

Анализ действия Т-лимфоцитов периферической крови больного на клетки почечно-клеточного рака в модельных системах

А.Ю. Кузеванова¹, О.А. Халмурзаев², А.А. Борунова², Н.В. Апанович¹, Т.Н. Заботина², А.А. Алимов¹, В.Б. Матвеев², **А.В. Карпухин¹**

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анна Юрьевна Кузеванова anka.kuzevanka@yandex.ru

Введение. Внедрение современных методов иммунной терапии на основе препаратов, блокирующих иммунные контрольные точки, значительно повысило эффективность лечения. В то же время не у всех больных наблюдается ответ на такое лечение и надежные предиктивные маркеры отсутствуют. Создание модельной системы для оценки Т-клеточного иммунного ответа на опухоль представляется актуальной задачей.

Цель исследования – создание модельной системы для оценки Т-клеточного иммунного ответа на клетки рака почки больного.

Материалы и методы. Первичную культуру из опухолевой ткани светлоклеточного рака почки получали в стандартных стерильных условиях клеточного бокса. Фракцию Т-клеток периферической крови выделяли из мононуклеарных клеток. Активацию Т-клеток проводили с помощью антител к CD3 и CD28. Оценка изменения показателя «клеточный индекс» выполняли с применением биосенсорной технологии RTCA xCELLigence (ACEA Biosciences, США).

Результаты. Полученные клетки опухоли и фракцию Т-клеток от того же больного культивировали совместно в течение 24 ч, анализируя изменения численности клеточной популяции с интервалом 30 мин. Показано, что неактивированные Т-клетки не влияют на пролиферативные свойства культивируемых раковых клеток, в то время как активированные Т-клетки подавляли пролиферативные свойства раковых клеток, что связано с увеличением доли Т-клеток, несущих рецептор HLA-DR (CD3⁺HLA-DR⁺) вследствие активации. Оцениваемая опухольспецифичная активность Т-клеток может отсутствовать, проявляясь частичным подавлением пролиферативных свойств или приводить к полной гибели опухолевых клеток. В последнем случае отсутствие таких клеток подтверждали методом проточной цитометрии.

Заключение. Разработанная система позволяет оценить эффективность действия иммунных Т-клеток для конкретного больного, в том числе в присутствии ингибиторов иммунных контрольных точек, что может быть использовано в качестве прогностической оценки при выборе средств лечения.

Ключевые слова: иммунный ответ, Т-клетка, почечно-клеточный рак, модель, иммунные контрольные точки

Для цитирования: Кузеванова А.Ю., Халмурзаев О.А., Борунова А.А. и др. Анализ действия Т-лимфоцитов периферической крови больного на клетки почечно-клеточного рака в модельных системах. Онкоурология 2022;18(4):15–24. DOI: 10.17650/1726-9776-2022-18-4-15-24

Study of the action of peripheral blood T-lymphocytes on renal cell carcinoma cells in model systems

A.Yu. Kuzevanov¹, O.A. Khalmurzaev², A.A. Borunova², N.V. Apanovich¹, T.N. Zabolina², A.A. Alimov¹, V.B. Matveev², **A.V. Karpukhin¹**

¹Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115522, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Contacts: Anna Yur'evna Kuzevanov anka.kuzevanka@yandex.ru

Background. The introduction of immunotherapy based on immune checkpoint inhibitors has significantly improve the effectiveness of kidney cancer treatment. Nevertheless, not all patients respond to such treatment and there are no reliable predictive markers. Therefore, the development of a model system for assessing the cellular immune response to a tumor seems to be an urgent task.

Aim. Development of a model to assess the T-cell immune response was the focus of this study.

Materials and methods. Primary tumor cell culture and peripheral blood T-cell fraction were obtained under standard sterile conditions. T-cell activation were performed via anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. The cell index was assessed using the RTCA xCELLigence biosensor technology (ACEA Biosciences, USA).

Results. Tumor and T-cells from the same patient were cultured together to assess the growth rate of the tumor cell population. Measurements were taken at 30-minute intervals. The duration of observation was 24 hours. It has been shown that non-activated T-cells do not affect the proliferative properties of cultured cancer cells. On the contrary, activated T-cells suppressed the proliferative properties of cancer cells, which was associated with an increase in the proportion of T-cells carrying the HLA-DR receptor (CD3⁺HLA-DR⁺) because of activation. Tumor-specific T-cell activity can lead to three consequences: lack of effect, partial suppression of proliferative properties, and complete death of tumor cells. In the latter case, the absence of such cells was determined by flow cytometry.

Conclusion. The developed approach makes it possible to evaluate the cytotoxic properties of T cells in relation to tumor cells in a particular patient. The advantage of this method is that the measurement can be carried out in the presence of immune checkpoint inhibitors. The proposed method may be useful for evaluating the treatment regimen within the framework of personalized therapy.

Keywords: immune response, T-cell, renal cell carcinoma, model, immune checkpoints

For citation: Kuzevanova A.Yu., Khalmurzaev O.A., Borunova A.A. et al. Study of the action of peripheral blood T-lymphocytes on renal cell carcinoma cells in model systems. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2022;18(4):15–24. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2022-18-4-15-24

Введение

В России рак почки относится к заболеваниям, диагностируемым в достаточно позднем возрасте; средний возраст больных с впервые установленным диагнозом у мужчин – 61,2 года, у женщин – 64,5 года [1]. Летальность на первом году наблюдения составляет около 20 %, что обусловлено поздним выявлением заболевания у значительной части больных [2]. Лечение предусматривает различные варианты хирургического вмешательства с последующим выбором режима лекарственной терапии [3].

