77. – URL: <https://www.mediasphera.ru/issues/arkhiv-patologii/2020/1/downloads/ru/1000419552020011068> (дата обращения: 22.11.2025).

14. Опухоль-ассоциированные фибробласты и их роль в опухолевой прогрессии / М. С. Ермаков, А. А. Нуштаева, В. А. Рихтер, О. А. Коваль. – Текст: электронный // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26, № 1. – С. 14-21. – URL: <https://vavilov.elpub.ru/jour/article/view/3251> (дата обращения: 22.11.2025).

15. Патент 2563818⁽¹³⁾ С2 А Российская Федерация, МПК ⁵¹ А61К 36/81 (2006.01) В01D 11/02 (2006.01) А61Р 31/04 (2006.01) А61Р 31/12 (2006.01) А61Р 37/04 (2006.01). Способ получения вещества, обладающего антимикробной, противовирусной и иммуностимулирующей активностью, в частности, в отношении дендритных клеток, вещество, полученное этим способом, и фармацевтическая композиция на его основе : Заявка: № 2013151824/15; заявлено 21.11.2013; опубликовано 20.09.2015. – Бюллетень № 26. / Р. И. Атауллаханов (RU), А. В. Пичугин (RU), Т. М. Мельникова (RU), Р. М. Хаитов (RU). – URL: <https://patents.google.com/patent/RU2563818C2/ru> (дата обращения: 22.11.2025).

16. Перспективы применения генетически модифицированных лимфоцитов с химерным Т-клеточным рецептором (CAR-T-клеток) для терапии солидных опухолей / М. В. Киселевский, И. О. Чикилева, С. М. Ситдикова [и др.]. – Текст: электронный // Иммунология. – 2019. – Т. 40, № 4. – С. 48-55. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/perspektivy-primeneniya-geneticheski-modifitsirovannyh-limfotsitov-s-himernym-t-kletochnym-retseptorom-car-t-kletok-dlya-terapii> (дата обращения: 22.11.2025).

17. Синергизм агонистов TLR3 и TLR4 при перепрограммировании макрофагов в противоопухолевое состояние / А. В. Багаев, А. С. Рыбинец, А. А. Федорова [и др.]. – Текст: электронный // Иммунология. – 2021. – Т. 42, № 6. – С. 615-630. – URL: https://www.immunologiya-journal.ru/ru/jarticles_immunology/207.html?SSr=100134892c18ffffff27c__07e60204120a3a-2cbb (дата обращения: 22.11.2025).

18. Синергическая активация транскрипции генов INOS, IFN- γ , IL12P40, IL6, TNF- α при одновременном воздействии на макрофаги агонистами рецепторов TLR4, TLR9 и NOD2 / М. М. Чулкина, А. В. Багаев, Е. С. Лебедева [и др.]. – Текст: электронный // Иммунология. - 2018. - Т. 39, № 4. - С. 178-185. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sinergicheskaya-aktivatsiya-transkriptsii-genov-inos-ifn-il12p40-il6-tnf-pri-odnovremennom-vozdeystvii-na-makrofagi-agonistami> (дата обращения: 22.11.2025).

19. Синергическое усиление транскрипции генов интерферонов 1-го типа и цитокинов при активации макрофагов и дендритных клеток сочетанием двух агонистов PRR / Е. С. Лебедева, А. В. Багаев, М. М. Чулкина [и др.]. – Текст: электронный // Иммунология. - 2017. – Т. 38, № 1. - С. 64-71. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sinergicheskoe-usilenie-transkriptsii-genov-interferonov-1-go-tipa-i-tsitokinov-pri-aktivatsii-makrofagov-i-dendritnyh-kletok> (дата обращения: 22.11.2025).

20. NF- κ B-, но не MAPK- сигнальный путь определяет синергический ответ макрофагов на одновременную активацию двух типов рецепторов TLR4 + NOD2 или TLR9 + NOD2 / Е. С. Лебедева, А. В. Багаев, М. М. Чулкина [и др.]. – Текст: электронный // Иммунология. - 2017. – Т. 38, № 2. - С. 76-82. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/nf-kb-no-ne-mapk-signalnyy-put-opredelyaet-sinergicheskiy-otvet-makrofagov-na-odnovremennuyu-aktivatsiyu-dvuh-tipov-retseptorov-tnr4-nod2> (дата обращения: 22.11.2025).

21. PD-1-путь: биологическая значимость, клиническое применение и существующие проблемы / Н. Е. Кушлинский, М. В. Фридман, А. А. Морозов [и др.]. – Текст: электронный // Молекулярная медицина. - 2019. – Т. 17, № 1. – С. 3–11. – URL: <https://molmedjournal.ru/ru/system/files/24999490-2019-01-01.pdf> (дата обращения: 22.11.2025).

22. A conserved dendritic-cell regulatory program limits antitumour immunity / B. Maier, A. M. Leader, S. T. Chen [et al.]. – Текст: электронный // Nature. – 2020. – Vol. 580, N. 7802. – P. 257–262. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7787191/> (дата обращения: 22.11.2025).

23. A STING agonist potentiates C1 lipidoid-based mRNA cancer vaccine through promoting TNF- α secretion in vivo / H. Zhang, Y. Lin, L. Wang [et al.]. – Текст: электронный // Molecular therapy. – 2025. - S1525-0016(25)00761-0. Advance online publication. – URL: [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016\(25\)00761-](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016(25)00761-)

0?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1525001625007610%3Fshowall%3Dtrue (дата обращения: 22.11.2025).

24. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells / A. Ohta, E. Gorelik, S. J. Prasad [et al.]. – Текст: электронный // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – Vol. 103, N. 35. – P. 13132–13137. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1559765/> (дата обращения: 22.11.2025).

25. Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis / L. Yang, J. Huang, X. Ren [et al.]. – Текст: электронный // Cancer Cell. – 2008. – Vol. 13, N. 1. – P. 23–35. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2245859/> (дата обращения: 22.11.2025).

26. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success / L. Gattinoni, D. J. Powell Jr, S. A. Rosenberg, N. P. Restifo. – Текст: электронный // Nature Reviews. Immunology. – 2006. – Vol. 6, N. 5. – P. 383-393. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1473162/> (дата обращения: 22.11.2025).

27. Ahrends, T. The opposing roles of CD4+ T cells in anti-tumour immunity / T. Ahrends, J. Borst. – Текст: электронный // Immunology. – 2018. – Vol. 154, N. 4. – P. 582–592. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6050207/> (дата обращения: 22.11.2025).

28. An engineered paper-based 3D coculture model of pancreatic cancer to study the impact of tissue architecture and microenvironmental gradients on cell phenotype / J. L. Cadavid, S. Latour, F. Nowlan [et al.]. – Текст: электронный // Advanced Healthcare Materials. – 2023. – Vol. 12, N. 14. – P. e2201846. – URL: <https://advanced.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/adhm.202201846> (дата обращения: 22.11.2025).

