

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-124-136>

# Характеристика эффекторов адаптивного иммунитета, вовлеченных во вторичный ксеногенный иммунный ответ на клетки меланомы человека

Н.А. Персиянцева, А.А. Калинина, М.А. Замкова, Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Надежда Александровна Персиянцева [nadushka99@gmail.com](mailto:nadushka99@gmail.com)

**Введение.** В настоящее время развиваются подходы адоптивной клеточной терапии онкологических заболеваний с использованием Т-клеток, генетически модифицированных Т-клеточными рецепторами (ТКР) со специфичностью к опухолевым антигенам. Трудоемкость идентификации антигенспецифических ТКР в репертуаре пациента и отбора терапевтических рецепторов делает актуальной разработку экспериментальных стратегий генерации опухолеспецифических Т-клеток. Одной из них может быть ксеногенная иммунизация модельных животных клетками опухоли человека. Представляется привлекательной идея, что репертуар Т-клеток, стимулированный ксеногенной иммунизацией, может стать источником для поиска ТКР, пригодных для адоптивной иммунотерапии опухолей человека.

**Цель исследования** – анализ динамики вторичного ксеногенного ответа в модели индукции иммунного ответа у мышей на клетки меланомы человека для оценки перспектив использования ксеногенных иммунизаций для генерации опухолеспецифических Т-клеток памяти и идентификации их ТКР, подходящих для адоптивной иммунотерапии.

**Материалы и методы.** Мышей иммунизировали клетками меланомы человека; через 45 дней повторно вводили иммунизирующую опухоль. Динамику развития вторичного иммунного ответа *in vivo* и состав вовлеченных эффекторов адаптивного иммунитета анализировали методом проточной цитофлуориметрии. В культуре *in vitro* оценивали пролиферативный ответ лимфоцитов иммунных мышей на клетки иммунизирующей и сторонней меланомы человека.

**Результаты.** Вторичный ксеногенный ответ характеризовался более интенсивным накоплением Т-клеток и быстрым развитием эффекторной фазы в месте введения меланомы человека. Это коррелировало с усиленным пролиферативным ответом *in vitro* лимфоцитов иммунных животных на ксеноантигены иммунизирующей опухоли. CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клетки памяти вносили равный вклад в развитие вторичного ответа на клетки меланомы человека, экспрессирующей молекулы антигенов гистосовместимости (human leukocyte antigens, HLA) классов I и II. При экспрессии только HLA класса I на клетках иммунизирующей ксеногенной опухоли формировались CD8<sup>+</sup>-клетки памяти, которые доминировали во вторичном иммунном ответе.

**Заключение.** Полученные нами данные подтвердили, что в ходе ксеногенной иммунизации формируется специфическая иммунологическая память к ксеноантигенам. Это указывает на возможность генерации ксеногенных ТКР, специфичных к антигенам опухоли человека, и открывает перспективы для разработки стратегий поиска среди них вариантов рецепторов, пригодных для адоптивной иммунотерапии опухолей человека.

**Ключевые слова:** ксеногенный иммунный ответ, ксеноантиген, Т-клетки памяти

**Для цитирования:** Персиянцева Н.А., Калинина А.А., Замкова М.А. и др. Характеристика эффекторов адаптивного иммунитета, вовлеченных во вторичный ксеногенный иммунный ответ на клетки меланомы человека. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):124–36. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-124-136>

## Characteristics of adaptive immune effectors involved in the secondary xenogeneic immune response to human melanoma cells

N.A. Persiyantseva, A.A. Kalinina, M.A. Zamkova, L.M. Khromykh, D.B. Kazansky

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

**Contacts:** Nadezhda Alexandrovna Persiyantseva [nadushka99@gmail.com](mailto:nadushka99@gmail.com)

**Introduction.** Current approaches are being developed for adoptive cancer therapy using T-cells genetically modified with T-cell receptors (TCRs) with specificity for tumor antigens. The complexities of identifying antigen-specific TCRs in a patient's repertoire and selecting therapeutic receptors necessitate the development of experimental strategies for generating tumor-specific T cells. One of such approaches could be the xenogeneic immunization of mice with human tumor cells. It seems plausible that the T cell repertoire stimulated by xenogeneic vaccination could be a source of TCRs suitable for adoptive cancer immunotherapy.

**Aim.** To assess the prospects for using xenogeneic immunizations to generate tumor-specific memory T cells and identify their TCRs suitable for adoptive immunotherapy, we studied the dynamics of the secondary xenogeneic response in a model of induction of an immune response in mice to human melanoma cells.

**Materials and methods.** Mice were immunized with human melanoma cells, and 45 days later, they were re-challenged with the immunizing tumor. The dynamics of the development of the secondary immune response *in vivo* and the composition of the involved effectors of adaptive immunity were analyzed by flow cytometry. The proliferation of lymphocytes from immune mice in response to human melanoma cells was evaluated in *in vitro* culture.

**Results.** The secondary xenogeneic response was characterized by a more intense accumulation of T cells and the rapid development of the effector phase at the injection site of human melanoma. This correlated with an enhanced *in vitro* proliferative response of lymphocytes from immune animals to xenoantigens of the immunizing tumor. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> memory T cells contributed equally to the development of a secondary response to human melanoma cells expressing HLA class I and II molecules. When only HLA class I was expressed on the cells of the immunizing xenogeneic tumor, CD8<sup>+</sup> memory cells were formed, which dominated the secondary immune response.

**Conclusion.** Our findings confirmed the formation of a specific immunological memory for xenoantigens during xenogeneic immunization. This suggests the possibility of generating xenogeneic TCRs specific for human tumor antigens, which opens up opportunities to developing approaches for screening among them for receptor variants suited for adoptive immunotherapy of human cancers.

**Keywords:** xenogeneic immune response, xenoantigen, memory T-cells

**For citation:** Persiyantseva N.A., Kalinina A.A., Zamkova M.A. et al. Characteristics of adaptive immune effectors involved in the secondary xenogeneic immune response to human melanoma cells. *Uspehi Molekularnoj Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):124–36. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-124-136>

## ВВЕДЕНИЕ

Ксеногенная трансплантация приобретает все большую актуальность в связи с растущей потребностью в донорском материале. Детальное изучение механизмов развития ксеногенного иммунного ответа имеет первостепенное значение для клинической практики, позволяет разрабатывать терапевтические подходы для подавления реакции «хозяин против трансплантата» и успешного приживления ксенотрансплантата.

Существуют несколько форм отторжения ксенотрансплантата, отличающихся по проявлениям, динамике и механизмам действия. Сверхострое отторжение развивается уже через несколько минут или часов после трансплантации и обусловлено вовлечением естественных антител и активацией системы комплемента реципиента [1]. Как правило, эту фазу удается успешно преодолеть [1, 2]. Однако в дальнейшем может развиваться отсроченное отторжение ксенотрансплантата, которое протекает в острой или хронической форме [1]. В нем участвуют гуморальные факторы; также развивается клеточный иммунный ответ с привлечением эффекторов как врожденного (макрофаги, естественные киллеры (NK-клетки), нейтрофилы), так и адаптивного (CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоциты, В-клетки) иммунитета [1, 2].

Ключевую роль в первичном ксеногенном иммунном ответе играют CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоциты, являющиеся первым и основным типом клеток, инфильтрирующих

отторгаемый трансплантат [1–4]. Активированные CD4<sup>+</sup>-Т-клетки привлекают макрофаги и NK-клетки в ксенотрансплантат и опосредуют развитие В-клеточного ксеногенного ответа [2]. Высокое соотношение CD4/CD8-Т-клеток коррелирует с коротким временем жизни ксенотрансплантата. Данный параметр был предложен в качестве суррогатного прогностического маркера [5]. В связи с этим в настоящее время в ксеногенной трансплантологии основные усилия направлены на подавление функций CD4<sup>+</sup>-Т-клеток и блокирование путей их взаимодействия с В-лимфоцитами и макрофагами [6–9]. Между тем подобные стратегии иммуносупрессии не всегда оказываются достаточными для успешного приживления трансплантата, что может указывать на вовлечение в ксеногенный иммунный ответ CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов [8]. Действительно, в ряде работ показана большая роль CD8<sup>+</sup>-Т-клеток в отторжении ксенотрансплантата [10–14].

Клеточный ксеногенный иммунный ответ хуже поддается контролю и подавлению терапевтическими моноклональными антителами [2], поэтому часто наступает полное отторжение ксенотрансплантата [1, 2]. Известно, что при вторичной трансплантации ксенотрансплантаты отторгаются быстрее [12], что указывает на формирование у реципиента иммунологической памяти к ксеноантигенам [8, 12, 15]. Было показано, что CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клетки памяти вовлекаются во вторичный иммунный ответ, однако сегодня

нет полной ясности, какая субпопуляция вносит основную вклад в его развитие [8, 12].

В настоящее время активно развиваются подходы адоптивной клеточной терапии (АКТ) онкологических заболеваний с использованием Т-клеток, генетически модифицированных ТКР с заданной специфичностью к таргетным опухолевым антигенам [16]. Однако поиск терапевтических ТКР во многом затруднен в связи с низкой частотой и небольшим разнообразием клонов опухолеспецифических Т-клеток, формирующихся естественным образом в организме пациента [17]. Различные подходы к иммунотерапии могут стимулировать развитие противоопухолевых ответов *de novo* [18], увеличивая таким образом разнообразие репертуара опухолеспецифических ТКР; однако зачастую больные слабо отвечают на противоопухолевую иммунотерапию [19]. Возможность развития ксеногенного Т-клеточного иммунного ответа и формирования специфической иммунологической памяти к ксеноантигенам натолкнула нас на идею использования ксеногенных иммунизаций для получения Т-лимфоцитов, рецепторы которых будут обладать специфичностью к антигенам опухоли человека.