Отличительной особенностью злокачественной опухоли почки является ее чувствительность к иммунотерапии. В частности, лечение высокими дозами интерлейкина 2, известное с 1992 г., в ряде исследований обеспечивало полный ответ у 6 % больных, частичный ответ – у 9 % и стабилизацию заболевания – у 22 % [4].

Внедрение современных методов иммунной терапии на основе препаратов, блокирующих иммунные контрольные точки (ИКТ), с одной стороны, значительно повысило эффективность лечения (например, доля объективных ответов в исследовании KEYNOTE-4 составила 59,3 % [5]), с другой – показало ограниченность наших знаний в области понимания механизмов, обеспечивающих противоопухолевую иммунную защиту организма.

На сегодняшний день известно, что для светлоклеточного почечно-клеточного рака характерен высокий, по сравнению с другими солидными опухолями, уровень инфильтрации CD8⁺-Т-клеток [6], функциональная активность которых регулируется комбинацией специфических рецепторов, экспрессирующихся на их поверхности, и цитокинами микроокружения опухоли [7]. В качестве основного молекулярного маркера для

предсказания эффективности действия ингибиторов ИКТ на опухоль было предложено использовать лиганд рецептора PD-1 – белок PD-L1, уровень экспрессии которого в большинстве случаев оценивают иммуногистохимически [8, 9]. К настоящему времени получены противоречивые данные о прогностической ценности этого маркера, уровень экспрессии которого не всегда коррелирует с эффективностью анти-PD-1-терапии [10]. Корреляционная связь уровня мутационной нагрузки в клетках опухоли с эффективностью лечения препаратами, блокирующими ИКТ, в случае рака почки носит слабовыраженный характер и малорезультативна при ее использовании в качестве прогностического маркера [11]. Следует отметить, что в настоящее время нет полного представления о том, что способствует развитию иммуносупрессии организма больного по отношению к опухоли и какие молекулярные маркеры являются оптимальными при назначении тех или иных иммунотерапевтических лекарственных средств.

В связи с этим актуальной задачей представляется создание персонализированной модельной системы для оценки Т-клеточного иммунного ответа, что поможет расширить число методов, позволяющих диагностировать состояние иммунной системы больного и прогнозировать эффективность противоопухолевой иммунотерапии.

Цель исследования – создание модельной системы для оценки Т-клеточного иммунного ответа на клетки рака почки больного.

Материалы и методы

Получение первичной культуры клеток и фракции Т-клеток. Первичную культуру опухолевой ткани почки получали в стандартных стерильных условиях

клеточного бокса общепринятым методом с использованием коллагеназы. Клетки культивировали в ростовой среде RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), добавки: 1 % инсулин-трансферрин-селенит, эпидермальный фактор роста 5 мкг/мл и 1 % пенициллин/стрептомицин.

Фракцию Т-клеток периферической крови получали из мононуклеарных клеток с использованием стандартного набора EasySep™ Human T Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies, США) в строгом соответствии с рекомендациями производителя. Активацию проводили с помощью антител к CD3 (functional grade, Cat. No. 16-0037-81) и CD28 (functional grade, Cat. No. 16-00289-81) компании Invitrogen. В 12-луночный планшет вносили антитела к CD3 (1 мкг/мл) в стерильном фосфатно-солевом буфере, инкубировали при температуре 37 °С в течение 2 ч. Затем из лунок удаляли раствор и вносили суспензию Т-клеток в среде RPMI-1640, содержащей 10 % FBS, 2 мМ L-глутамин, 1 % пенициллин/стрептомицин и антитела к CD28 (5 мкг/мл). Инкубировали клетки в течение 72 ч.

Удаление мертвых клеток из популяции перед постановкой экспериментов осуществляли с помощью стандартного набора EasySep™ Dead Cell Removal (Annexin V) Kit (STEMCELL Technologies, США) в строгом соответствии с рекомендациями производителя. Количество клеток в обогащенной фракции подсчитывали в счетчике Countess II FL (Life Technologies, США), оценку жизнеспособности проводили с использованием 0,1 % раствора трипанового синего.

Проточная цитометрия. Содержание цитокератина 7, 8, меченного изотиоцианатом флуоресцеина (FITC) (Ex/Em = 495/519 нм), определяли общепринятым методом. Суммарное количество клеток

оценивали с помощью окрашивания йодидом пропидия (Ex/Em = 535/615 нм).

Оценка пролиферативной активности. Оценка изменения показателя «клеточный индекс» проводили с применением биосенсорной технологии RTCA xCELLigence (ACEA Biosciences, США). Регистрацию сигнала и статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ RTCA Software Lite v.2.2.5. Относительное изменение времени удвоения суммарной клеточной популяции рассчитывали по формуле: RI (relative indicator) = T_{tr}/T_{ntr} , где T_{tr} – время удвоения после обработки; T_{ntr} – время удвоения в группе сравнения (без обработки).

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки данных использовали пакет программ Microsoft Excel 2019.

Результаты

Разрабатываемая нами модель базируется на функциональной оценке цитотоксического действия Т-лимфоцитов, которые отделяют от остальных клеток иммунной системы с помощью иммуномагнитной отрицательной селекции.

Особенности клеточного иммунного ответа на злокачественную опухоль у больного оценивали с использованием ткани опухоли, полученной в ходе резекции почки при клинически локализованном или местно-распространенном раке. Средний возраст больных составил 60,8 года. В большинстве случаев опухоль была распространена на почечную вену, но не выходила за пределы фасции Герота (стадия T3) (табл. 1). На гистологическом уровне полученные для исследования образцы ткани были классифицированы как низкодифференцированный светлоклеточный почечно-клеточный рак.