29. Antibody isotype responses in Balb/c mice immunized with the cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* / V. R. Pereira, V. M. Lorena, A. F. Verçosa [et al.]. – Текст: электронный // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 2003. – Vol. 98, N. 6. – P. 823-825. – URL:

<https://www.scielo.br/j/mioc/a/4SgMb8BPTwJKQHуJF5YLZDm/?lang=en> (дата обращения: 22.11.2025).

30. Anticancer Mechanisms in Two Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cell Subsets Activated with TLR4 Agonists / A. Bagaev, A. Pichugin, E. L. Nelson [et al.]. – Текст: электронный // *The Journal of Immunology*. - 2018. – Vol. 200, N. 8. - P. 2656–2669. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5962282/>(дата обращения: 22.11.2025).

31. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses / S. B. Boscardin, J. C. Hafalla, R. F. Masilamani [et al.]. – Текст: электронный // *The Journal of Experimental Medicine*. - 2006. – Vol. 203, N. 3. - P. 599–606. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2118236/> (дата обращения: 22.11.2025).

32. Biswas, S. K. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm / S. K. Biswas, A. Mantovani. – Текст: электронный // *Nature Immunology*. – 2010. – Vol. 11, N. 10. – P. 889–896. – URL: <https://www.nature.com/articles/ni.1937> (дата обращения: 22.11.2025).

33. Breast cancer-derived GM-CSF regulates arginase 1 in myeloid cells to promote an immunosuppressive microenvironment / X. Su, Y. Xu, G. C. Fox [et al.]. – Текст: электронный // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2021. – Vol. 131, N. 20. – P. e145296. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8516467/> (дата обращения: 22.11.2025).

34. Bronte, V. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism / V. Bronte, P. Zanovello. – Текст: электронный // *Nature Reviews. Immunology*. – 2005. – Vol. 5, N. 8. – P. 641–654. – URL: <https://www.nature.com/articles/nri1668> (дата обращения: 22.11.2025).

35. Castro, C. D. Coevolution of T-cell receptors with MHC and non-MHC ligands / C. D. Castro, A. M. Luoma, E. J. Adams. – Текст: электронный // *Immunological Reviews*. - 2015. – Vol. 267, N. 1. - P. 30–55. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4544829/>(дата обращения: 22.11.2025).

36. Chen, L. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition / L. Chen, D. B. Flies. – Текст: электронный // Nature Reviews. Immunology. – Vol. 2013. - 13, N. 4. – P. 227-242. - [This article has been corrected. See: Nature Reviews. Immunology. - 2013. – Vol. 13, N. 7. – P. 542]. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3786574/>(дата обращения: 22.11.2025).
37. Coffman, R. L. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work / R. L. Coffman, A. Sher, R. A. Seder. – Текст: электронный // Immunity. - 2010. - Vol. 33, N. 4. - P. 492–503. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3420356/>(дата обращения: 22.11.2025).
38. Conditional deletion of the colony stimulating factor-1 receptor (c-fms proto-oncogene) in mice / J. Li, K. Chen, L. Zhu, J. W. Pollard. – Текст: электронный // Genesis. – 2006. – Vol. 44, N. 7. – P. 328–335. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvg.20219> (дата обращения: 22.11.2025).
39. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells / S. Sivori, M. Falco, M. Della Chiesa [et al.]. – Текст: электронный // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – Vol. 101, N. 27. – P. 10116–10121. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC454174/> (дата обращения: 22.11.2025).
40. CRISPR/Cas9-mediated deletion of Interleukin-30 suppresses IGF1 and CXCL5 and boosts SOCS3 reducing prostate cancer growth and mortality / C. Sorrentino, L. D’Antonio, S. L. Ciummo [et al.]. – Текст: электронный // Journal of Hematology and Oncology. – 2022. – Vol. 15, N. 1. – P. 145. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9559017/>(дата обращения: 22.11.2025).
41. Critical role for CD103(+)/CD141(+) dendritic cells bearing CCR7 for tumor antigen trafficking and priming of T cell immunity in melanoma / E. W. Roberts, M. L. Broz, M. Binnewies [et al.]. – Текст: электронный // Cancer Cell. – 2016. – Vol. 30, N. 2. – P. 324–336. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5374862/>(дата обращения: 22.11.2025).

42. CSF1R inhibition reprograms tumor-associated macrophages to potentiate anti-PD-1 therapy efficacy against colorectal cancer / Q. Lv, Y. Zhang, W. Gao [et al.]. – Текст: электронный // *Pharmacological Research*. – 2024. – Vol. 202. – P. 107126. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661824000707?via%3Dihub> (дата обращения: 22.11.2025).

43. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function / K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin [et al.]. – Текст: электронный // *Science*. – 2008. – Vol. 322. – P. 271–275. – URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1160062> (дата обращения: 22.11.2025).

44. De Palma, M. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies / M. De Palma, C. E. Lewis. – Текст: электронный // *Cancer Cell*. – 2013. – Vol. 23, N. 3. – P. 277–286. – URL: [https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108\(13\)00069-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS153561081300069X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(13)00069-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS153561081300069X%3Fshowall%3Dtrue) (дата обращения: 22.11.2025).

45. Defining the antigen-specific T-cell response to vaccination and poly(I:C)/TLR3 signaling: evidence of enhanced primary and memory CD8 T-cell responses and antitumor immunity / M. L. Salem, A. N. Kadima, D. J. Cole, W. E. Gillanders [et al.]. – Текст: электронный // *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*. – 2005. – Vol. 28, N. 3. – P. 220–228. – URL: https://journals.lww.com/immunotherapy-journal/abstract/2005/05000/defining_the_antigen_specific_t_cell_response_to.7.aspx (дата обращения: 22.11.2025).

46. Demicheli, R. Does surgery modify growth kinetics of breast cancer micrometastases? / R. Demicheli, P. Valagussa, G. Bonadonna. – Текст: электронный // *British Journal of Cancer*. – 2001. – Vol. 85, N. 4. – P. 490-492. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2364103/> (дата обращения: 22.11.2025).

47. Dendritic cell phenotype and function in a 3D co-culture model of patient-derived metastatic colorectal cancer organoids / B. Subtil, K. K. Iyer, D. Poel [et al.]. – Текст: электронный // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1105244. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9905679/> (дата обращения: 22.11.2025).

48. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy / S. K. Wculek, F. J. Cueto, A. M. Mujal [et al.]. – Текст: электронный // *Nature Reviews Immunology*. – 2020. – Vol. 20, N. 1. – P. 7–24. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41577-019-0210-z>(дата обращения: 22.11.2025).

49. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant / M. P. Longhi, C. Trumfheller, J. Idoyaga [et al.]. – Текст: электронный // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2009. – Vol. 206, N. 7. – P. 1589–1602. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2715098/>(дата обращения: 22.11.2025).

50. Determining Endosomal Toll-Like Receptors Gene Expression in NK Cells After Stimulation with Specific Agonists / C. Alicata, I. Veneziani, B. Ricci [et al.]. – Текст: электронный // *Methods in Molecular Biology*. - 2023. – Vol. 2700. - P. 151–162. – URL: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-3366-3_8 (дата обращения: 22.11.2025).

51. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes / K. Movahedi, D. Laoui, C. Gysemans [et al.]. – Текст: электронный // *Cancer Research*. - 2010. – Vol. 70, N. 14. – P. 5728-5739. – URL: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/70/14/5728/559724/Different-Tumor-Microenvironments-Contain> (дата обращения: 22.11.2025).

52. D'Ignazio, L. NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses / L. D'Ignazio, D. Bandarra, S. Rocha. – Текст: электронный // *The FEBS Journal*. – 2016. – Vol. 283, N. 3. – P. 413–424. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4864946/>(дата обращения: 22.11.2025).

53. Disruption of CXCR2-mediated MDSC tumor trafficking enhances anti-PD1 efficacy / S. L. Highfill, Y. Cui, A. J. Giles [et al.]. – Текст: электронный // *Science Translational Medicine*. – 2014. – Vol. 6, N. 237. – P. 237ra67. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6980372/> (дата обращения: 22.11.2025).

54. Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity / M. L. Broz, M. Binnewies, B. Boldajipour [et al.]. – Текст: электронный // *Cancer Cell*. – 2014. – Vol. 26, N. 5. – P. 638–652. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4254577/> (дата обращения: 22.11.2025).

55. Dual roles of myeloid-derived suppressor cells induced by Toll-like receptor signaling in cancer / H. Zhou, M. Jiang, H. Yuan [et al.]. – Текст: электронный // *Oncology letters*. – 2021. – Vol. 21, N. 2. – P. 149. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7798029/> (дата обращения: 22.11.2025).

56. Dynamic interplay between tumour, stroma and immune system can drive or prevent tumour progression / R. J. Seager, C. Hajal, F. Spill [et al.]. – Текст: электронный // *Convergent Science Physical Oncology*. – 2017. – Vol. 3. – P. 034002. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6070160/> (дата обращения: 22.11.2025).

57. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance / L. Bonifaz, D. Bonnyay, K. Mahnke [et al.]. – Текст: электронный // *Journal of Experimental Medicine*. – 2002. – Vol. 196, N. 12. – P. 1627–1638. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2196060/> (дата обращения: 22.11.2025).

58. Elevated pre-activation basal level of nuclear NF- κ B in native macrophages accelerates LPS-induced translocation of cytosolic NF- κ B into the cell nucleus / A. V. Bagaev, A. Y. Garaeva, E. S. Lebedeva [et al.]. – Текст: электронный // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, N. 1. – P. 4563. – URL:

<https://www.nature.com/articles/s41598-018-36052-5> (дата обращения: 22.11.2025).

59. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges / D. Fukumura, J. Kloepper, Z. Amoozgar [et al.]. – Текст: электронный // *Nature Reviews. Clinical Oncology*. – 2018. – Vol. 15, N. 5. – P. 325–340. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5921900/> (дата обращения: 22.11.2025).

60. Epidermal langerhans cells rapidly capture and present antigens from C-type lectin-targeting antibodies deposited in the dermis / V. Flacher, C. H. Tripp, P. Stoitzner [et al.]. – Текст: электронный // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2010. – Vol. 130, N. 3. – P. 755–762. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3140829/> (дата обращения: 22.11.2025).

61. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response / G. Chen, A. C. Huang, W. Zhang [et al.]. – Текст: электронный // *Nature*. – 2018. – Vol. 560. – P. 382–386. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6095740/> (дата обращения: 22.11.2025).

62. Frese, K. K. Maximizing mouse cancer models / K. K. Frese, D. A. Tuveson. – Текст: электронный // *Nature Reviews. Cancer*. – 2007. – Vol. 7, N. 9. – P. 654-658. – URL: <https://www.nature.com/articles/nrc2192> (дата обращения: 22.11.2025).

63. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid / O. R. Colegio, N. Q. Chu, A. L. Szabo [et al.]. – Текст: электронный // *Nature*. – 2014. – Vol. 513, N. 7519. – P. 559–563. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4301845/> (дата обращения: 22.11.2025).

64. Gabrilovich, D. I. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours / D. I. Gabrilovich, S. Ostrand-Rosenberg, V. Bronte. – Текст: электронный // *Nature Reviews. Immunology*. – 2012. – Vol. 12, N. 4. – P. 253-268. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3587148/> (дата обращения: 22.11.2025).

65. Gabrilovich, D. I. Myeloid-derived suppressor cells / D. I. Gabrilovich. – Текст: электронный // *Cancer Immunology Research*. – 2017. – Vol. 5, N. 1. – P. 3–8. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5426480/> (дата обращения: 22.11.2025).
66. Gabrilovich, D. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system / D. Gabrilovich, S. Nagaraj. – Текст: электронный // *Nature Reviews. Immunology*. – 2009. – Vol. 9, N. 3. – P. 162–174. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2828349/> (дата обращения: 22.11.2025).
67. Gajewski, T. F. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment / T. F. Gajewski, H. Schreiber, Y. X. Fu. – Текст: электронный // *Nature Immunology*. – 2013. – Vol. 14, N. 10. – P. 1014–1022. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4118725/> (дата обращения: 22.11.2025).
68. Geijtenbeek, T. B. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses / T. B. Geijtenbeek, S. I. Gringhuis. – Текст: электронный // *Nature Reviews. Immunology*. – 2009. – Vol. 9, N. 7. – P. 465–479. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7097056/> (дата обращения: 22.11.2025).
69. GEMMs as preclinical models for testing pancreatic cancer therapies / A. Gopinathan, J. P. Morton, D. I. Jodrell, O. J. Sansom. – Текст: электронный // *Disease Models and Mechanisms*. – 2015. – Vol. 8, N. 10. – P. 1185–1200. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4610236/> (дата обращения: 22.11.2025).
70. Global Cancer Observatory: Cancer Today (version 1.1) / J. Ferlay, M. Ervik, F. Lam [et al.]. - Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2024. - Available from: <https://gco.iarc.who.int/today> [Accessed 25 October 2025].
71. Gordon, S. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions / S. Gordon, F. O. Martinez. – Текст: электронный // *Immunity*. – 2010. – Vol. 32, N. 5. – P. 593–604. – URL: [https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(10\)00173-1?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761310001731%3Fshowall%3Dtrue.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761310001731%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(10)00173-1?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761310001731%3Fshowall%3Dtrue.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761310001731%3Fshowall%3Dtrue) (дата обращения: 22.11.2025).