Предлагаемый нами подход может быть основан на индукции у экспериментальных животных ксеногенного иммунного ответа на антигены опухоли человека с последующим анализом сформированного репертуара рецепторов Т-лимфоцитов и отбором вариантов ТКР, обладающих специфичностью к антигенам иммунизирующей опухоли. Такая стратегия потенциально может облегчить поиск терапевтических ТКР для АКТ онкологических заболеваний. Теоретически при внедрении в Т-лимфоцит человека ксеногенный ТКР может полноценно функционировать и распознавать специфичный антиген в комплексе с антигенами гистосовместимости (human leukocyte antigens, HLA) [14, 20–22].

Для оценки перспективности разработки подобного экспериментального подхода мы изучили динамику развития вторичного ксеногенного иммунного ответа и охарактеризовали основные эффекторы, вовлеченные в этот процесс. С этой целью использовали модель индукции ксеногенного иммунного ответа на клетки меланомы человека у иммунокомпетентных мышей. Наше исследование показало, что через 45 дней после первичной трансплантации опухоли человека у мышей формируется иммунологическая память. И уже через 1–3 дня после повторного введения той же меланомы у иммунизированных животных развивается интенсивный иммунный ответ, равную роль в котором играют и CD4<sup>+</sup>, и CD8<sup>+</sup>-Т-клетки памяти. Полученные результаты проясняют функцию Т-клеток памяти в возникновении вторичного ксеногенного иммунного ответа, что имеет большое фундаментальное значение. Кроме того, наша работа обладает практической ценностью, позволяет оценить перспективы разработки новых стратегий иммуно-

супрессии с целью улучшения приживления ксенотрансплантатов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клеточные линии.** В работе использовали 2 линии меланомы человека: Mtp, экспрессирующую HLA классов I и II (HLA-A3, -A26 (10), -B13, -B41), и II, экспрессирующую только HLA класса I (HLA-A23 (9), -A26 (10), -B7, -B56 (22)), из коллекции Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России (табл. 1) [23–26].

Таблица 1. Характеристика клеточных линий меланомы человека Mtp и II

Table 1. Characteristics of human melanoma cell lines Mtp and II

Клеточная линия Cell line	Источник Origin	Пас-саж Passage	Экспрессия меланомных антигенов Melanoma antigens
Mtp	Меланома кожи бедра Thigh skin melanoma	35	CD63, HMW, MAGE
II	Метастаз меланомы кожи передней брюшной стенки в мягких тканях грудной клетки Metastases of the anterior abdominal wall skin melanoma in the soft tissues of the chest	>100	CD63, HMB45, HMW, MelanA, Tyrosinase, PTA, MAGE

Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (НПП «ПанЭко», Россия), обогащенной 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), а также 0,01 мг/мл ципрофлоксацина (KRKA, Словения) и 20 мМ NEPES (НПП «ПанЭко», Россия) при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> до 70–80 % монослоя.

**Животные и их иммунизация.** Мышей линии C57BL/6 получали из экспериментально-биологической лаборатории Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Для иммунизации использовали самок массой 18–20 г (6–8-недельного возраста). Животных иммунизировали путем внутрибрюшинного введения  $5 \times 10^6$  клеток меланомы человека линии Mtp или II (mel) в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7,4). Через 45 дней после иммунизации мышам повторно внутрибрюшинно вводили  $5 \times 10^6$  клеток соответствующей ксеногенной меланомы, которую использовали для первичной иммунизации животных. Аналогичным образом иммунизировали интактных мышей C57BL/6. Экспериментальные группы состояли из 3–4 мышей.

**Подготовка клеточных суспензий.** Через 1–7 дней после введения ксеногенной опухоли животных

умерщвляли методом цервикальной дислокации и извлекали лаваж брюшной полости. Для этого в их брюшную полость шприцем вводили 5 мл ледяной среды RPMI 1640 и отбирали 2 мл клеточной суспензии. Кроме того, у мышей стерильно извлекали селезенки и лимфатические узлы (ЛУ). Клетки осторожно выдавливали из стромы органов в гомогенизаторе Поттера в 3 мл PBS. Полученные суспензии клеток осаждали центрифугированием (200 g, 5 мин, 4 °C), ресуспендировали в PBS, подсчитывали жизнеспособные клетки в смеси трипанового синего и эозина в камере Горяева и использовали для цитофлуориметрического анализа. Спленциты иммунизированных и контрольных (без предварительной иммунизации) мышей ресуспендировали в полной ростовой среде RPMI 1640 с добавлением  $5 \times 10^{-5}$  М 2-меркаптоэтанола (Merck, Германия) и использовали для тестов *in vitro*. Аналогичным образом готовили суспензии клеток иммунизированных и неиммунизированных мышей без введения ксеногенной опухоли, которые использовали в качестве дополнительного контроля.

**Смешанная культура лимфоцитов.** Спленциты ( $6 \times 10^5$ ) mel-иммунизированных и неиммунизированных мышей (респондеры) высеивали в триплетах в 96-луночные плоскодонные плашки (Corning Costar, Sigma Aldrich, США) в 100 мкл полной ростовой среды. В качестве стимуляторов использовали клетки меланомы линии Mtr или П, обработанные митомицином С (MitC, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Япония) (50 мкг/мл, 37 °C, 1 ч), с последующей трехкратной промывкой RPMI 1640 путем центрифугирования (200 g, 5 мин, 4 °C). Стимуляторы ( $3 \times 10^4$ ) вносили в культуру в 100 мкл полной ростовой среды до конечного объема 200 мкл/лунка. Для оценки фоновой пролиферации респондеры ( $5 \times 10^5$ ) культивировали в присутствии  $3 \times 10^5$  сингенных спленцитов мышей C57BL/6, обработанных MitC, как указано выше. Клетки инкубировали при 37 °C в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> и абсолютной влажности в течение 72 ч. Уровень пролиферации клеток измеряли по включению <sup>3</sup>H-тимидина (1 мкКи/лунка) («Изотоп», Россия), который вносили за 16–18 ч до окончания культивирования. Уровень пролиферативной активности клеток выражали в количестве импульсов в минуту (cpm).

**Антитела.** В работе использовали моноклональные антитела: анти-CD3 – PerCP-Cy5.5 (клон 17A2; BioLegend, США), анти-CD8a – AlexaFluor 488 (клон 53–6.7; BD Bioscience, США), анти-CD4 – Pacific Blue (клон RM4-5; BD Bioscience, США), анти-CD44 – APC (клон IM7; BD Bioscience, США), анти-CD62L – APC-Cy7 (клон MEL-14; BD Bioscience, США), анти-CD19 – FITC (клон 6D5; BioLegend, США), анти-CD11b – PE-Cy7 (M1/70; BD Bioscience, США), анти-Gr-1 (Ly-6G) – APC (клон RB6-8C5; BioLegend, США).

**Цитофлуориметрический анализ.** Пробы клеток ( $5 \times 10^6$ ) инкубировали с блокирующими антителами Fc block (клон 2.4G2; BD Bioscience, США) (10 мин, 4 °C)

и окрашивали флуоресцентно мечеными антителами (40 мин, 4 °C). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Bioscience, США) в программе FACSDiva 6.0 (BD Bioscience, США). Лейкоциты выделяли по показателям прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния с последующим выделением одиночных клеток по показателям FSC-H против FSC-A. Для окрашивания мертвых клеток использовали набор LIVE/DEAD Fixable Yellow Dead Cell Stain (Invitrogen, США). Мертвые клетки исключали из анализа по окрашиванию Yellow Dead Cell Stain и показателям светорассеяния. Оценку экспрессии поверхностных маркеров проводили в популяции живых одиночных лейкоцитов. При характеристике Т-клеток выделяли несколько функциональных подгрупп на основе экспрессии маркеров CD62L и CD44, которые определяют активационный статус и особенности миграции Т-клетки (табл. 2). Посредством CD62L Т-лимфоцит взаимодействует с клетками венул с высоким эндотелием, что обеспечивает его миграцию в лимфоидной системе. CD44<sup>+</sup>-Т-лимфоциты могут покидать лимфоидную систему и мигрировать в периферические ткани. Были проанализированы не менее  $1 \times 10^5$  событий в популяции CD3<sup>+</sup>- или CD3<sup>-</sup>-лимфоцитов. Обработку данных проводили в программе Flow Jo 7.6 (TreeStar Inc., США).