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком

Table 1. Clinical and morphological characteristics of renal cell carcinoma patients

№	Пол Gender	Возраст, лет Age, years	Стадия по классификации TNM TNM stage	Степень дифференцировки Grade	Сопутствующие заболевания Concomitant diseases
1	Мужской Male	53	T3aN1M1	G ₄	—
2	Женский Female	62	T3bN0M1	G ₄	Гипертоническая болезнь, тромбоз легочной артерии, хроническая болезнь почек, анемия легкой степени, язва двенадцатиперстной кишки, мультифокальный атеросклероз Hypertension, pulmonary embolism, chronic kidney disease, anemia of mild degree, duodenal ulcer, multifocal atherosclerosis
3	Женский Female	65	T3cN0M0	G ₂	Гипертоническая болезнь Hypertension
4	Мужской Male	67	T3NxM0	G ₄	Гипертоническая болезнь, анемия легкой степени Hypertension, anemia of mild degree

№	Пол Gender	Возраст, лет Age, years	Стадия по классификации TNM TNM stage	Степень диффе- ренци- ровки Grade	Сопутствующие заболевания Concomitant diseases
5	Мужской Male	68	T3aN1M1	G ₃	Гипертоническая болезнь, анкилозирующий спондилит (болезнь Бехтерева) Hypertension, ankylosing spondylitis (Bekhterev's disease)
6	Мужской Male	67	T3bNxM0	G ₃	—
7	Мужской Male	64	T3aN0M0	G ₂	Гипертоническая болезнь Hypertension
8	Мужской Male	47	T3bN1M1	G ₃	—
9	Мужской Male	41	T3aN0M0	G ₃	—
10	Мужской Male	64	T1bN0M0	G ₃	—
11	Мужской Male	69	T2N0M0	G ₃	Гипертоническая болезнь, хронический бронхит, доброкачественная гиперплазия предстательной железы Hypertension, chronic bronchitis, benign prostatic hyperplasia
12	Мужской Male	55	T2bN0M0	G ₂	—
13	Мужской Male	71	T3aN0M0	G ₃	Гипертоническая болезнь, доброкачественная гиперплазия предстательной железы, аритмия, мочекаменная болезнь, калькулезный простатит, узловой зоб, поверхностный гастрит Hypertension, benign prostatic hyperplasia, arrhythmia, urolithiasis, calculous prostatitis, nodular goiter, superficial gastritis
14	Мужской Male	64	T3aN0M0	G ₃	Аритмия, сердечная недостаточность Arrhythmia, heart failure
15	Мужской Male	69	T3aN1M0	G ₃	Гипертоническая болезнь, сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца Hypertension, heart failure, coronary heart disease
16	Женский Female	75	T1bN0M0	G ₃	Гипертоническая болезнь, аритмия, хронический гастрит Hypertension, arrhythmia, chronic gastritis
17	Женский Female	41	T1bN0M0		—
18	Женский Female	53	T2aN0M0	G ₃	Калькулезный холецистит Calculous cholecystitis

Ключевой элемент модельной системы — клетки опухоли — получали из образцов опухолевой ткани, иссеченной в ходе хирургического лечения, после диссоциации коллагеназой и краткосрочного культивирования (рис. 1). Элиминирование мертвых и апоптотических клеток из популяции проводили путем иммуномагнитной отрицательной селекции на аннексин V. Степень фенотипической однородности популяций клеток оценивали иммунофенотипированием с использованием маркера

эпителиальной дифференциации цитокератина 7, 8 (Anti-SAM 5.2). Доля цитокератин-положительных клеток в полученных нами культурах составляла 93–98 %.

Вторым компонентом системы являлись Т-лимфоциты периферической крови больных, которые получали с помощью иммуномагнитной отрицательной селекции. Забор крови проводили в день операции. В образцах периферической крови определяли ключевые показатели Т-клеточного иммунитета больных (табл. 2). Пока-

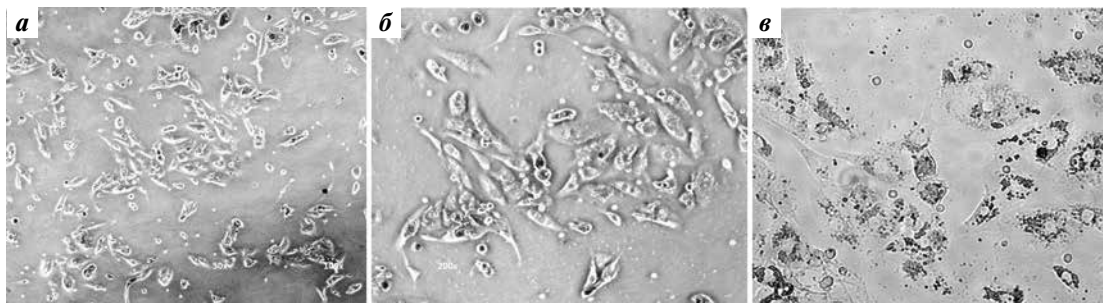


Рис. 1. Клетки, полученные из образцов опухолевой ткани (диссоциация коллагеназой), $\times 50$ (а), $\times 100$ (б), $\times 200$ (в)
Fig. 1. Cells obtained from tumor tissue samples (collagenase dissociation), $\times 50$ (a), $\times 100$ (b), $\times 200$ (v)

зано, что статистические характеристики Т-лимфоцитов периферической крови варьируют у больных, однако фракция активированных Т-клеток $CD3^+HLA-DR^+$ присутствовала во всех без исключения случаях. Для ответа на вопрос, достаточно ли этих клеток для оценки цитотоксического эффекта, была проведена серия специальных экспериментов.