72. Grebenyuk, S. Engineering organoid vascularization / S. Grebenyuk, A. Ranga. – Текст: электронный // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2019. – Vol. 7. – P. 39. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6433749/>(дата обращения: 22.11.2025).
73. HDAC inhibition potentiates anti-tumor activity of macrophages and enhances anti-PD-L1-mediated tumor suppression / X. Li, X. Su, R. Liu [et al.]. – Текст: электронный // *Oncogene*. – 2021. – Vol. 40, N. 10. – P. 1836–1850. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7946638/>(дата обращения: 22.11.2025).
74. Hot or cold: bioengineering immune contextures into in vitro patient-derived tumor models / N. S. H. Too, N. C. W. Ho, C. Adine [et al.]. – Текст: электронный // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2021. – Vol. 175. – P. 113791. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169409X21001575> (дата обращения: 22.11.2025).
75. Identification of myeloid cell subsets in murine lungs using flow cytometry / R. Zaynagetdinov, T. P. Sherrill, P. L. Kendall [et al.]. – Текст: электронный // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 49, N. 2. – P. 180-189. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3824033/>(дата обращения: 22.11.2025).
76. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer / К. Тао, М. Fang, J. Alroy, G. G. Sahagian. – Текст: электронный // *BMC Cancer*. – 2008. – Vol. 8. – P. 228. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2529338/>(дата обращения: 22.11.2025).
77. Immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: from current perspectives to future treatments—a systematic review / A. Olivares-Hernández, E. González Del Portillo, Á. Tamayo-Velasco [et al.]. – Текст: электронный // *Annals of Translational Medicine*. – 2023. – Vol. 11, N. 10. – P. 354. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10477621/>(дата обращения: 22.11.2025).
78. Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer: Progress, Challenges, and Prospects / Sh. Tang, C. Qin, H. Hu [et al.]. – Текст: электронный

// Cells. – 2022. – Vol. 11, N. 3. – P. 320. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8834198/>(дата обращения: 22.11.2025).

79. Immune responses in Balb/c mice induced by a candidate SARS-CoV inactivated vaccine prepared from F69 strain / C. H. Zhang, J. H. Lu, Y. F. Wang [et al.]. – Текст: электронный // Vaccine. – 2005. – Vol. 23, N. 24. – P. 3196-3201. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7115646/>(дата обращения: 22.11.2025).

80. Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets / Y. Tie, F. Tang, Y. Q. Wei, X. W. Wei. – Текст: электронный // Journal of Hematology & Oncology. – 2022. – Vol. 15, N. 1. – P. 61. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9118588/>(дата обращения: 22.11.2025).

81. Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling / S. P. Cobbold, E. Adams, C. A. Farquhar [et al.]. – Текст: электронный // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2009. – Vol. 106, N. 29. – P. 12055-12060. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2704109/>(дата обращения: 22.11.2025).

82. Inhibition of CSF-1 receptor improves the antitumor efficacy of adoptive cell transfer immunotherapy / S. Mok, R. C. Koya, C. Tsui [et al.]. – Текст: электронный // Cancer Research. – 2014. – Vol. 74, N. 1. – P. 153–161. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3947337/>(дата обращения: 22.11.2025).

83. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome / Mouse Genome Sequencing Consortium; R. H. Waterston, K. Lindblad-Toh, E. Birney [et al.]. – Текст: электронный // Nature. – 2002. – Vol. 420. – P. 520-562. – URL: <https://www.nature.com/articles/nature01262> (дата обращения: 22.11.2025).

84. Intensified and protective CD4⁺ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine / C. Trunpfheller, J. S. Finke, C. B. López [et al.]. – Текст: электронный // The Journal of Experimental Medicine. – 2006. – 203, N. 3. – P. 607–617. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2118242/>(дата обращения: 22.11.2025).

85. Interferon β (IFN- β) Production during the Double-stranded RNA (dsRNA) Response in Hepatocytes Involves Coordinated and Feedforward Signaling through Toll-like Receptor 3 (TLR3), RNA-dependent Protein Kinase (PKR), Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), and Src Protein / L. Zhang, W. Xiang, G. Wang [et al.]. – Текст: электронный // *The Journal of biological chemistry*. – 2016. – Vol. 291, N. 29. – P. 15093–15107. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4946926/>(дата обращения: 22.11.2025).

86. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion / F. Castro, A. P. Cardoso, R. M. Gonçalves [et al.]. – Текст: электронный // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 847. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5945880/>(дата обращения: 22.11.2025).

87. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I: Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge / T. Ichinohe, A. Kawaguchi, S. Tamura [et al.]. – Текст: электронный // *Microbes and Infection*. – 2007. – Vol. 9, N. 11. – P. 1333–1340. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457907002304?via%3Dihub> (дата обращения: 22.11.2025).

88. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues / S. Zanganeh, G. Hutter, R. Spitler [et al.]. – Текст: электронный // *Nature Nanotechnology*. – 2016. – Vol. 11, N. 11. – P. 986–994. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5198777/>(дата обращения: 22.11.2025).

89. Irvine, D. J. Engineering synthetic vaccines using cues from natural immunity / D. J. Irvine, M. A. Swartz, G. L. Szeto. – Текст: электронный // *Nature Materials*. – 2020. – Vol. 19, N. 11. – P. 761–772. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3928825/>(дата обращения: 22.11.2025).

90. Joyce, J. A. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment / J. A. Joyce, D. T. Fearon. – Текст: электронный // *Science*. – 2015. – Vol. 348, N. 6230. – P. 74-80. – URL:

<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aaa6204> (дата обращения: 22.11.2025).

91. Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer / R. Kalluri. – Текст: электронный // *Nature Reviews. Cancer*. – 2016. – Vol. 16, N. 9. – P. 582–598. – URL: <https://www.nature.com/articles/nrc.2016.73> (дата обращения: 22.11.2025).

92. Kawai, T. Innate immune recognition of viral infection / T. Kawai, S. Akira. – Текст: электронный // *Nature Immunology*. – 2006. – Vol. 7, N. 2. – P. 131–137. – URL: <https://www.nature.com/articles/ni1303> (дата обращения: 22.11.2025).

93. Kerkar, S. P. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment / S. P. Kerkar, N. P. Restifo. – Текст: электронный // *Cancer Research*. – 2012. – Vol. 72, N. 13. – P. 3125–3130. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6327310/> (дата обращения: 22.11.2025).

94. Klein, U. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy / U. Klein, R. Dalla-Favera. – Текст: электронный // *Nature Reviews. Immunology*. – 2008. – Vol. 8, N. 1. – P. 22–33. – URL: <https://www.nature.com/articles/nri2217> (дата обращения: 22.11.2025).

95. Kortylewski, M. Role of Stat3 in suppressing anti-tumor immunity / M. Kortylewski, H. Yu. – Текст: электронный // *Current Opinion in Immunology*. – 2008. – Vol. 20, N. 2. – P. 228–233. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2488961/> (дата обращения: 22.11.2025).

96. Krieg, A. M. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer / A. M. Krieg. – Текст: электронный // *Oncogene*. – 2008. – Vol. 27, N. 2. – P. 161–167. – URL: <https://www.nature.com/articles/1210911> (дата обращения: 22.11.2025).

97. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy / D. G. DeNardo, D. J. Brennan, E. Rexhepaj [et al.]. – Текст: электронный // *Cancer Discovery*. – 2011. – Vol. 1, N.1. – P. 54–

67. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3203524/>(дата обращения: 22.11.2025).