**Таблица 2.** Фенотипические характеристики различных функциональных подгрупп Т-клеток

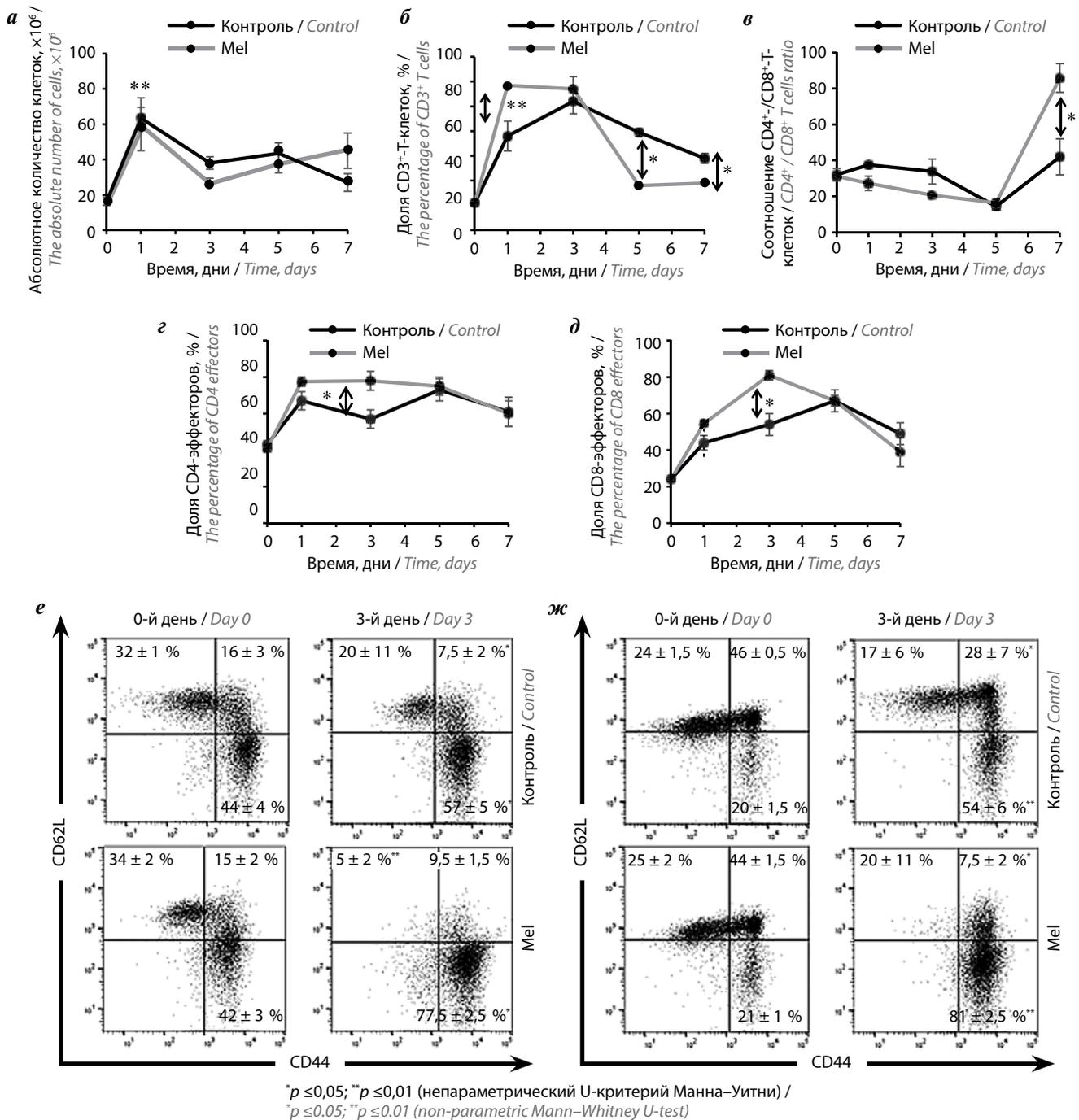
Table 2. Phenotypic characteristics of different functional T cell subsets

Функциональная подгруппа Functional subset	Фенотипическая характеристика Phenotypic characteristics
Наивные клетки Naive cells	CD62L <sup>+</sup> CD44 <sup>-</sup>
Центральные клетки памяти Central memory cells	CD62L <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup>
Эффекторы Effectors	CD62L <sup>-</sup> CD44 <sup>+</sup>

**Статистический анализ.** Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $m \pm SEM$ ). Статистический анализ проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

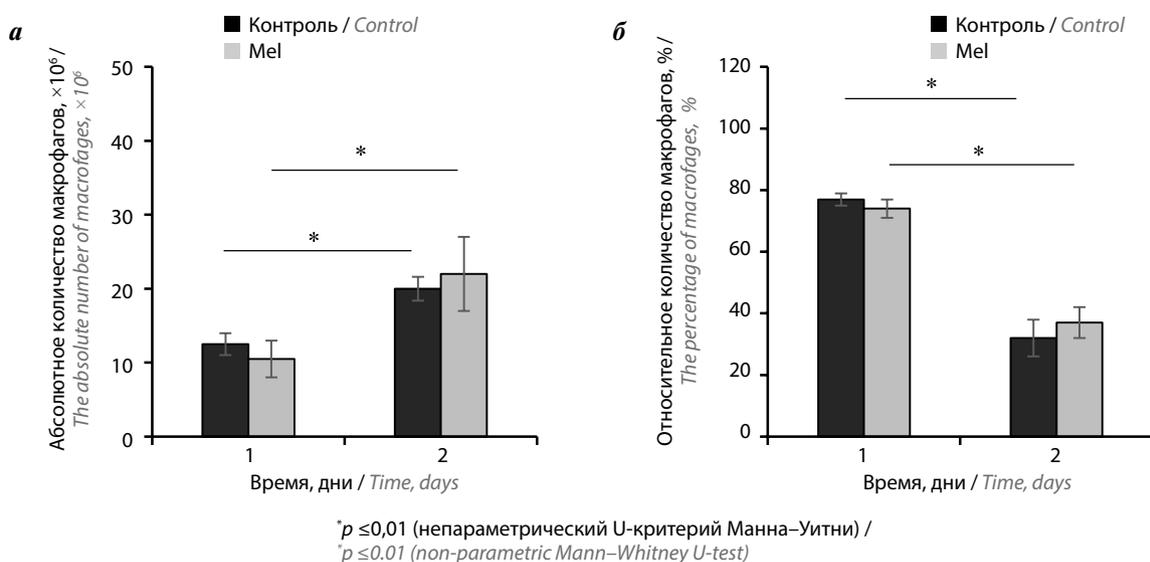
## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Анализ динамики развития вторичного ксеногенного иммунного ответа *in vivo* в месте локализации ксеногенной опухоли.** Для изучения динамики развития вторичного ксеногенного иммунного ответа мышам, предварительно иммунизированным клетками меланомы человека Mtr, повторно трансплантировали клетки иммунизирующей опухоли. Мышей без предварительной иммунизации, которым аналогично трансплантировали



**Рис. 1.** Анализ динамики локального Т-клеточного ответа после вторичной трансплантации ксеногенной опухоли: а – абсолютное количество клеток ( $\times 10^6$ ); б – относительное количество  $CD3^+$ -лимфоцитов (%); в – соотношение  $CD4^+$ -/ $CD8^+$ -Т-лимфоцитов; г – доля эффекторов ( $CD62L^-CD44^+$ ) в популяции  $CD4^+$ -Т-клеток (%); д – доля эффекторов ( $CD62L^-CD44^+$ ) в популяции  $CD8^+$ -Т-клеток (%); е, ж – анализ лимфоцитов с фенотипом наивных клеток ( $CD62L^+CD44^-$ ), центральных клеток памяти ( $CD62L^+CD44^+$ ) и эффекторов ( $CD62L^-CD44^+$ ) в популяции  $CD4^+$ - (е) и  $CD8^+$ -Т-клеток (ж) на 3-й день после иммунизации. Мышей C57BL/6 иммунизировали внутрибрюшинно клетками меланомы человека Mtp (mel). Через 45 дней животным повторно внутрибрюшинно вводили меланому Mtp. Аналогичным образом трансплантировали клетки меланомы человека intactным мышам C57BL/6 (контроль). На указанные сроки после иммунизации извлекали лаваж брюшной полости и анализировали клетки методом проточной цитофлуориметрии. Данные получены в 3 независимых экспериментах и представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 3-4$ )

**Fig. 1.** Analysis of the dynamics of the local T-cell response after secondary transplantation of a xenogeneic tumor: а – absolute number of cells ( $\times 10^6$ ); б – relative number of  $CD3^+$  lymphocytes (%); в – ratio of  $CD4^+$ -/ $CD8^+$  T-lymphocytes; г – percentage of effectors ( $CD62L^-CD44^+$ ) in the population of  $CD4^+$  T-cells; д – percentage of effectors ( $CD62L^-CD44^+$ ) in the population of  $CD8^+$  T cells; е, ж – analysis of lymphocytes with the phenotype of naive cells ( $CD62L^+CD44^-$ ), central memory cells ( $CD62L^+CD44^+$ ) and effectors ( $CD62L^-CD44^+$ ) in a population of  $CD4^+$  (е) and  $CD8^+$  T cells (ж) on the 3<sup>rd</sup> day after immunization. C57BL/6 mice were immunized intraperitoneally (i. p.) with Mtp (mel) human melanoma cells. After 45 days, the animals were re-introduced i. p. with Mtp melanoma. Similarly, human melanoma cells were transplanted into intact C57BL/6 mice (control). Lavage was removed for the indicated periods after immunization and the cells were analyzed by flow cytometry. The data were obtained in three independent experiments and are presented as mean  $\pm$  standard error of mean ( $n = 3-4$ )



**Рис. 2.** Анализ локального накопления макрофагов после трансплантации ксеногенной опухоли: а — абсолютное количество макрофагов ( $\times 10^6$ ); б — относительное количество  $CD3^+Gr1^-CD11b^+$  (%). Мышей C57BL/6 иммунизировали внутрибрюшинно клетками меланомы человека Mtr (mel). Через 45 дней животным повторно внутрибрюшинно вводили меланому Mtr. Аналогичным образом трансплантировали клетки меланомы человека интактным мышам C57BL/6 (контроль). Через 24 ч после иммунизации извлекали лаваж брюшной полости и анализировали клетки методом проточной цитофлуориметрии. Данные получены в 3 независимых экспериментах и представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 3$ )

**Fig. 2.** Analysis of local accumulation of macrophages after transplantation of a xenogeneic tumor: a — absolute number of macrophages ( $\times 10^6$ ); б — percentage of  $CD3^+Gr1^-CD11b^+$ . C57BL/6 mice were immunized intraperitoneally (i. p.) with Mtr (mel) human melanoma cells. After 45 days, the animals were re-introduced i. p. with Mtr melanoma. Similarly, human melanoma cells were transplanted into intact C57BL/6 mice (control). Lavage was removed 24 hours after immunization and cells were analyzed by flow cytometry. Data were obtained from three independent experiments and are presented as mean  $\pm$  standard error of mean ( $n = 3$ )

ксеногенную опухоль, использовали в качестве контроля. Через 1–7 дней после трансплантации оценивали динамику изменения субпопуляционного состава иммунных эффекторов в месте локализации ксеногенной меланомы (в брюшной полости) (рис. 1).