Оценку цитотоксической активности периферических Т-лимфоцитов выполняли с использованием биосенсорной технологии RTCA xCELLigence (ACEA Biosciences, США). Основное преимущество этого подхода – возможность анализировать изменение численности клеточной популяции в реальном времени. Для этого клетки опухоли и полученную от того же больного фракцию Т-клеток культивировали совместно в течение 24 ч, анализируя изменения численности

клеточной популяции с интервалом 30 мин. В исследовании оценивали следующие варианты соотношений между клетками опухоли и Т-клетками при совместном культивировании: 1:0, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10. В качестве контроля сравнения использовали клетки опухоли. На основании полученных данных рассчитывали показатели «клеточный индекс» и «время удвоения популяции клеток», которые сопоставляли между собой. Какого-либо заметного влияния Т-клеток на пролиферативную активность клеток опухоли при совместном культивировании не выявлено. Параллельно были проведены эксперименты по культивированию тех же клеток с внесением в среду 25 мкг/мл пембролизумаба (анти-PD-1) и 12,5 мкг/мл авелумаба (анти-PD-L1) с целью нивелировать потенциально возможный эффект блокирующего действия PD-L1. Каких-либо значимых различий

Таблица 2. Статистические характеристики Т-лимфоцитов периферической крови больных раком почки
Table 2. Characteristics of T-lymphocytes in peripheral blood of kidney cancer patients

Популяции и субпопуляции Т-лимфоцитов Populations and subpopulations of T-lymphocytes	Фенотип Phenotype	Среднее значение, % Average value, %		95 % доверительный интервал 95 % confidence interval	
		Выборка Sample	Референсное значение [12] Reference [12]	Выборка Sample	Референсное значение [12] Reference [12]
Т-лимфоциты общие Total T-lymphocytes	CD3 ⁺	70,1	72,7	56,0–84,3	71,7–73,6
Т-хелперы T-helpers	CD3 ⁺ CD4 ⁺	45,9	43,1	35,8–56,1	42,3–44,3
	CD4 ⁺ CD25 ⁺	16,3	8,8	10,0–22,7	9,0–11,4
Цитотоксические Т-лимфоциты Cytotoxic T-lymphocytes	CD3 ⁺ CD8 ⁺	22,0	26,0	14,5–29,5	25,3–26,7
	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	7,4	7,3	3,4–11,5	7,0–8,2
	CD8 ⁺ CD28 ⁺	9,9	17,1	6,4–13,5	15,3–17,6
	CD8 ⁺ CD95 ⁺	16,9	12,6	9,4–24,5	8,7–16,5
	CD8 ⁺ Perforin ⁺	13,7	12,4	5,9–21,5	11,9–13,3

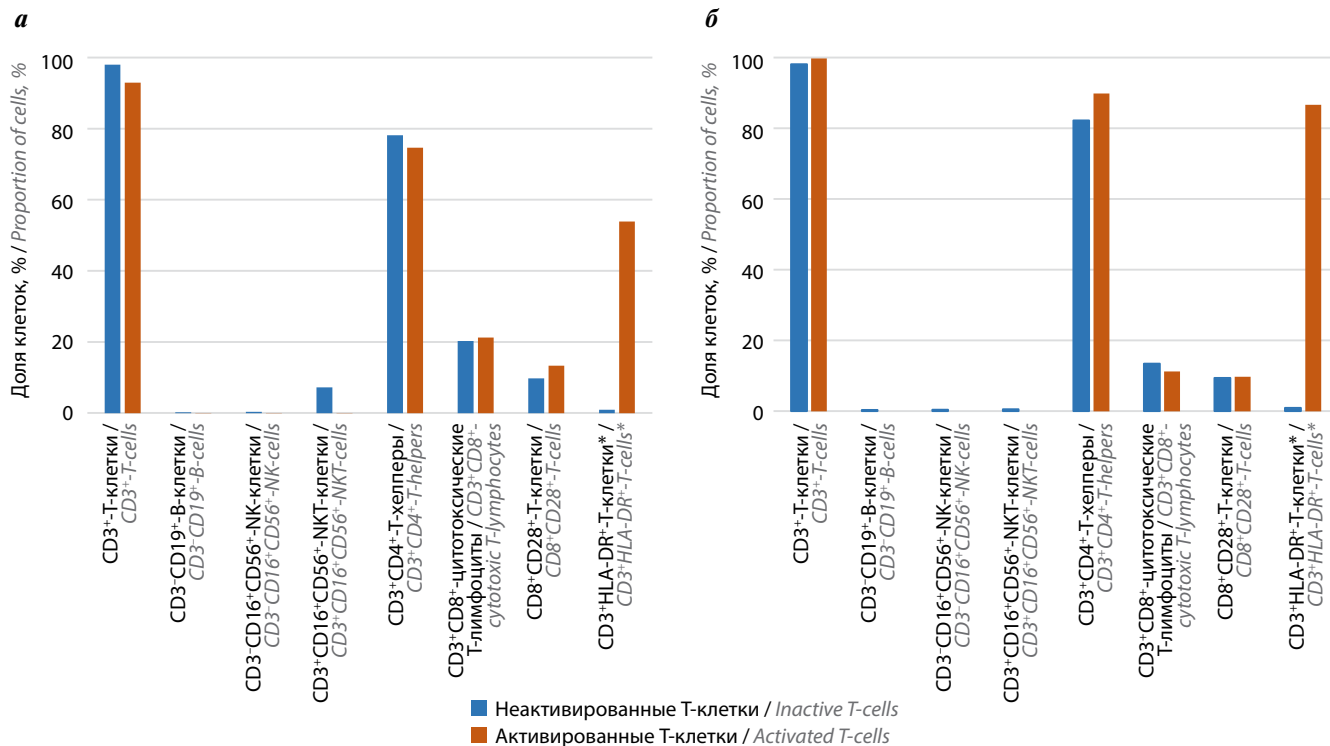


Рис. 2. Иммунологический профиль неактивированных и активированных Т-клеток 2 больных (а, б). *Доля клеток с фенотипом CD3⁺, несущих HLA-DR-антиген