98. Leung, J. Host B7-H4 Regulates Antitumor T Cell Responses through Inhibition of Myeloid-Derived Suppressor Cells in a 4T1 Tumor Transplantation Model / J. Leung, W.K. Suh. – Текст: электронный // *The Journal of Immunology*. – 2013. – Vol. 190, N. 12. – P. 6651-6661. – URL: <https://academic.oup.com/jimmunol/article-abstract/190/12/6651/8001848?redirectedFrom=fulltext&login=false> (дата обращения: 22.11.2025).

99. Li, H. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer / H. Li, X. Fan, J. Houghton. – Текст: электронный // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2007. – Vol. 101, N. 4. – P. 805–815. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.21159> (дата обращения: 22.11.2025).

100. Li, Y. Hypoxia and the tumor microenvironment / Y. Li, L. Zhao, X. Li. – Текст: электронный // *Technology in Cancer Research Treatment*. - 2021. – Vol. 20, N. 12. – P. 15330338211036304. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8358492/>(дата обращения: 22.11.2025).

101. Lu, Y. C. LPS/TLR4 signal transduction pathway / Y. C. Lu, W. C. Yeh, P. S. Ohashi. – Текст: электронный // *Cytokine*. – 2008. – Vol. 42, N. 2. – P. 145–151. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043466608000070?via%3Dihub> (дата обращения: 22.11.2025).

102. M1 macrophage exosomes engineered to foster M1 polarization and target the IL-4 receptor inhibit tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages into M1-like macrophages / G. R. Gunassekaran, S. M. Poongkavithai Vadevo, M. C. Baek, B. Lee. – Текст: электронный // *Biomaterials*. – 2021. – Vol. 278. – P. 121137. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961221004944?via%3Dihub> (дата обращения: 22.11.2025).

103. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines / P. J. Murray, J. E. Allen, S. K. Biswas [et al.]. – Текст: электронный // *Immunity*. – 2014. – Vol. 41, N. 1. – P. 14–20. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4123412/>(дата обращения: 22.11.2025).

104. Macrophage IL-10 blocks CD8⁺ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells / B. Ruffell, D. Chang-Strachan, V. Chan [et al.]. – Текст: электронный // *Cancer Cell*. – 2014. – Vol. 26, N. 5. – P. 623–637. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4254570/>(дата обращения: 22.11.2025).

105. Macrophage Reprogramming via the Modulation of Unfolded Protein Response with siRNA-Loaded Magnetic Nanoparticles in a TAM-like Experimental Model / A. D'Urso, F. Oltolina, C. Borsotti [et al.]. – Текст: электронный // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15, N. 6. – P. 1711. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10302170/> (дата обращения: 22.11.2025).

106. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation / M. Wieczorek, E. T. Abualrous, J. Sticht [et al.]. – Текст: электронный // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 292. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5355494/>(дата обращения: 22.11.2025).

107. Medina-Echeverz, J. Myeloid-derived cells are key targets of tumor immunotherapy / J. Medina-Echeverz, F. Aranda, P. Berraondo. – Текст: электронный // *Oncoimmunology*. – 2014. – Vol. 3. – P. e28398. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4063142/>(дата обращения: 22.11.2025).

108. Metabolic Reprogramming Induces Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment / S. Wang, G. Liu, Y. Li, Y. Pan. – Текст: электронный // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 840029. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9302576/>(дата обращения: 22.11.2025).

109. Modeling and Integral X-Ray, Optical, and MRI Visualization of Multiorgan Metastases of Orthotopic 4T1 Breast Carcinoma in BALB/c Mice / V.

P. Vaklaushev, N. F. Grinenko, G. M. Yusubalieva [et al.]. – Текст: электронный // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. - 2015. – Vol. 158, N. 4. - P. 581–588. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10517-015-2810-3> (дата обращения: 22.11.2025).

110. *Models for immuno-oncology research / No authors listed*. – Текст: электронный // *Cancer Cell*. – 2020. – Vol. 38, N. 2. – P. 145–147. – URL: [https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108\(20\)30371-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1535610820303718%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(20)30371-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1535610820303718%3Fshowall%3Dtrue) (дата обращения: 22.11.2025).

111. *Modification of Adenovirus vaccine vector-induced immune responses by expression of a signalling molecule / C. S. Rollier, A. J. Spencer, K. C. Sogaard [et al.]*. – Текст: электронный // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, N. 1. – P. 5716. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7109070/> (дата обращения: 22.11.2025).

112. *Mouse models in oncogenesis and cancer therapy / M. V. Céspedes, I. Casanova, M. Parreño, R. Mangués*. – Текст: электронный // *Clinical Translational Oncology*. - 2006. – Vol. 8, N. 5. - P. 318–329. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12094-006-0177-7> (дата обращения: 22.11.2025).

113. *New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape / D. Mittal, M. M. Gubin, R. D. Schreiber, M. J. Smyth*. – Текст: электронный // *Current Opinion in Immunology*. – 2014. – Vol. 27. – P. 16–25. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4388310/>(дата обращения: 22.11.2025).

114. *Noy, R. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy / R. Noy, J. W. Pollard*. – Текст: электронный // *Immunity*. – 2014. – Vol. 41, N. 1. – P. 49–61. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4137410/> (дата обращения: 22.11.2025).

115. *Nutritional Stress Induced by Tryptophan-Degrading Enzymes Results in ATF4-Dependent Reprogramming of the Amino Acid Transporter Profile in*

Tumor Cells / E. Timosenko, H. Ghadbane, J. D. Silk [et al.]. – Текст: электронный // *Cancer Research*. – 2016. – Vol. 76, N. 21. – P. 6193-6204. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5096689/> (дата обращения: 22.11.2025).

116. O'Connell, R. M. MicroRNA regulation of inflammatory responses / R. M. O'Connell, D. S. Rao, D. Baltimore. – Текст: электронный // *Annual Review of Immunology*. – 2010. – Vol. 30. – P. 295–312. – URL: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-immunol-020711-075013> (дата обращения: 22.11.2025).

117. Oncolytic adenoviruses synergistically enhance anti-PD-L1 and anti-CTLA-4 immunotherapy by modulating the tumour microenvironment in a 4T1 orthotopic mouse model / H. Zhang, W. Xie, Y. Zhang [et al.]. – Текст: электронный // *Cancer Gene Ther*. – 2022. – Vol. 29, N. 5. – P. 456-465. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9113929/> (дата обращения: 22.11.2025).

118. Orecchioni, M. Olfactory receptors in macrophages and inflammation / M. Orecchioni, H. Matsunami, K. Ley. – Текст: электронный // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 1029244. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9606742/> (дата обращения: 22.11.2025).

119. Organoid co-culture models of the tumor microenvironment promote precision medicine / Z. Gu, Q. Wu, B. Shang [et al.]. – Текст: электронный // *Cancer Innovation*. – 2023. – Vol. 3, N. 1. – P. e101. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11212345/> (дата обращения: 22.11.2025).

120. Ostrand-Rosenberg, S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity / S. Ostrand-Rosenberg. – Текст: электронный // *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*. – 2010. – Vol. 59, N. 10. – P. 1593-1600. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3706261/> (дата обращения: 22.11.2025).