Уже через 24 ч после введения ксеногенной меланомы в обеих экспериментальных группах наблюдалось резкое увеличение клеточности лаваж — в 3,5 раза по сравнению с группами без ксенотрансплантата (0-й день) ( $p \leq 0,01$ ; см. рис. 1, а), что сопровождалось увеличением доли  $CD3^+T$ -лимфоцитов (см. рис. 1, б). Кроме того, через 1 сут после ксеногенной иммунизации (как первичной, так и вторичной) в брюшной полости животных в 2 раза возросло абсолютное количество макрофагов по сравнению со значениями в группах без введения опухоли Mtr (0-й день) (рис. 2, а). Однако относительное количество макрофагов (клеток с фенотипом  $CD3^-Gr1^-CD11b^+$  [27]) в брюшной полости контрольных и иммунизированных мышей через 24 ч после введения ксеногенной опухоли снизилось в 2 раза по сравнению с контрольными значениями (0-й день) (рис. 2, б), что может быть обусловлено интенсивной инфильтрацией Т-лимфоцитов (см. рис. 1, а). Таким образом, через сутки после трансплантации клеток ксеногенной меланомы Mtr эффекторами как первичного, так и вторичного иммунного ответа на ксеноантигены являются преимущественно Т-лимфоциты и макрофаги. На всех сроках анализа абсолютное количество клеток в брюшной полости

иммунизированных и контрольных мышей было сопоставимо (см. рис. 1, а).

Через 24 ч после трансплантации ксеногенной меланомы относительное количество  $CD3^+$ -лимфоцитов в брюшной полости иммунизированных мышей было в 1,5 раза выше по сравнению с контролем ( $p \leq 0,01$ ; см. рис. 1, б). К 5-му дню доля  $CD3^+T$ -лимфоцитов у иммунизированных животных резко уменьшилась и стала в 2 раза ниже значения в контрольной группе:  $18 \pm 1,0$  и  $39,5 \pm 1,5$  % соответственно ( $p \leq 0,05$ ) (см. рис. 1, б). На 7-й день после ксеногенной трансплантации относительное количество  $CD3^+$ -лимфоцитов в брюшной полости иммунизированных мышей было в 1,5 раза ниже ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой первичной ксеногенной иммунизации (см. рис. 1, б).

Для более детальной характеристики  $CD3^+$ -лимфоцитов, вовлеченных в первичный и вторичный ксеногенный ответ, далее оценивали соотношение  $CD4^+/CD8^+T$ -лимфоцитов (см. рис. 1б) и долю эффекторов ( $CD62L-CD44^+$ ) в популяции  $CD4^+$ - и  $CD8^+T$ -клеток на различных сроках после трансплантации ксеногенной опухоли (см. рис. 1, г, д). Через 1 и 3 дня после первичной иммунизации соотношение  $CD4^+/CD8^+T$ -лимфоцитов в брюшной полости экспериментальных животных составило приблизительно 2:1 (см. рис. 1, е). В совокупности с увеличением доли  $CD3^+$ -клеток в лаваже на данных сроках это указывает на преимущественное вовлечение  $CD4^+T$ -лимфоцитов в первичный ксеногенный иммунный ответ,

что соответствует результатам ранее опубликованных работ [1–3].

В динамике вторичного иммунного ответа на ксеноантигены в течение первых дней после трансплантации меланомы человека наблюдалась тенденция к снижению соотношения  $CD4^+/CD8^+$ -Т-лимфоцитов в брюшной полости иммунизированных мышей, которое через 24 ч после реиммунизации составило 1,4 : 1,0 (см. рис. 1, в). На пике эффекторной фазы вторичного ксеногенного иммунного ответа (3-й день после введения опухоли) соотношение этих клеток оказалось равным приблизительно 1:1 (см. рис. 1, в). При этом доля эффекторов  $CD4^+$ - и  $CD8^+$ -Т-лимфоцитов была одинаковой и составила 80 % (см. рис. 1, з, д). Это указывает на равный вклад этих клеток в развитие вторичного иммунного ответа на ксеноантигены у иммунизированных мышей. Однако к 7-му дню после введения ксеногенной опухоли соотношение  $CD4^+/CD8^+$ -Т-клеток в группе иммунизированных животных резко увеличилось, в 2 раза превысив этот показатель в контрольной группе ( $p \leq 0,05$ ; см. рис. 1, в). Относительное количество  $CD4^+$  у иммунизированных мышей возросло до  $73 \pm 3$  % по сравнению с  $63 \pm 6$  % в контрольной группе (см. рис. 1, в). Доля  $CD8^+$  в группах иммунизированных и контрольных животных составила  $17 \pm 1,8$  и  $31 \pm 5$  % соответственно (см. рис. 1, в). Это указывает на более быструю контракцию иммунного ответа  $CD8^+$ -Т-клеток при вторичной ксеногенной стимуляции.

Через 24 ч после введения клеток меланомы человека Mtr в брюшной полости животных обеих экспериментальных групп не было выявлено достоверных различий в относительном количестве эффекторов  $CD4^+$  (см. рис. 1, з). К 3-му дню доля эффекторов  $CD4^+$  у иммунизированных мышей была в 1,3 раза выше ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с контрольными животными (см. рис. 1, з, е). В дальнейшем наблюдалось снижение относительного количества эффекторов  $CD4^+$  в группе иммунизированных животных, и на 7-й день после трансплантации ксеногенной опухоли их доля не отличалась от значений в группе мышей с первичной иммунизацией (см. рис. 1, з).

Аналогично динамике эффекторов  $CD4^+$  пик ответа эффекторов  $CD8^+$  у иммунизированных мышей наблюдался на 3-й день после вторичной трансплантации ксеногенной опухоли (см. рис. 1, д): доля лимфоцитов  $CD8^+CD62L^-CD44^+$  в брюшной полости иммунизированных животных была в 1,5 раза выше по сравнению с контрольной группой (мышами с первичной ксеногенной иммунизацией) ( $p \leq 0,05$ ; см. рис. 1, д, ж). К 7-му дню доля эффекторов  $CD8^+$  у реиммунизированных животных была сопоставима с контролем (см. рис. 1, д). Стоит отметить, что при развитии первичного иммунного ответа формирование пула эффекторов  $CD4^+$  и  $CD8^+$  происходило одновременно с сокращением доли Т-лимфоцитов с фенотипом наивных клеток и центральных клеток памяти (см. рис. 1, е, ж).

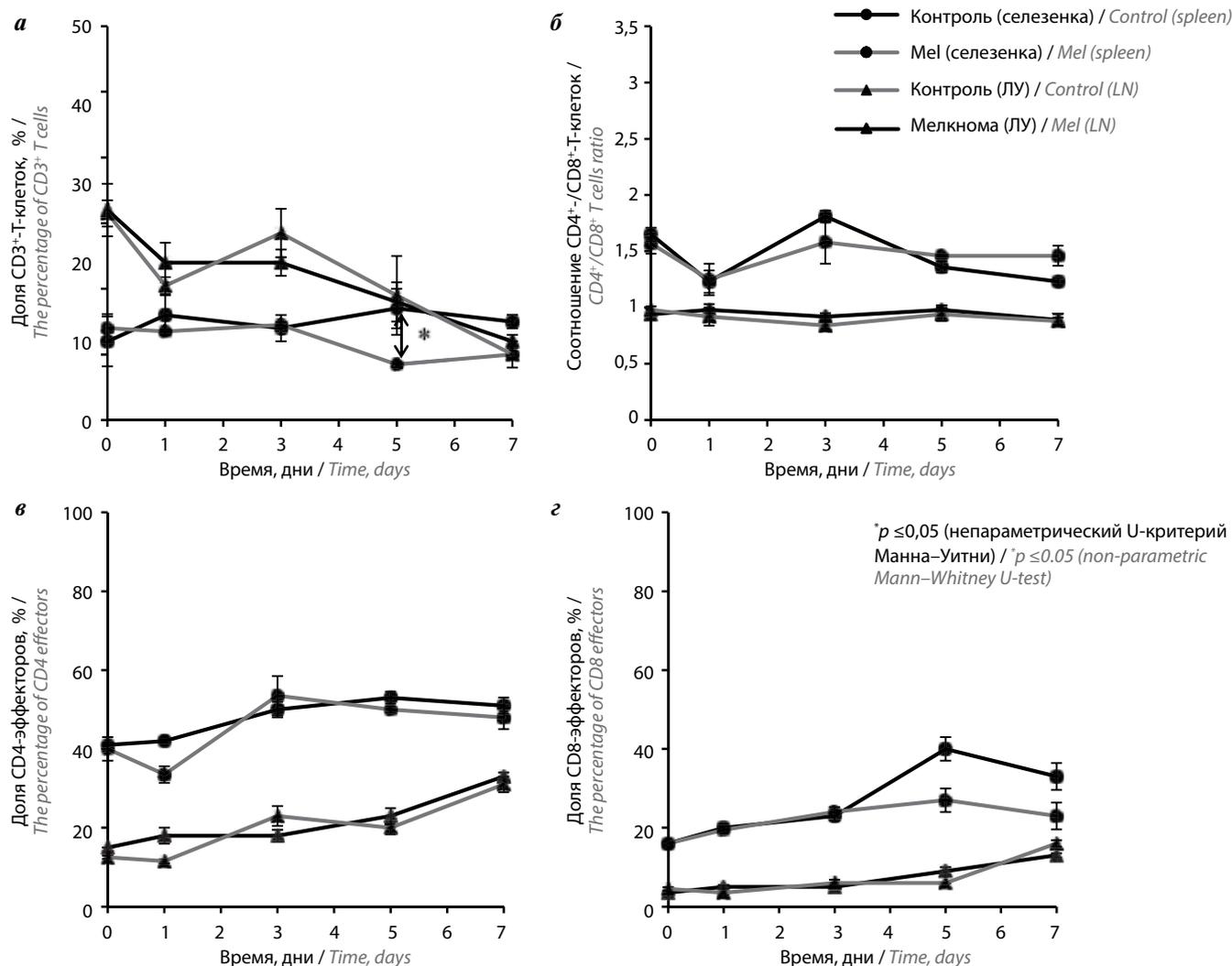
Во вторичном иммунном ответе интенсивное накопление эффекторов в брюшной полости иммунизированных мышей сопровождалось снижением доли только наивных Т-клеток (см. рис. 1, е, ж).