Fig. 2. Immunological profile of inactive and activated T-cells of two patients (a, б). *The proportion of cells with CD3⁺ phenotype carrying HLA-DR antigen

между тестируемыми культурами клеток не обнаружено. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что использование суммарной фракции Т-лимфоцитов без предварительной подготовки не позволяет оценить цитотоксический потенциал Т-клеток периферической крови по отношению к клеткам опухоли.

В следующей серии экспериментов выполняли оценку цитотоксического действия активированных Т-лимфоцитов периферической крови на клетки опухоли. Активацию проводили с помощью антител к CD3 и к CD28 (functional grade) компании Invitrogen.

Примеры иммунологических профилей неактивированных и активированных Т-клеток представлены на рис. 2. Из полученных данных следует, что активация способствовала значительному увеличению доли клеток, несущих рецептор HLA-DR (CD3⁺HLA-DR⁺) в популяции (рис. 3).

Следует отметить, что суммарное увеличение доли активированных Т-клеток не гарантирует наличия Т-клеточного иммунного ответа на специфические неоантигены опухоли. Для оценки цитотоксического потенциала активированных Т-клеток больного были

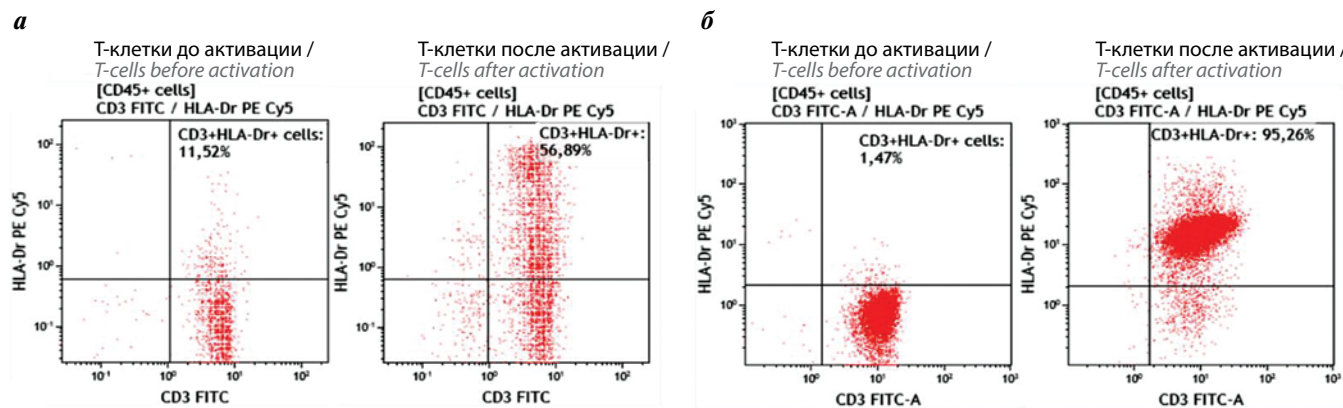


Рис. 3. Цитограммы коэкспрессии CD3 и HLA-DR-антигенов на поверхности лимфоцитов 2 больных (а, б) до и после их активации

Fig. 3. Cytograms of CD3 and HLA-DR antigen expression on the lymphocyte surface of two patients (a, б) before and after their activation

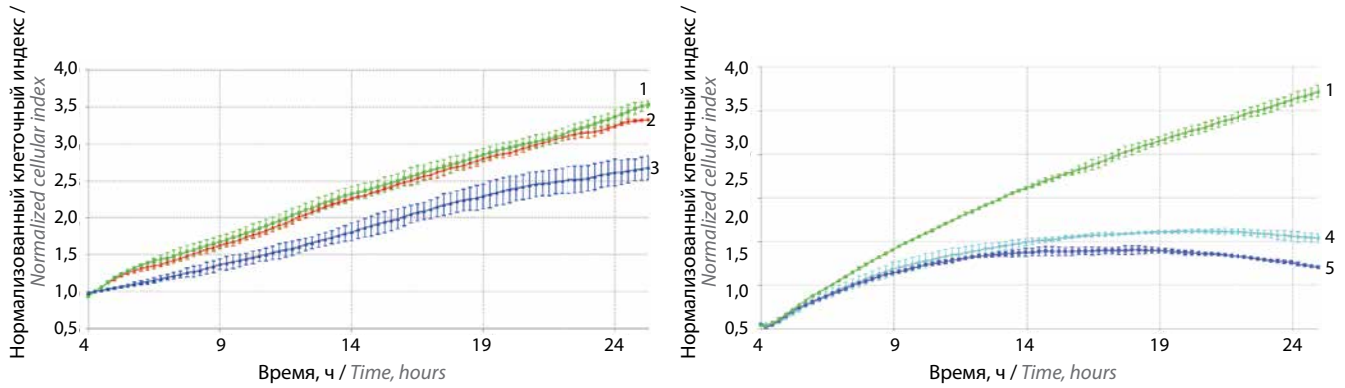


Рис. 4. Оценка пролиферативной активности клеточной популяции по клеточному индексу. 1 – контроль, клетки опухоли; 2 – клетки опухоли/неактивированные Т-лимфоциты в соотношении 1:8; 3 – клетки опухоли/активированные Т-лимфоциты в соотношении 1:8; 4 – клетки опухоли/активированные Т-лимфоциты в соотношении 1:5; 5 – клетки опухоли/активированные Т-лимфоциты в соотношении 1:10