121. PD-L1 signals through conserved sequence motifs to overcome interferon-mediated cytotoxicity / M. Gato-Cañas, M. Zuazo, H. Arasanz [et al.]. – Текст: электронный // *Cell Reports*. – 2017. – Vol. 20, N. 8. – P. 1818–1829. –

URL: [https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(17\)31068-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2211124717310689%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(17)31068-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2211124717310689%3Fshowall%3Dtrue) (дата обращения: 22.11.2025).

122. Perez, L. Outcome of Elective Checkpoint Inhibitor Discontinuation in Patients with Metastatic Melanoma Who Achieved a Complete Remission: Real-World Data / L. Perez, W. Samlowski, R. Lopez-Flores. – Текст: электронный // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, N. 5. – P. 1144. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9138966/> (дата обращения: 22.11.2025).

123. Physical activity delays accumulation of immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells / J. Garritson, L. Krynski, L. Haverbeck [et al.]. – Текст: электронный // *PLoS ONE*. – 2020. – Vol. 15, N. 6. – P. e0234548. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0234548> (дата обращения: 22.11.2025).

124. PI3K γ is a molecular switch that controls immune suppression / M. M. Kaneda, K. S. Messer, N. Ralainirina [et al.]. – Текст: электронный // *Nature*. – 2016. – Vol. 539, N. 7629. – P. 437–442. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5479689/> (дата обращения: 22.11.2025).

125. Platten, M. Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion / M. Platten, W. Wick, B. J. Van den Eynde. – Текст: электронный // *Cancer Research*. – 2012. – Vol. 72, N. 21. – P. 5435–5440. – URL: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/72/21/5435/576020/Tryptophan-Catabolism-in-Cancer-Beyond-IDO-and> (дата обращения: 22.11.2025).

126. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN / Z. G. Fridlender, J. Sun, S. Kim [et al.]. – Текст: электронный // *Cancer Cell*. – 2009. – Vol. 16, N. 3. – P. 183–194. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2754404/> (дата обращения: 22.11.2025).

127. Polyinosinic-polycytidylic acid limits tumor outgrowth in a mouse model of metastatic lung cancer / G. Forte, A. Rega, S. Morello [et al.]. – Текст: электронный // *Journal of Immunology*. – 2012. – Vol. 188, N. 11. – P. 5357–5364. – URL: <https://academic.oup.com/jimmunol/article->

abstract/188/11/5357/7981774?redirectedFrom=fulltext&login=false#no-access-message (дата обращения: 22.11.2025).

128. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse / S. R. Hingorani, E. F. Petricoin, A. Maitra [et al.]. – Текст: электронный // *Cancer Cell*. – 2003. – Vol. 4, N. 6. – P. 437-450. – URL: [https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108\(03\)00309-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS153561080300309X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(03)00309-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS153561080300309X%3Fshowall%3Dtrue) (дата обращения: 22.11.2025).

129. Primary 4T1 tumor resection provides critical «window of opportunity» for immunotherapy / A. Ghochikyan, A. Davtyan, A. Novakimyan [et al.]. – Текст: электронный // *Clinical and Experimental Metastasis*. – 2014. – Vol. 31, N. 2. – P. 185–198. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3946940/> (дата обращения: 22.11.2025).

130. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature / Q. W. Zhang, L. Liu, C. Y. Gong [et al.]. – Текст: электронный // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, N. 12. – P. e50946. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3532403/> (дата обращения: 22.11.2025).

131. Pulaski, B. A. Mouse 4T1 breast tumor model / B. A. Pulaski, S. Ostrand-Rosenberg. – Текст: электронный // *Current Protocols in Immunology*. – 2001. – Chapter 20. – Unit 20.2. – URL: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.im2002s39> (дата обращения: 22.11.2025).

132. Qian, B. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis / B. Qian, J. W. Pollard. – Текст: электронный // *Cell*. – 2010. – Vol. 141, N. 1. – P. 39–51. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4994190/> (дата обращения: 22.11.2025).

133. Quail, D. F. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis / D. F. Quail, J. A. Joyce. – Текст: электронный // *Nature Medicine*. – 2013. – Vol. 19, N. 11. – P. 1423–1437. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3954707/> (дата обращения: 22.11.2025).

134. Rammensee, H. G. MHC ligands and peptide motifs: first listing / H. G. Rammensee, T. Friede, S. Stevanović. – Текст: электронный // Immunogenetics. – 1995. – Vol. 41, N. 4. – P. 178–228. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00172063> (дата обращения: 22.11.2025).
135. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3 / L. Alexopoulou, A. C. Holt, R. Medzhitov, R. A. Flavell. – Текст: электронный // Nature. - 2001. – Vol. 413, N. 6857. - P. 732–738. – URL: <https://www.nature.com/articles/35099560> (дата обращения: 22.11.2025).
136. Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses / S. Chiba, H. Ikushima, H. Ueki [et al.]. – Текст: электронный // Elife. – 2014. – Vol. 3. – P. e04177. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4161974/>(дата обращения: 22.11.2025).
137. "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF- κ B / T. Hagemann, T. Lawrence, I. McNeish [et al.]. – Текст: электронный // The Journal of Experimental Medicine. – 2008. – Vol. 205, N. 6. – P. 1261–1268. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2413024/>(дата обращения: 22.11.2025).
138. Regulation of tumor metastasis by myeloid-derived suppressor cells / T. Condamine, I. Ramachandran, J. I. Youn, D. I. Gabrilovich. – Текст: электронный // Annual Review of Medicine. - 2015. – Vol. 66. - P. 97–110. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4324727/>(дата обращения: 22.11.2025).
139. Rodriguez, P. C. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression / P. C. Rodriguez, D. G. Quiceno, A. C. Ochoa. – Текст: электронный // Blood. – 2007. – Vol. 109, N. 4. – P. 1568–1573. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1794048/>(дата обращения: 22.11.2025).
140. Ruffell, B. Macrophages and therapeutic resistance in cancer / B. Ruffell, L. M. Coussens. – Текст: электронный // Cancer Cell. – 2015. – Vol. 27, N. 4. – P. 462–472. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4400235/> (дата обращения: 22.11.2025).

141. Saha, S. Metabolic regulation of macrophage phenotype and function / S. Saha, I. N. Shalova, S. K. Biswas. – Текст: электронный // *Immunol Rev.* – 2017. – Vol. 280, N. 1. – P. 102-111. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imr.12603> (дата обращения: 22.11.2025).

142. Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion / R. D. Schreiber, L. J. Old, M. J. Smyth. – Текст: электронный // *Science.* – 2011. – Vol. 331, N. 6024. – P. 1565-1570. – URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1203486> (дата обращения: 22.11.2025).

143. Sloat, B. R. Nasal immunization with anthrax protective antigen protein adjuvanted with polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid induced strong mucosal and systemic immunities / B. R. Sloat, Z. Cui. – Текст: электронный // *Pharmaceutical Research.* – 2006. – Vol. 23, N. 6. – P. 1217–1226. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-006-0206-9> (дата обращения: 22.11.2025).