**Анализ вовлечения вторичных иммунных органов в развитие иммунного ответа на клетки ксеногенной опухоли *in vivo*.** Для изучения роли вторичных иммунных органов в развитии вторичного ксеногенного иммунного ответа мы оценили динамику изменения содержания Т-лимфоцитов в селезенке и ЛУ иммунизированных и неиммунизированных (контрольных) мышей в различные сроки после введения клеток меланомы человека Mtr (рис. 3).

Анализ Т-клеток в селезенке выявил сопоставимые изменения относительного количества  $CD3^+$ -лимфоцитов в обеих экспериментальных группах после введения клеток Mtr (см. рис. 3, а). Только на 5-й день после трансплантации ксеногенной опухоли в селезенке иммунизированных мышей доля  $CD3^+$ -лимфоцитов оказалась в 1,3 раза ниже ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с контролем (см. рис. 3, а). Соотношение  $CD4^+/CD8^+$ -Т-лимфоцитов в селезенке иммунизированных мышей не отличалось от контрольных значений на всех сроках наблюдения после трансплантации ксеногенной меланомы (см. рис. 3, б). Первичный и вторичный ксеногенные иммунные ответы не сопровождалось накоплением эффекторов  $CD4^+$  в селезенке экспериментальных животных (см. рис. 3, в). Между тем при первичной ксеногенной иммунизации к 5-му дню после введения меланомы человека количество эффекторов  $CD8^+$  возросло в 2 раза по сравнению с неиммунизированными мышами без ксенотрансплантации (0-й день) (см. рис. 3, з). При вторичном ксеногенном ответе данный эффект не наблюдали, и относительное количество эффекторов  $CD8^+$  в селезенке иммунизированных мышей было сопоставимо на всех сроках после трансплантации (см. рис. 3, з).

После ксеногенной иммунизации в ЛУ животных наблюдалось плавное снижение относительного количества лимфоцитов  $CD3^+$ , и к 7-му дню доля Т-клеток оказалась ниже в 1,6–1,7 раза ( $p \leq 0,05$ ) в обеих экспериментальных группах по сравнению с контрольными мышами без трансплантации (0-й день) (см. рис. 3, а). Соотношение  $CD4^+/CD8^+$  в ЛУ животных обеих групп было сопоставимо и не менялось на всем сроке наблюдения после иммунизации (см. рис. 3, б). При этом к 7-му дню после трансплантации ксеногенной меланомы в ЛУ как контрольных, так и иммунизированных мышей наблюдалось накопление  $CD4^+$ - и  $CD8^+$ -эффекторов, количество которых было в 2 и 3,5 раза больше соответственно по сравнению с группами без иммунизации ( $p \leq 0,01$ ) (0-й день) (см. рис. 3, в, з).

**Анализ вторичного иммунного ответа на ксеногенную опухоль *in vitro*.** На следующем этапе работы мы оценили уровень пролиферативного ответа лимфоцитов иммунизированных мышей при рестимуляции ксеноантигенами *in vitro* (рис. 4) и охарактеризовали эффекторы,



**Рис. 3.** Анализ динамики изменения Т-лимфоцитов в селезенке и лимфатических узлах мышей после вторичной трансплантации ксеногенной опухоли: а – относительное количество CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов (%); б – соотношение CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов; в – доля эффекторов (CD62L-CD44<sup>+</sup>) в популяции CD4<sup>+</sup>-Т-клеток (%); г – доля эффекторов (CD62L-CD44<sup>+</sup>) в популяции CD8<sup>+</sup>-Т-клеток (%). Мышей C57BL/6 иммунизировали внутрибрюшинно клетками меланомы человека Mtp (mel). Через 45 дней животным повторно внутрибрюшинно вводили клетки Mtp. Аналогичным образом трансплантировали клетки меланомы человека intactным мышам C57BL/6 (контроль). На указанные сроки после иммунизации извлекали селезенку и лимфатические узлы (ЛУ) и анализировали клетки методом проточной цитофлуориметрии. Данные получены в 3 независимых экспериментах и представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 3–4)

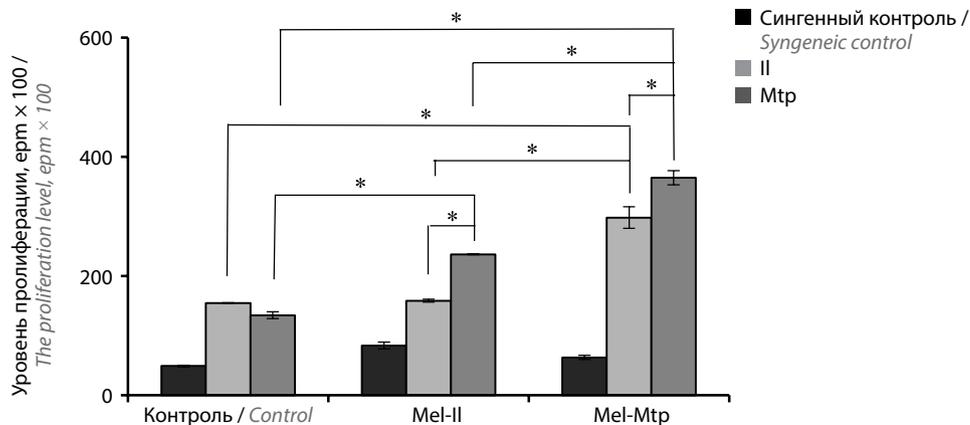
**Fig. 3.** Analysis of the dynamics of changes in T-lymphocytes in the spleen and lymph nodes of mice after secondary transplantation of a xenogeneic tumor: а – percentage of CD3<sup>+</sup>-lymphocytes; б – ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes; в – percentage of effectors (CD62L-CD44<sup>+</sup>) in the population of CD4<sup>+</sup> T cells; г – percentage of effectors (CD62L-CD44<sup>+</sup>) in the population of CD8<sup>+</sup> T cells. C57BL/6 mice were immunized intraperitoneally (i. p.) with Mtp (mel) human melanoma cells. After 45 days, the animals were re-introduced i. p. with Mtp cells. Similarly, human melanoma cells were transplanted into intact C57BL/6 mice (control). For the specified periods after immunization, the spleen and lymph nodes (LN) were removed and the cells were analyzed by flow cytometry. The data were obtained in three independent experiments and are presented as mean ± standard error of mean (n = 3–4)

вовлеченные в ксеногенный иммунный ответ *in vitro* (рис. 5). Для этого использовали спленоциты мышей, предварительно иммунизированных клетками меланомы человека линии П (экспрессирует HLA класса I) или Mtp (экспрессирует HLA классов I и II). Стоит отметить, что обе линии меланомы человека экспрессируют общую молекулу HLA класса I – A26 (10) [23–26]. Для индукции первичного ксеногенного иммунного ответа *in vitro* в качестве респондеров использовали клетки селезенки неиммунизированных животных.

Анализ показал, что при рестимуляции лимфоцитов мышей, иммунизированных меланомой П, клетка-

ми той же опухоли уровень пролиферации был сопоставим с уровнем ответа контрольных спленоцитов неиммунизированных мышей на ксеноантигены данной опухоли (см. рис. 4). Между тем при стимуляции спленоцитов иммунизированных мышей клетками посторонней меланомы Mtp наблюдался пролиферативный ответ, который достоверно превышал уровень ответа клеток контрольных мышей, но был ниже уровня ответа животных, иммунизированных Mtp, на ксеноантигены данной меланомы (см. рис. 4).

Спленоциты мышей, иммунизированных меланомой Mtp, отвечали усиленной пролиферацией



**Рис. 4.** Уровень пролиферативного ответа на клетки ксеногенной меланомы *in vitro*. Мышей C57BL/6 иммунизировали внутрибрюшинно клетками меланомы человека Mtp или II (*mel-Mtp* и *mel-II* соответственно). Через 45 дней извлекали спленоциты иммунизированных мышей и культивировали в присутствии клеток меланомы Mtp или II, обработанных митомицином C. В качестве контроля использовали спленоциты интактных (неиммунизированных) мышей C57BL/6. Для оценки фоновой пролиферации спленоциты мышей культивировали в присутствии сингенных клеток селезенки. Клетки культивировали *in vitro* в течение 72 ч. Пролиферативную активность спленоцитов оценивали по включению  $^3\text{H}$ -тимидина, внесенного в культуру за последние 16–18 ч. Данные получены в 3 независимых экспериментах ( $n = 3$ ). Результаты одного репрезентативного эксперимента представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего

**Fig. 4.** Proliferative response to xenogeneic melanoma cells *in vitro*. C57BL/6 mice were immunized intraperitoneally with Mtp or II human melanoma cells (*mel-Mtp* and *mel-II*). After 45 days, splenocytes from immunized mice were harvested and cultured in the presence of mitomycin C-treated Mtp or II melanoma cells. Splenocytes from intact (non-immunized) C57BL/6 mice were used as controls. To assess background proliferation, mouse splenocytes were cultured in the presence of syngeneic spleen cells. The cells were cultured *in vitro* for 72 hours. The proliferation of splenocytes was assessed by the incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine introduced into the culture over the last 16–18 hours. The data were obtained in three independent experiments ( $n = 3$ ). Data from one representative experiment are presented as mean  $\pm$  standard error of mean

при стимуляции *in vitro* клетками обеих линий меланомы. При этом уровень ответа животных, иммунизированных клетками меланомы Mtp, превышал соответствующие значения в контрольной группе и группе мышей, иммунизированных меланомой II (см. рис. 4). Как и ожидалось, полученные данные указывают на большую иммуногенность ксеногенной меланомы Mtp, экспрессирующей молекулы обоих классов HLA.