Fig. 4. Evaluation of the proliferative activity of the cell population by cell index. 1 – control, tumor cells; 2 – tumor cells/T-lymphocytes in a ratio of 1:8; 3 – tumor cells/activated T-lymphocytes in a ratio of 1:8; 4 – tumor cells/activated T-lymphocytes in a ratio of 1:5; 5 – tumor cells/activated T-lymphocytes in a ratio of 1:10

проведены специальные дополнительные исследования. В частности, показано, что в отличие от неактивированных клеток активированные Т-лимфоциты, полученные от того же больного, способны обеспечить снижение пролиферативной активности популяции опухолевых клеток (рис. 4). Это позволяет предположить, что к моменту хирургического лечения у пациента был сформирован клеточный иммунный ответ, который и обеспечил наблюдаемый эффект в условиях *in vitro*. Кроме того, было показано, что выраженность цитотоксического эффекта носит дозозависимый характер и, скорее всего, обусловлена количеством Т-клеток, способных распознать неоантигены опухолевых клеток (см. рис. 4).

В последующей серии экспериментов была проведена оценка воспроизводимости получаемых результатов и предложен критерий для сопоставления данных,

полученных на клеточных линиях, которые изначально могут обладать различным пролиферативным потенциалом. В качестве критерия при сопоставлении результатов было предложено использовать индекс относительного изменения времени удвоения (см. раздел «Материалы и методы»). Необходимость введения такого индекса связана с тем, что фактическое (регистрируемое) время удвоения во многом зависит от пролиферативных свойств культуры и не может быть стандартизировано в силу существующей биологической вариабельности, что делает невозможным прямое использование этого показателя при сопоставлении результатов, полученных в разных экспериментах. Результаты тестирования с использованием индекса относительного изменения времени удвоения представлены в табл. 3.

Таблица 3. Относительное изменение времени удвоения популяции клеток при совместном культивировании: клетки опухоли/фракция Т-клеток в присутствии пембролизумаба и авелумаба

Table 3. Relative doubling time of the cell population in co-cultivation: tumor cells/T-cell fraction treated by pembrolizumab and avelumab

№	Стадия по классификации TNM TNM stage	Степень дифференцировки Grade	Индекс относительного изменения времени удвоения Relative doubling time of the cell population	
			Т-клетки T-cells	Активированные Т-клетки Activated T-cells
1	T1bN0M0	G ₃	0,95	2,89
2	T3aN1M0	G ₃	1,2	0
3	T3aN0M0	G ₃	1,04	1,14
4	T1bN0M0	Нет данных No data	0,99	1,0
5	T2N0M0	G ₃	0,95	4,84
6	T2bN0M0	G ₂	1,14	0

Полученные данные показали, что предложенный индекс позволил сопоставить анализируемые клеточные популяции светлоклеточного почечно-клеточного рака по эффекту действия Т-клеток при совместном культивировании. Наблюдали 3 типа Т-клеточного ответа на клетки опухоли: с существенным замедлением пролиферации клеток опухоли (см. табл. 3, № 1 и 5), очень слабый ответ (№ 3) или его отсутствие (№ 4) и полное отсутствие пролиферации клеток опухоли (№ 2 и 6). Было предположено, что полная регрессия пролиферативной активности клеточной популяции связана с полной гибелью клеток в результате цитолитической активности лимфоцитов. В наблюдаемых случаях это было подтверждено дополнительными экспериментами, в которых цитотоксическую активность оценивали с помощью проточной цитометрии. В качестве образца сравнения использовали опухолевые клетки, культивируемые совместно с неактивированными Т-лимфоцитами. Перед проведением измерений мертвые и апоптотические клетки удаляли из культуры с помощью иммуномагнитной отрицательной селекции на аннексин V. Количество живых клеток опухоли определяли с помощью маркера эпителиальной дифференциации цитокератин 7, 8 (Anti-CAM 5.2). Было определено отсутствие таких клеток. Полученные данные подтвердили полную гибель клеток опухоли после совместного культивирования с активированными аутологичными Т-лимфоцитами.

Обсуждение

Разработанная нами модель оценки эффективности клеточного иммунного ответа основывается на том, что клетки опухоли экспрессируют на своей поверхности белки главного комплекса гистосовместимости класса I, несущие пептиды мутантных белков, которые могут быть распознаны Т-клеточными рецепторами. Отсутствие таких пептидов или рецепторов, способных их распознать, а также активация ИКТ позволяют опухолевой клетке ускользнуть от иммунной атаки цитотоксических лимфоцитов.

Нами предложена модельная система, позволяющая оценивать реакцию иммунных Т-клеток на раковые клетки того же больного. С использованием этой системы выявлены различия такой реакции среди опухолей ряда больных. Полученные результаты соответствуют клиническим данным о доле больных светлоклеточным почечно-клеточным раком с существенным ответом иммунной системы на опухоль при ингибировании оси PD-1/PD-L1 [8–10]. В нашем случае внесение в культуру с активированными Т-клетками системы антител, блокирующих действие PD-1 и PD-L1, привело к полному устранению клеток опухоли 2 из 6 больных, еще у 2 пациентов отмечен частичный ответ, у оставшихся 2 больных практически не наблюдалось эффекта. Последний результат может означать потен-

циально низкую эффективность применения этих препаратов для лечения указанных больных, выступивших донорами клеточного материала.