144. Spontaneous vulvar papillomas in a colony of mice used for pancreatic cancer research / N. M. Gades, A. Ohashi, L. D. Mills [et al.]. – Текст: электронный // *Comparative Medicine.* – 2008. – Vol. 58, N. 3. – P. 271-275. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2704118/> (дата обращения: 22.11.2025).

145. Spranger, S. Mechanisms of tumor cell–intrinsic immune evasion / S. Spranger, T. F. Gajewski. – Текст: электронный // *Annual Review Cancer Biology.* – 2018. – Vol. 2. – P. 213–228. – URL: <https://www.annualreviews.org/docserver/fulltext/cancerbio/2/1/annurev-cancerbio-030617-050606.pdf?expires=1770478145&id=id&accname=guest&checksum=87DE67A7293228A920C38C183EE0ABDB> (дата обращения: 22.11.2025).

146. Spranger, S. Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity / S. Spranger, R. Bao, T. F. Gajewski. – Текст: электронный //

Nature. – 2015. – Vol. 523, N. 7559. – P. 231–235. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25970248/> (дата обращения: 22.11.2025).

147. STAT3 inhibitor Napabucasin abrogates MDSC immunosuppressive capacity and prolongs survival of melanoma-bearing mice / R. Bitsch, A. Kurzay, Özbay F. Kurt [et al.]. – Текст: электронный // Journal for Immunotherapy of Cancer. – 2022. – Vol. 10, N. 3. – P. e004384. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8932276/> (дата обращения: 22.11.2025).

148. Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory / M. Poggio, T. Hu, C. C. Pai [et al.]. – Текст: электронный // Cell. – 2019. – Vol. 177, N. 2. – P. 414-427.e13. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6499401/> (дата обращения: 22.11.2025).

149. Survival outcomes and independent response assessment with nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in patients with advanced renal cell carcinoma: 42-month follow-up of a randomized phase 3 clinical trial / R. Motzer, B. Escudier, D. F. McDermott [et al.]. – Текст: электронный // Journal for Immunotherapy of Cancer. – 2021. – Vol. 8, N. 2. – P. e000891. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7359377/> (дата обращения: 22.11.2025).

150. Tailoring the immune response by targeting C-type lectin receptors on alveolar macrophages using “pathogen-like” amphiphilic polyanhydride nanoparticles / A. V. Chavez-Santoscoy, R. Roychoudhury, N. L. B. Pohl [et al.]. – Текст: электронный // Biomaterials. – 2012. – Vol. 33, N. 18. – P. 4762–4772. – URL: <https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1006&context=gfiraimertait> (дата обращения: 22.11.2025).

151. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects / X. M. Dai, G. R. Ryan, A. J. Hapel [et al.]. – Текст: электронный // Blood. – 2002. – Vol. 99, N. 1. – P. 111–120. – URL:

<https://ashpublications.org/blood/article/99/1/111/107251/Targeted-disruption-of-the-mouse-colony> (дата обращения: 22.11.2025).

152. Targeted PLGA nano- but not microparticles specifically deliver antigen to human dendritic cells via DC-SIGN in vitro / L. J. Cruz, P. J. Tacke, R. Fokkink [et al.]. – Текст: электронный // *Journal of Controlled Release*. – 2010. – Vol. 144, N. 2. – P. 118–126. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365910001215?via%3Dihub> (дата обращения: 22.11.2025).

153. Targeting TLR-4 with a novel pharmaceutical grade plant derived agonist, Immunomax®, as a therapeutic strategy for metastatic breast cancer / A. Ghochikyan, A. Pichugin, A. Bagaev [et al.]. – Текст: электронный // *Journal of Translational Medicine*. – 2014. – Vol. 12. – P. 322. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4261251/> (дата обращения: 22.11.2025).

154. Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy / C. H. Ries, M. A. Cannarile, S. Hoves [et al.]. – Текст: электронный // *Cancer Cell*. – 2014. – Vol. 25, N. 6. – P. 846–859. – URL: [https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108\(14\)00224-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1535610814002244%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(14)00224-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1535610814002244%3Fshowall%3Dtrue) (дата обращения: 22.11.2025).

155. TCR Recognition of Peptide-MHC-I: Rule Makers and Breakers / C. Szeto, C. A. Lobos, A. T. Nguyen, S. Gras. – Текст: электронный // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 22, N. 1. – P. 68. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7793522/> (дата обращения: 22.11.2025).

156. The differences in immunoadjuvant mechanisms of TLR3 and TLR4 agonists on the level of antigen-presenting cells during immunization with recombinant adenovirus vector / E. Lebedeva, A. Bagaev, A. Pichugin [et al.]. – Текст: электронный // *BMC Immunology*. – 2018. – Vol. 19, N. 1. – P. 26. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6064145/> (дата обращения: 22.11.2025).

157. The efficacy of immune checkpoint blockade for melanoma in-transit with or without nodal metastases – A multicenter cohort study / C. J. Holmberg, L. Ny,

T. J. Hieken [et al.]. – Текст: электронный // *European Journal of Cancer*. – 2022. – Vol. 169. – P. 210-222. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35644725/> (дата обращения: 22.11.2025).

158. The host STING pathway at the interface of cancer and immunity / L. Corrales, S. M. McWhirter, T. W. Dubensky Jr., T. F. Gajewski. – Текст: электронный // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2016. – Vol. 126, N. 7. – P. 2404–2411. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4922692/> (дата обращения: 22.11.2025).

159. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists / H. Kanzler, F. J. Barrat, E. M. Hessel, R. L. Coffman. – Текст: электронный // *Nature Medicine*. – 2007. – Vol. 13, N. 5. – P. 552–559. – URL: <https://www.nature.com/articles/nm1589> (дата обращения: 22.11.2025).

160. Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research / B. Pinto, A. C. Henriques, P. M. A. Silva, H. Bousbaa. – Текст: электронный // *Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 12, N. 12. – P. 1186. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7762220/> (дата обращения: 22.11.2025).

161. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword / B. Huang, J. Zhao, J. C. Unkeless [et al.]. – Текст: электронный // *Oncogene*. – 2008. – Vol. 27, N. 2. – P. 218–224. – URL: <https://www.nature.com/articles/1210904> (дата обращения: 22.11.2025).

162. TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy / C. B. Rodell, S. P. Arlauckas, M. F. Cuccarese [et al.]. – Текст: электронный // *Nature Biomedical Engineering*. – 2018. – Vol. 2, N. 8. – P. 578–588. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6192054/> (дата обращения: 22.11.2025).

163. Toll like receptor-3 ligand poly-ICLC promotes the efficacy of peripheral vaccinations with tumor antigen-derived peptide epitopes in murine CNS tumor models / X. Zhu, F. Nishimura, K. Sasaki [et al.]. – Текст: электронный // *Journal of Translational Medicine*. – 2007. – Vol. 5. – P. 10. – URL:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1802742/> (дата обращения: 22.11.2025).

164. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells / O. Schulz, S. S. Diebold, M. Chen [et al.]. – Текст: электронный // *Nature*. – 2005. – Vol. 433, N. 7028. – P. 887–892. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15711573/> (дата обращения: 22.11.2025).

165. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors / H. Shime, M. Matsumoto, H. Oshiumi [et al.]. – Текст: электронный // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109, N. 6. – P. 2066–2071. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3277567/> (дата обращения: 22.11.2025).

166. Toll-like receptor 3-mediated suppression of TRAMP prostate cancer shows the critical role of type I interferons in tumor immune surveillance / A. I. Chin, A. K. Miyahira, A. Covarrubias [et al.]. – Текст: электронный // *Cancer Res*. – 2010. – Vol. 70, N. 7. – P. 2595–2603. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2995454/> (дата обращения: 22.11.2025).

167. Trial watch: immunostimulatory cytokines in cancer therapy / E. Vacchelli, F. Aranda, F. Obrist [et al.]. – Текст: электронный // *Oncoimmunology*. – 2014. – Vol. 3. – P. e29030. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3782010/> (дата обращения: 22.11.2025).

168. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice / S. R. Hingorani, L. Wang, A. S. Multani [et al.]. – Текст: электронный // *Cancer Cell*. – 2005. – Vol. 7, N. 5. – P. 469–483. – URL: [https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108\(05\)00128-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1535610805001285%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(05)00128-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1535610805001285%3Fshowall%3Dtrue) (дата обращения: 22.11.2025).

169. Tumor-derived exosomes modulate PD-L1 expression in monocytes / F. Haderk, R. Schulz, M. Iskar [et al.]. – Текст: электронный // *Science*

Immunology. – 2017. – Vol. 2, N. 13. – P. eeah5509. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28754746/> (дата обращения: 22.11.2025).

170. Tumor-on-chip modeling of organ-specific cancer and metastasis / N. Del Piccolo, V. S. Shirure, Y. Bi [et al.]. – Текст: электронный // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2021. – Vol. 175. – P. 113798. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X21001642?via%3Dihub> (дата обращения: 22.11.2025).

171. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology / A. Mantovani, F. Marchesi, A. Malesci [et al.]. – Текст: электронный // *Nature Reviews. Clinical Oncology*. – 2017. – Vol. 14, N. 7. – P. 399–416. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5480600/> (дата обращения: 22.11.2025).

172. van Kooyk, Y. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses / Y. van Kooyk, G. A. Rabinovich. – Текст: электронный // *Nature Immunology*. – 2008. – Vol. 9, N. 6. – P. 593–601. – URL: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/25867/CONICET_Digital_Nro.ac8f0aa1-da44-43be-9189-3f1a571295e3_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y (дата обращения: 22.11.2025).

173. Vaupel, P. Accomplices of the Hypoxic Tumor Microenvironment Compromising Antitumor Immunity: Adenosine, Lactate, Acidosis, Vascular Endothelial Growth Factor, Potassium Ions, and Phosphatidylserine / P. Vaupel, G. Multhoff. – Текст: электронный // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1887. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5742577/> (дата обращения: 22.11.2025).

174. Veglia, F. Myeloid-derived suppressor cells coming of age / F. Veglia, M. Perego, D. Gabrilovich. – Текст: электронный // *Nature Immunology*. – 2018. – Vol. 19, N. 2. – P. 108–119. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5854158/> (дата обращения: 22.11.2025).

175. Veglia, F. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity / F. Veglia, E. Sanseviero, D. Gabrilovich. – Текст: электронный // *Nature Reviews. Immunology*. – 2021. – Vol. 21, N. 8. – P. 485–

498. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7849958/> (дата обращения: 22.11.2025).

176. Whiteside, T. L. Exosomes and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment / T. L. Whiteside. – Текст: электронный // *Seminars in Immunology*. – 2018. – Vol. 35. – P. 69–79. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5866206/>(дата обращения: 22.11.2025).

177. Wu, T. Roles of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer progression / T. Wu, Y. Liao. – Текст: электронный // *Frontiers in Immunology. Sec. Molecular Innate Immunity*. - 2025. – Vol. 16. – P. 1677363. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2025.1677363/full> (дата обращения: 22.11.2025).

178. Zenaro, E. Induction of Th1/Th17 immune response by *Mycobacterium tuberculosis*: role of dectin-1, mannose receptor, and DC-SIGN / E. Zenaro, M. Donini, S. Dusi. – Текст: электронный // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2009. – Vol. 86, N. 6. – P. 1393–1401. – URL: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1189/jlb.0409242> (дата обращения: 22.11.2025).

179. Zhang, H. G. Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication facilitating metastasis / H. G. Zhang, W. E. Grizzle. – Текст: электронный // *The American Journal of Pathology*. – 2014. – Vol. 184, N. 1. – P. 28–41. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3873490/> (дата обращения: 22.11.2025).

ПРИЛОЖЕНИЕ А

УТВЕРЖДАЮ



Директор ФГБУ
«ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России
доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН
_____ М.Р. Хаитов

« 19 » июня 2020 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы

Мы, нижеподписавшиеся, заведующий лабораторией активации иммунитета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России Атауллаханов Равшан Иноятович и заместитель директора по науке и инновациям Шиловский Игорь Петрович составили настоящий акт о том, что методика анализа Т-клеточных реакций, специфических к антигенам опухоли методом ELISpot, разработанная в рамках диссертационной работы Ушаковой Екатерины Игоревны по теме: «Экспериментальная иммунотерапия злокачественного новообразования путем перепрограммирования миелоидных клеток в модели метастатической карциномы у лабораторных мышей», внедрена в лабораторию активации иммунитета с 20 июня 2020 года. Метод используется для оценки антиген-специфических Т-клеточных реакций путем анализа единичных Т-клеток, секретирующих интерферон-гамма.

Зав. лабораторией активации
иммунитета
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России

Р.И. Атауллаханов

« 13 » 06 2020 г.

Зам. директора
по науке и инновациям
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России

И.П. Шиловский

« 18 » 06 2020 г.

УТВЕРЖДАЮ



Директор ФГБУ
«ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России
доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

М.Р. Хаитов

« 10 » февраля 2023 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы

Мы, нижеподписавшиеся, заведующий лабораторией активации иммунитета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России Атауллаханов Равшан Иноятович и заместитель директора по науке и инновациям Шиловский Игорь Петрович составили настоящий акт о том, что метод хирургической резекции первичной опухоли, разработанный в рамках диссертационной работы Ушаковой Екатерины Игоревны по теме: «Экспериментальная иммунотерапия злокачественного новообразования путем перепрограммирования миелоидных клеток в модели метастатической карциномы у лабораторных мышей», внедрен в лабораторию активации иммунитета, лабораторию иммунохимии, лабораторию противовирусного иммунитета с 20 февраля 2023 года. Метод используется для разработки новых терапевтических подходов для анализа активности иммунных реакций против антигенов опухолей с целью преодоления иммуносупрессии при онкологических заболеваниях.

Зав. лабораторией активации
иммунитета
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России

Зам. директора
по науке и инновациям
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России

 Р.И. Атауллаханов

 И.П. Шиловский

« 9 » 02 2023 г.

« 9 » 02 2023 г.