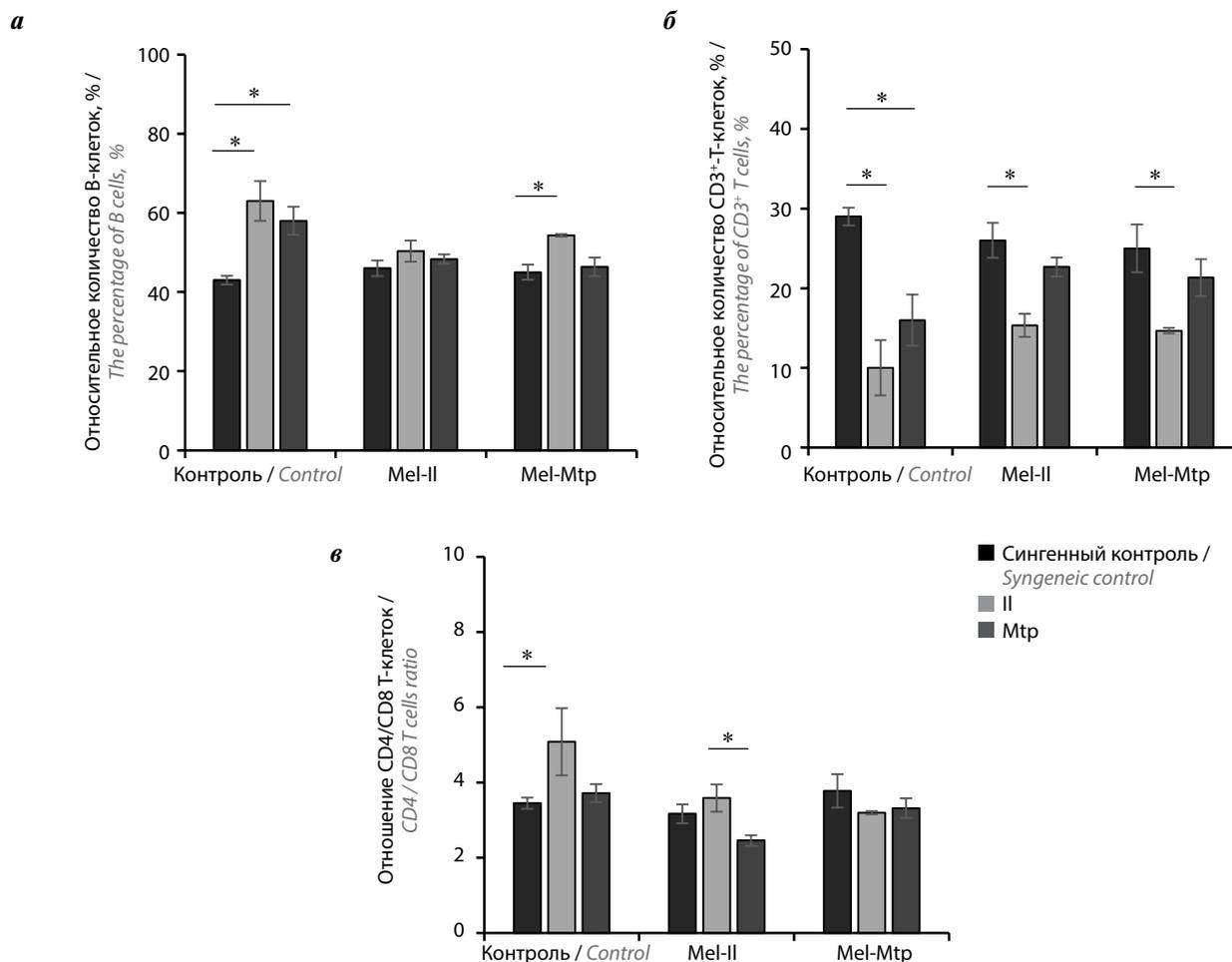
Для выявления эффекторов, вовлеченных в ксеногенный ответ *in vitro*, затем были проанализированы относительное количество В-клеток ( $\text{CD}19^+$ ) (рис. 5, а), Т-клеток ( $\text{CD}3^+$ ) (рис. 5, б) и соотношение  $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ -Т-клеток (рис. 5, в) в культуре спленоцитов иммунизированных и неиммунизированных мышей через 72 ч после стимуляции *in vitro* клетками меланомы Mtp или II.

Первичная стимуляция *in vitro* спленоцитов неиммунизированных мышей ксеноантигенами меланомы II или Mtp сопровождалась увеличением доли В-лимфоцитов в культуре (в 1,3 и 1,5 раза соответственно) (см. рис. 5, а) и снижением доли  $\text{CD}3^+$ -Т-лимфоцитов (в 1,8 и 2,9 раза соответственно) (см. рис. 5, б). Стоит отметить, что изменение доли В- и Т-клеток не было пропорциональным, что может указывать на вовлечение в пролиферативный ответ *in vitro* эффекторов врожденного иммунитета [28, 29]. Анализ соотношения  $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ -Т-клеток показал увеличение доли  $\text{CD}4^+$ -Т-клеток в культуре лимфоцитов неиммунизированных мышей, стимулированных ксеноантигенами меланомы Mtp (см. рис. 5, в), что согласуется с результатами экспериментов *in vivo* (см. рис. 1, в). Первичный ответ

*in vitro* на клетки меланомы II не сопровождался изменением соотношения  $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ -Т-лимфоцитов в культуре спленоцитов (см. рис. 5, в).

Рестимуляция *in vitro* спленоцитов мышей, иммунизированных II, клетками той же меланомы II не вызвала изменения относительного количества В- и Т-клеток по сравнению с соответствующими значениями в культуре этих клеток без ксеногенной стимуляции (см. рис. 5, а, б). Однако при этом значительно снизилось соотношение  $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ -Т-клеток (см. рис. 5, в), что указывает на преимущественную реактивацию  $\text{CD}8^+$ -Т-лимфоцитов мышей, иммунизированных II, в ответ на антигены иммунизирующей опухоли. Культивирование спленоцитов таких животных в присутствии клеток меланомы Mtp привело к значительному (в 1,7 раза;  $p < 0,05$ ) снижению доли  $\text{CD}3^+$ -клеток (рис. 5, б) без изменения соотношения  $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ -Т-клеток (см. рис. 5, в). При этом доля В-лимфоцитов в культуре спленоцитов мышей, иммунизированных II и рестимулированных клетками меланомы Mtp, не отличалась от этого показателя в культуре без ксеногенной стимуляции (см. рис. 5, а). Это может указывать на пролиферацию НК-клеток *in vitro* при стимуляции клетками меланомы Mtp.

При рестимуляции *in vitro* спленоцитов мышей, иммунизированных Mtp, клетками иммунизирующей опухоли наблюдались достоверное увеличение доли В-лимфоцитов (в 1,2 раза;  $p < 0,05$ ) (см. рис. 5, а) и снижение относительного количества Т-лимфоцитов (в 1,8 раза;  $p < 0,05$ ) (см. рис. 5, б) по сравнению с культурой спленоцитов этих животных без ксеногенной



**Рис. 5.** Анализ эффекторов, вовлеченных во вторичный иммунный ответ на клетки ксеногенной меланомы *in vitro*: а – относительное количество лимфоцитов  $CD19^+$  (В-клетки) (%); б – относительное количество лимфоцитов  $CD3^+$  (Т-клетки) (%); в – соотношение  $CD4^+$  и  $CD8^+$ -Т-клеток в популяции  $CD3^+$ -лимфоцитов. Мышей C57BL/6 иммунизировали внутрибрюшинно клетками меланомы человека Mtp или II (mel-Mtp и mel-II соответственно). Через 45 дней извлекали спленоциты иммунизированных мышей и культивировали в течение 72 ч в присутствии клеток меланомы Mtp или II, обработанных митомицином С. Аналогичным образом культивировали клетки интактных (неиммунизированных) мышей C57BL/6 (контроль). Данные получены в 3 независимых экспериментах и представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 3$ )

**Fig. 5.** Analysis of effectors involved in the secondary immune response to xenogeneic melanoma cells *in vitro*: а – percentage of  $CD19^+$  lymphocytes (B-cells); б – percentage of  $CD3^+$  lymphocytes (T-cells); в – ratio of  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T-cells in the population of  $CD3^+$ -lymphocytes. C57BL/6 mice were immunized *i. p.* with Mtp or II human melanoma cells (mel-Mtp and mel-II). After 45 days, splenocytes from immunized mice were recovered and cultured for 72 h in the presence of Mtp or II melanoma cells treated with mitomycin C. Cells of intact (non-immunized) C57BL/6 mice (contr) were cultured in a similar manner. Data were obtained from three independent experiments and are presented as mean  $\pm$  standard error of mean ( $n = 3$ )

стимуляции *in vitro*. Культивирование клеток мышей, иммунизированных Mtp, в присутствии клеток меланомы II не сопровождалось изменением соотношения В- и Т-лимфоцитов (см. рис. 5, а, б). Соотношение  $CD4^+$ / $CD8^+$ -Т-клеток мышей, иммунизированных меланомой Mtp, не изменялось при обоих типах ксеногенной стимуляции (см. рис. 5, в).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в АКТ в онкологии используются Т-клетки, модифицированные ТКР или химерным антигенным рецептором (chimeric antigen receptor, CAR), специфичным к антигенам опухоли [16, 30]. CAR-Т-клетки могут распознавать только опухолеассоциированные антигены, поэтому их при-

менение в клинической практике ограничено. Напротив, ТКР-Т-лимфоциты могут распознавать как опухолеассоциированные антигены, так и неоантигены в комплексе с HLA пациента. Это делает АКТ с использованием ТКР-модифицированных Т-клеток более универсальной и дает возможность ее применения при разных типах опухолей.