Существующие в настоящее время сведения о молекулярных механизмах активации и супрессии противоопухолевого иммунного ответа далеко не полны, и критерии, позволяющие с высокой достоверностью предсказать эффективность иммунного ответа организма на опухоль при использовании ингибиторов ИКТ, отсутствуют. Поэтому прямое тестирование цитотоксического действия популяций Т-лимфоцитов на раковые клетки больного представляется перспективным направлением по разработке методов прогнозирования, позволяющих оценить целесообразность применения тех или иных иммунотерапевтических лекарственных средств в онкологии.

Регистрация пролиферативных свойств популяции клеток с помощью биосенсорной технологии RTCA xCELLigence предполагает определение изменений времени удвоения популяции, которое зависит от доли тех клеток, которые тем или иным образом ускользнули от иммунной атаки цитотоксических Т-лимфоцитов. Такое ускользание может быть связано с активацией иных, по отношению к PD-1/PD-L1, ИКТ, способных ингибировать действие иммунной системы. Не исключено отсутствие у части клеток неоантигена или презентующего его рецептора. Культивирование в присутствии ингибиторов ИКТ позволяет оценить эффективность их действия для конкретного больного, что может быть использовано в качестве прогностической оценки при выборе средств лечения. Весьма существенной является возможность применения созданной системы для поиска новых эффективных мишеней ИКТ и средств их ингибирования.

«Золотым стандартом» оценки цитолитической активности Т- и НК-клеток принято считать анализ на высвобождение хрома (the chromium release assay, CRA), который используется с 60-х годов прошлого века и предполагает предварительное мечение клеточной мишени изотопом. В течение последних десятилетий было предложено несколько неизотопных подходов к оценке цитолитической активности клеток с использованием витальных красителей. Широкое распространение получил метод на основе окрашивания эффекторных клеток кальцеином АМ с последующим анализом их с помощью проточной цитометрии [13]. Существенным ограничением этого подхода является время удерживания красителя клетками, которое составляет примерно 4 ч. Измерение цитотоксического эффекта, значительно выходящего за этот временной интервал, представляется невозможным. Недавно было предложено проводить оценку цитотоксичности Т- и НК-клеток с использованием биолюминесценции на основе люциферазы и флуоресценции на основе эфира CFSE [14]. При использовании биолюминес-

центного подхода считается, что клетки-мишени стабильно экспрессируют фермент люциферазу, и их жизнеспособность измеряется по испусканию фотонов при добавлении субстрата d-люциферина и цитотоксических лимфоцитов, что предполагает сложный подготовительный этап, плохо совместимый с рутинной клинической практикой. К достоинствам метода относится возможность оценить кинетику процесса. Во втором случае клетки-мишени метят сукцинимидильными группами эфира, которые реагируют с внутриклеточными аминами, формируя флуоресцентный конъюгат с белками. Измерение флуоресценции проводят с помощью проточной цитометрии. Как и в случае с кальцеином АМ, этот метод не позволяет проследить динамику процесса в нескольких временных точках [14].

Общими недостатками всех перечисленных подходов являются потребность в достаточно большом количестве биологического материала, сложность пробоподготовки и регистрации измеряемого сигнала.

Предложенная нами модель анализа действия активированных Т-лимфоцитов периферической крови на клетки опухоли почки значительно упрощает техническую сторону процедуры, позволяет анализировать небольшие количества клинического материала, которые получают в рамках общепринятых рутинных процедур, проводит оценку в режиме реального времени и в присутствии тестируемых лекарственных средств.