С учетом сложности идентификации антиген-специфических ТКР в репертуаре Т-лимфоцитов пациента [19, 31, 32] и трудоемкости отбора потенциально терапевтических вариантов рецепторов АКТ актуальной представляется разработка экспериментальных подходов для генерации опухолеспецифических Т-лимфоцитов. Одной из таких стратегий может быть ксеногенная иммунизация модельных животных

клетками опухоли человека. Репертуар ТКР стимулированных таким образом Т-лимфоцитов животного можно потенциально использовать для поиска рецепторов, пригодных для АКТ опухолей человека.

В ряде ранее опубликованных исследований было подтверждено формирование специфической иммунологической памяти на ксеноантигены в ходе отторжения первичного ксенотрансплантата [8, 12, 15, 33]. Чтобы оценить возможность идентификации ксеногенных ТКР, специфичных к антигенам опухоли человека, в настоящей работе мы изучили вторичный Т-клеточный ответ мышей, иммунизированных ксеноантигенами меланомы человека *in vivo*.

Наше исследование показало, что уже через 24 ч после повторного введения ксеногенной опухоли у иммунизированных мышей наблюдалось локальное интенсивное накопление Т-лимфоцитов. При этом в первичном ксеногенном ответе *in vivo* пик накопления Т-клеток по месту локализации меланомы человека наблюдался только к 3-му дню после введения ксеногенной опухоли животным (см. рис. 1, а). Локально вторичный ответ характеризовался более быстрым развитием эффекторной фазы, пик которой отмечали на 3-й день после вторичной трансплантации в отличие от 5-го дня для первичного ксеногенного иммунного ответа (см. рис. 1, з, д). Таким образом, у сенсibilизированных животных наблюдалось более быстрое развитие иммунного ответа на ксеноантигены. Это четко коррелировало с более сильным пролиферативным ответом *in vitro* лимфоцитов предварительно иммунизированных мышей на ксеноантигены иммунизирующей опухоли (см. рис. 4). Полученные данные свидетельствуют о вовлечении Т-клеток памяти в процессы распознавания и элиминации ксеноантигенов при вторичной трансплантации.

Анализ ксеногенного ответа *in vitro* показал, что в первичный и вторичный пролиферативные ответы вовлечены преимущественно В-лимфоциты (см. рис. 5, а). Наши данные *in vitro* согласуются с рядом работ, показавших большую роль В-клеток в развитии первичного отторжения ксенотрансплантата [6, 9, 34]. Кроме того, у сенсibilизированных реципиентов выявлено формирование донор-специфичных В-клеток памяти, которые вносили значительный вклад в отторжение вторичного трансплантата [35, 36].

При первичной стимуляции *in vitro* клетками ксеногенной опухоли, экспрессирующей молекулы HLA классов I и II (линия Mtp), наблюдалось увеличение доли CD4<sup>+</sup>-Т-клеток в культуре спленоцитов (см. рис. 5, в), что четко коррелировало с эффектами *in vivo* (см. рис. 1в). Полученные результаты подтверждают ранее опубликованные данные о доминирующей роли CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов в развитии первичного ксеногенного иммунного ответа [1, 2, 37, 38]. Стоит отметить, что активация CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов в ответ на ксеноантигены происходит преимущественно по непрямому пути распознавания [20, 39–41]. Между тем специфи-

ческая рестимуляция клеток памяти, сформированных в ходе первичного ответа *in vivo* на ксеноантигены HLA классов I и II (стимуляция спленоцитов Mtp-иммунизированных мышей клетками меланомы Mtp *in vitro*), не сопровождалась изменением соотношения CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов в культуре *in vitro* (см. рис. 5, в). Это может указывать на равное вовлечение CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-клеток памяти во вторичный ксеногенный иммунный ответ, что также коррелирует с ответом *in vivo* (см. рис. 1, в).

Однако, если ксеногенные клетки экспрессируют только молекулы HLA класса I (меланома линии II), во вторичный специфический ксеногенный иммунный ответ (стимуляция спленоцитов II-иммунизированных мышей клетками II *in vitro*) вовлекаются преимущественно CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоциты (см. рис. 5, в). Это указывает на формирование CD8<sup>+</sup>-Т-клеток памяти при развитии первичного ответа *in vivo* на ксенографт, экспрессирующий только HLA класса I. Именно CD8<sup>+</sup>-клетки памяти, способные к прямому распознаванию молекул HLA класса I на поверхности клеток II, пролиферируют в культуре *in vitro* при рестимуляции клетками данной меланомы. Наши данные не противоречат представлениям о реализации прямого и непрямого путей распознавания ксеноантигенов Т-лимфоцитами [2, 21, 22, 40, 42]. Более того, было показано, что последовательное блокирование прямого, а затем непрямого распознавания ксеноантигенов обеспечивает полное приживание ксенографта даже при отсутствии иной иммуносупрессивной терапии [41]. Это указывает на доминирование механизмов прямого распознавания на ранних этапах развития ксеногенного иммунного ответа. Результаты настоящего исследования также согласуются с ранее полученными данными, согласно которым в отсутствие главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) класса II и/или CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов отторжение ксенотрансплантата опосредуется цитотоксическими CD8<sup>+</sup>-Т-клетками [10, 43]. Наблюдавшаяся низкая интенсивность пролиферации *in vitro* лимфоцитов мышей, иммунизированных клетками меланомы II, в ответ на клетки той же меланомы (см. рис. 4) может указывать на формирование небольшого пула CD8<sup>+</sup>-клеток памяти в ответ на клетки ксеногенной меланомы [9].

Согласно полученным нами данным, в ходе первичного иммунного ответа на ксеноантигены *in vivo* могут формироваться как CD4<sup>+</sup>-, так и CD8<sup>+</sup>-Т-клетки памяти, которые опосредуют развитие более быстрого и интенсивного ответа при вторичной ксенотрансплантации. С учетом общего вклада CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-клеток памяти в развитие вторичного ксеногенного иммунного ответа разработка терапевтических подходов, направленных на комбинированное подавление их функций, в перспективе может улучшить показатели приживания ксенотрансплантатов, что имеет первостепенное значение для клинической трансплантологии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы показали, что ксеногенные иммунизации можно использовать для генерации пула Т-лимфоцитов, специфичных к антигенам человека. Между тем ксеногенный ответ, вероятно, индуцируется преимущественно на чужеродные молекулы HLA как наиболее сильный иммуноген. В связи с этим для идентификации ксеногенных ТКР, пригодных для АКТ опухолей человека, нужно разработать эффективные методы для строгого отбора рецепторов, обладающих специфичностью именно к опухолевым антигенам, а не к молекулам HLA. В перспективе необходимы тщательные исследования, которые позволят подтвердить возможность использования ксеногенных ТКР с охарактеризованной антигенной специфичностью для получения безопасных экспериментальных Т-клеточных продуктов для АКТ онкологических заболеваний.

тивные методы для строгого отбора рецепторов, обладающих специфичностью именно к опухолевым антигенам, а не к молекулам HLA. В перспективе необходимы тщательные исследования, которые позволят подтвердить возможность использования ксеногенных ТКР с охарактеризованной антигенной специфичностью для получения безопасных экспериментальных Т-клеточных продуктов для АКТ онкологических заболеваний.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Carvalho-Oliveira M., Valdivia E., Blasczyk R. et al. Immunogenetics of xenotransplantation. *Int J Immunogenet* 2021;48(2):120–34. DOI: 10.1111/iji.12526
- Hu M., Hawthorne W.J., Yi S. et al. Cellular immune responses in islet xenograft rejection. *Front Immunol* 2022;13:893985. DOI: 10.3389/fimmu.2022.893985
- Yi S., Feng X., Hawthorne W.J. et al. CD4<sup>+</sup> T cells initiate pancreatic islet xenograft rejection via an interferon-gamma-dependent recruitment of macrophages and natural killer cells. *Transplantation* 2002;73(3):437–46. DOI: 10.1097/00007890-200202150-00019
- Davila E., Byrne G.W., LaBrecche P.T. et al. T-cell responses during pig-to-primate xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2006;13(1):31–40. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2005.00258.x
- Chung H., Kim H.J., Kim J.S. et al. CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-cell ratio correlates with the graft fate in pig-to-non-human primate islet xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2020;27(2):e12562. DOI: 10.1111/xen.12562
- Lee F.T., Dangi A., Shah S. et al. Rejection of xenogeneic porcine islets in humanized mice is characterized by graft-infiltrating Th17 cells and activated B cells. *Am J Transplant* 2020;20(6):1538–50. DOI: 10.1111/ajt.15763
- Bucher P., Gang M., Morel P. et al. Transplantation of discordant xenogeneic islets using repeated therapy with anti-CD154. *Transplantation* 2005;79(11):1545–52. DOI: 10.1097/01.tp.0000163505.63159.69
- Wang F., Xia J., Chen J. et al. Combination of antibodies inhibits accelerated rejection mediated by memory T cells in xenoantigen-primed mice. *Xenotransplantation*. 2010;17(6):460–8. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2010.00618.x
- Wang S., Tasch J., Kheradmand T. et al. Transient B-cell depletion combined with apoptotic donor splenocytes induces xeno-specific T- and B-cell tolerance to islet xenografts. *Diabetes* 2013;62(9):3143–50. DOI: 10.2337/db12-1678
- Yi S., Feng X., Hawthorne W. et al. CD8<sup>+</sup> T cells are capable of rejecting pancreatic islet xenografts. *Transplantation* 2000;70(6):896–906. DOI: 10.1097/00007890-200009270-00007
- Uchida T., Tomita Y., Anzai K. et al. Roles of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in discordant skin xenograft rejection. *Transplantation* 1999;68(11):1721–7. DOI: 10.1097/00007890-199912150-00016
- Lin Y., Soares M.P., Sato K. et al. Rejection of cardiac xenografts by CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 1999;162(2):1206–14.
- Yin D.P., Ma L.L., Sankary H.N. et al. Role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the rejection of concordant pancreas xenografts. *Transplantation* 2002;74(9):1236–41. DOI: 10.1097/00007890-200211150-00007
- Tanemura M., Chong A.S., DiSesa V.J. et al. Direct killing of xenograft cells by CD8<sup>+</sup> T cells of discordant xenograft recipients. *Transplantation* 2002;74(11):1587–95. DOI: 10.1097/00007890-200212150-00017
- Triponez F., Oberholzer J., Morel P. et al. Xenogeneic islet retransplantation in mice triggers an accelerated, species-specific rejection. *Immunology* 2000;101(4):548–54. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2000.00130.x
- Rotolo R., Leuci V., Donini C. et al. CAR-based strategies beyond T lymphocytes: integrative opportunities for cancer adoptive immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2019;20(11):2839. DOI: 10.3390/ijms20112839
- He J., Xiong X., Yang H. et al. Defined tumor antigen-specific T cells potentiate personalized TCR-T cell therapy and prediction of immunotherapy response. *Cell Res* 2022;32(6):530–42. DOI: 10.1038/s41422-022-00627-9
- Hiam-Galvez K.J., Allen B.M., Spitzer M.H. Systemic immunity in cancer. *Nat Rev Cancer* 2021;21(6):345–59. DOI: 10.1038/s41568-021-00347-z
- Pilard C., Ancion M., Delvenne P. et al. Cancer immunotherapy: it's time to better predict patients' response. *Br J Cancer* 2021;125(7):927–38. DOI: 10.1038/s41416-021-01413-x
- Andres A., Toso C., Morel P. et al. Phylogenetic disparity influences the predominance of direct over indirect pathway of antigen presentation in islet xenotransplantation. *Transplant Proc* 2005;37(1):463–5. DOI: 10.1016/j.transproceed.2004.11.074
- Lin C.M., Gill R.G. Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms. *Curr Opin Organ Transplant* 2016;21(1):40–4. DOI: 10.1097/MOT.0000000000000263
- Kim C.H., Oh K., Kim D.E. et al. Both CD45RA<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> human CD4<sup>+</sup> T cells drive direct xenogeneic T-cell responses against porcine aortic endothelial cells. *Xenotransplantation* 2010;17(3):224–32. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2010.00582.x
- Барышников А.Ю., Бурова О.С., Воронина Е.С. и др. Клеточные линии меланомы человека. СПб., 2017. 174 с.
- Baryshnikov A.Yu., Burova O.S., Voronina E.S. et al. Human melanoma cell lines. Petersburg, 2017. 174 p. (In Russ.).
- Оборотова М.В., Бурова О.С., Барышникова М.А. и др. Экспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток на клеточных линиях меланомы человека. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(1):11–4.
- Oborotova M.V., Burova O.S., Baryshnikova M.A. et al. Expression of tumor stem cell markers on human melanoma cell lines. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2015;14(1):11–4. (In Russ.).
- Vartanian A.A., Kosorukov V.S. Melanoma cell lines as a basis for development of a model of vasculogenic mimicry. *Biology Bulletin* 2023;50(3):259–65.
- Misyurin V.A., Misyurin A.V., Lukina A.E. et al. Cancer-testis gene expression profile in human melanoma cell lines. *Bochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* 2014;8(3):240–4.
- Komohara Y., Jinushi M., Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci* 2014;105(1):1–8. DOI: 10.1111/cas.12314
- Lu T.Y., Xu X.L., Du X.G. et al. Advances in innate immunity to overcome immune rejection during xenotransplantation. *Cells* 2022;11(23):3865. DOI: 10.3390/cells11233865

29. Maeda A., Kogata S., Toyama C. et al. The innate cellular immune response in xenotransplantation. *Front Immunol* 2022;13:858604. DOI: 10.3389/fimmu.2022.858604
30. D'Ippolito E., Schober K., Nauwerth M. et al. T cell engineering for adoptive T cell therapy: safety and receptor avidity. *Cancer Immunol Immunother* 2019;68(10):1701–12. DOI: 10.1007/s00262-019-02395-9
31. Goncharov M.M., Bryushkova E.A., Sharaev N.I. et al. Pinpointing the tumor-specific T cells *via* TCR clusters. *Elife* 2022;11:e77274. DOI: 10.7554/eLife.77274
32. Pogorelyy M.V., Minervina A.A., Shugay M. et al. Detecting T cell receptors involved in immune responses from single repertoire snapshots. *PLoS Biol* 2019;17(6):e3000314. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000314
33. Peng Y., Chen J., Shao W. et al. Xenoreactive CD4<sup>+</sup> memory T cells resist inhibition by anti-CD44 mAb and reject islet grafts *via* a Th2-dependent pathway. *Xenotransplantation* 2011;18(4):252–61. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2011.00646.x
34. Kang H.K., Wang S., Dangi A. et al. Differential role of B cells and IL-17 *versus* IFN- $\gamma$  during early and late rejection of pig islet xenografts in mice. *Transplantation* 2017;101(8):1801–10. DOI: 10.1097/TP.0000000000001489
35. Yamamoto T., Li Q., Hara H. et al. B cell phenotypes in baboons with pig artery patch grafts receiving conventional immunosuppressive therapy. *Transpl Immunol* 2018;51:12–20. DOI: 10.1016/j.trim.2018.08.005
36. Xu H., Chilton P.M., Tanner M.K. et al. Humoral immunity is the dominant barrier for allogeneic bone marrow engraftment in sensitized recipients. *Blood* 2006;108(10):3611–9. DOI: 10.1182/blood-2006-04-017467
37. Tahara H., Ide K., Basnet N. et al. Determination of the precursor frequency and the reaction intensity of xenoreactive human T lymphocytes. *Xenotransplantation* 2010;17(3):188–96. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2010.00575.x
38. Kim S.C., Mathews D.V., Breeden C.P. et al. Long-term survival of pig-to-rhesus macaque renal xenografts is dependent on CD4 T cell depletion. *Am J Transplant* 2019;19(8):2174–85. DOI: 10.1111/ajt.15329
39. Singh N.P., Guo L., Que X. et al. Blockade of indirect recognition mediated by CD4<sup>+</sup> T cells leads to prolonged cardiac xenograft survival. *Xenotransplantation* 2004;11(1):33–42. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2004.00079.x
40. Plenter R.J., Grazia T.J., Doan A.N. et al. CD4 T cells mediate cardiac xenograft rejection *via* host MHC class II. *J Heart Lung Transplant* 2012;31(9):1018–24. DOI: 10.1016/j.healun.2012.05.018
41. Mirenda V., Golshayan D., Read J. et al. Achieving permanent survival of islet xenografts by independent manipulation of direct and indirect T-cell responses. *Diabetes*. 2005;54(4):1048–55. DOI: 10.2337/diabetes.54.4.1048
42. Li S., Anwar I.J., Canning A.J. et al. Xenorecognition and costimulation of porcine endothelium-derived extracellular vesicles in initiating human porcine-specific T cell immune responses. *Am J Transplant* 2023;2023(7):904–19. DOI: 10.1016/j.ajt.2023.04.006
43. Devos T., Yan Y., Segers C. et al. Role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the rejection of heart or islet xenografts in recipients with xenotolerance in the innate immune compartment. *Transplant Proc* 2005;37(1):516–7. DOI: 10.1016/j.transproceed.2004.12.012

#### Вклад авторов

Н.А. Персиянцева: проведение экспериментов, анализ результатов, статистический анализ, написание текста статьи;  
 А.А. Калинина: написание текста статьи, обзор литературы по теме статьи, анализ полученных данных;  
 М.А. Замкова, Д.Б. Казанский: разработка дизайна исследования, редактирование;  
 Л.М. Хромых: анализ полученных данных, редактирование.

#### Authors' contributions

N.A. Persiyantseva: conducting experiments, analyzing results, statistical analysis, article writing;  
 A.A. Kalinina: article writing, literature review on the topic of the article, analysis of the data obtained;  
 M.A. Zamkova, D.B. Kazansky: research design development, editing;  
 L.M. Khromykh: analysis of the received data, editing.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

Н.А. Персиянцева / N.A. Persiyantseva: <https://orcid.org/0000-0002-2097-5986>  
 А.А. Калинина / A.A. Kalinina: <https://orcid.org/0000-0002-6912-5579>  
 М.А. Замкова / M.A. Zamkova: <https://orcid.org/0000-0002-4687-7444>  
 Л.М. Хромых / L.M. Khromykh: <https://orcid.org/0000-0002-5793-0271>  
 Д.Б. Казанский / D.B. Kazansky: <https://orcid.org/0000-0002-4179-8421>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00342).

**Funding.** The study was carried out with the support of the Russian Science Foundation (grant No. 22-15-00342)

**Соблюдение правил биоэтики.** Протокол исследования одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

**Compliance with principles of bioethics.** The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

**Статья поступила:** 18.06.2023. **Принята к публикации:** 22.09.2023.

**Article submitted:** 18.06.2023. **Accepted for publication:** 22.09.2023.