Заключение

Создана модельная система для оценки Т-клеточного иммунного ответа на клетки рака почки больного. С ее использованием выявлены различные результаты действия Т-клеток на клетки рака почки разных больных, включая полное устранение раковых клеток и отсутствие такого влияния. Разработанная модель имеет ряд преимуществ перед известными способами анализа действия Т-клеток и в дальнейшем может быть применена для тестирования эффективности ингибирования тех или иных ИКТ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 252 с.
Malignant tumors in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, A.O. Shachzadova. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2021. 252 p. (In Russ.).
2. Мерабишвили В.М., Полторацкий А.Н., Носов А.К. и др. Состояние онкологической помощи в России. Рак почки (заболеваемость, смертность, достоверность учета, одногодичная и годовичная летальность, гистологическая структура). Часть 1. Онкоурология 2021;17(2):182–94. DOI: 10.17650/1726-9776-2021-17-2-182-194
Merabishvili V.M., Poltorackiy A.N., Nosov A.K. et al. The state of oncology care in Russia. Kidney cancer (morbidity, mortality, index of accuracy, one-year and year-by-year mortality, histological structure). Part 1. Onkourologiya = Cancer Urology 2021;17(2): 182–94. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2021-17-2-182-194
3. Носов Д.А., Алексеев Б.Я., Гладков О.А. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению почечно-клеточного рака. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO 2021;11(3s2):31. DOI: 10.18027/2224-5057-2021-11-3s2-31
Nosov D.A., Alekseev B.Ya., Gladkov O.A. et al. Practical guidelines for drug treatment of renal cell cancer. Zlokachestvennye opukholi: Prakticheskie rekomendatsii RUSSCO = Malignant Tumors: RUSSCO Practical Guidelines RUSSCO 2021;11(3s2):31. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2021-11-3s2-31
4. Alva A., Daniels G.A., Wong M.K. et al. Contemporary experience with high-dose interleukin-2 therapy and impact on survival in patients with metastatic melanoma and metastatic renal cell carcinoma. Cancer Immunol Immunother 2016;65(12):1533–44. DOI: 10.1007/s00262-016-1910-x
5. Rini B.I., Plimack E.R., Stus V. et al. Pembrolizumab plus axitinib versus sunitinib for advanced renal-cell carcinoma. N Engl J Med 2019;380(12):1116–27. DOI: 10.1056/NEJMoa1816714
6. Chevrier S., Levine J.H., Zanotelli V.R.T. et al. An immune atlas of clear cell renal cell carcinoma. Cell 2017;169(4):736–49.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2017.04.016
7. Xu Y., Miller C.P., Warren E.H., Tykodi S.S. Current status of antigen-specific T-cell immunotherapy for advanced renal-cell carcinoma. Hum Vaccin Immunother 2021;17(7):1882–96. DOI: 10.1080/21645515.2020.1870846
8. Raimondi A., Sepe P., Zattarin E. et al. Predictive biomarkers of response to immunotherapy in metastatic renal cell cancer. Front Oncol 2020;10:1644. DOI: 10.3389/fonc.2020.01644
9. Shen M., Chen G., Xie Q. et al. Association between PD-L1 expression and the prognosis and clinicopathologic features of renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. Urol Int 2020;104(7–8):533–41. DOI: 10.1159/000506296
10. Набережных Д.С., Морозов А.А., Фридман М.В. и др. Система PD-1/PD-L1 при иммунотерапии рака почки. Часть 2. Маркеры и препараты иммунотерапии рака почки. Медицинский алфавит 2019;1(10):54–61. DOI: 10.33667/2078-5631-2019-1-10(385)-54-61
Naberezhnov D.S., Morozov A.A., Fridman M.F. et al. PD-1/PD-L1 pathway at immunotherapy of renal cell carcinoma. Part 2. Functions of signal way PD-1/PD-L1 for immune system and immunotherapy. Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet 2019;1(10):54–61. (In Russ.). DOI: 10.33667/2078-5631-2019-1-10(385)-54-61
11. Braun D.A., Hou Y., Bakouny Z. et al. Interplay of somatic alterations and immune infiltration modulates response to PD-1 blockade in advanced clear cell renal cell carcinoma. Nat Med 2020;26(6):909–18. DOI: 10.1038/s41591-020-0839-y
12. Борунова А.А., Заботина Т.Н., Шоуа Э.К. и др. Субпопуляционная структура лимфоцитов периферической крови доноров. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(4):54–64. DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-54-64
Borunova A.A., Zabotina T.N., Shoua E.K. et al. Subpopulation structure of peripheral blood lymphocytes of donors. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(4):54–64. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-54-64

13. Jang Y.Y., Cho D., Kim S.K. et al. An improved flow cytometry-based natural killer cytotoxicity assay involving calcein AM staining of effector cells. *Ann Clin Lab Sci* 2012;42(1):42–9.
14. Coronello C., Busà R., Cicero L. et al. Radioactive-free method for the thorough analysis of the kinetics of cell cytotoxicity. *J Imaging* 2021;7(11):222. DOI: 10.3390/jimaging7110222

Вклад авторов

А.Ю. Кузеванова: получение экспериментальных данных, написание статьи;
О.А. Халмурзаев: клиническая работа с пациентами;
А.А. Борунова, Н.В. Апанович, Т.Н. Заботина: получение экспериментальных данных;
А.А. Алимов: разработка дизайна исследования, получение экспериментальных данных, анализ данных литературы, написание статьи;
В.Б. Матвеев: клиническая работа с пациентами, научное редактирование текста;
А.В. Карпукхин: разработка дизайна исследования, общее руководство работой, окончательное редактирование и одобрение текста рукописи.

Authors' contributions

A.Yu. Kuzevanova: obtaining experimental data, article writing;
O.A. Khalmurzaev: clinical work with patients;
A.A. Borunova, N.V. Apanovich, T.N. Zabolina: obtaining experimental data;
A.A. Alimov: developing the research design, obtaining experimental data, literature data analysis, article writing;
V.B. Matveev: clinical work with patients, scientific article editing;
A.V. Karpukhin: developing the research design, general leadership, final editing and approval of the text of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.Ю. Кузеванова / A.Yu. Kuzevanova: <https://orcid.org/0000-0001-6156-9725>
О.А. Халмурзаев / O.A. Khalmurzaev: <https://orcid.org/0000-0001-7500-1815>
А.А. Борунова / A.A. Borunova: <https://orcid.org/0000-0002-1854-3455>
Н.В. Апанович / N.V. Apanovich: <https://orcid.org/0000-0002-9221-115X>
Т.Н. Заботина / T.N. Zabolina: <https://orcid.org/0000-0001-7631-5699>
А.А. Алимов / A.A. Alimov: <https://orcid.org/0000-0002-8495-7728>
В.Б. Матвеев / V.B. Matveev: <https://orcid.org/0000-0001-7748-9527>
А.В. Карпукхин / A.V. Karpukhin: <https://orcid.org/0000-0002-7001-9116>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова».

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for Research Centre for Medical Genetics.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией. Протокол исследования был утвержден комитетом по этике ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова» (№ 2017-4/2).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Research Centre for Medical Genetics (No. 2017-4/2).

All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 09.11.2022. Принята к публикации: 21.01.2023.
Article submitted: 09.11.2022. Accepted for publication: 21.01.2023.