

Для цитирования: Селедцова Г.В., Доржиева А.Б., Иванова И.П., Селедцов В.И. Использование ксеногенных тестикулярных антигенов в индукции противоопухолевых реакций. Сибирский онкологический журнал. 2023; 22(6): 111–120. – doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-6-111-120

For citation: Seledtsova G.V., Dorzhieva A.B., Ivanova I.P., Seledtsov V.I. The use of xenogenic testicular antigens for induction of antitumor reactions. Siberian Journal of Oncology. 2023; 22(6): 111–120. – doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-6-111-120

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КСЕНОГЕННЫХ ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ В ИНДУКЦИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ РЕАКЦИЙ

Г.В. Селедцова¹, А.Б. Доржиева¹, И.П. Иванова¹, В.И. Селедцов²

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»

Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

²ФГБНУЗ «Центральная клиническая больница РАН»

Россия, 117593, г. Москва, Литовский бульвар, 1А

Аннотация

Тестикулярные антигены (ТАГ) в норме экспрессируются только клетками тканей яичка и плаценты, иммунная система организма человека толерантна к ТАГ, но при нарушении целостности оболочек яичка эти антигены (АГ), попадая в кровоток, индуцируют в организме появление аутоиммунных реакций, направленных на элиминацию их из организма. При развитии онкологического процесса ТАГ начинают экспрессироваться клетками опухолей печени, молочной железы, поджелудочной железы, кишечника, легкого, поэтому индукция иммунологического распознавания этих АГ может сопровождаться формированием противоопухолевых реакций в организме. Для повышения иммуногенности ТАГ в работе мы использовали ксеногенный ТАГ, полученный из тестикул барана. Использование бараньих ТАГ оправдано тем фактом, что ТАГ – эволюционно консервативные молекулы, следствием этого является высокая степень гомологии между дифференцировочными антигенами человека и животных. **Цель исследования** – оценка продолжительности жизни мышей-опухоленосителей и параметров клеточного иммунитета при различных вариантах иммунизации мышей ТАГ барана. **Материал и методы.** Исследование выполнено на мышах С57BL/6. Эффективность терапевтической или профилактической вакцинации ксеногенными (по отношению к мышам) бараньими ТАГ исследовали по изменению продолжительности жизни мышей-опухоленосителей меланомы В16 и карциномы LLC. Формирование иммунных реакций оценивали по пролиферативной способности спленоцитов отвечать на вакцинальные и контрольные АГ (набор MTT-assay kit (cell proliferation), Abcam) и по продукции ими IFN-gamma и IL-10 (ELISA с помощью наборов компании Cloud-Clone Corp.). **Результаты.** В модели карциномы LLC при профилактическом варианте вакцинации продолжительность жизни мышей с сингенным вариантом вакцинации не отличалась от опухолевого контроля, а при ксеногенном варианте вакцинации увеличилась на 60 %. При терапевтическом варианте вакцинации достоверных отличий в продолжительности жизни вакцинированных мышей обнаружено не было. Выявлено достоверное увеличение пролиферативной активности спленоцитов в ответ на опухолевые АГ в условиях предварительно вакцинированных ксеногенным ТАГ как у опухоленосителей LLC, так и у носителей В16. В условиях ксеногенной вакцинации у опухоленосителей В16 и LLC зафиксирована повышенная продукция спленocyтaми IFN-gamma. Продукция IFN-gamma спленocyтaми контрольных опухолевых мышей и в сингенном варианте вакцинации не различалась. Отмечено также достоверное снижение продукции IL-10 в ксеногенном варианте предварительной иммунизации.

Ключевые слова: тестикулярный антиген, противоопухолевый иммунитет, ксеногенная вакцинация.

THE USE OF XENOGENIC TESTICULAR ANTIGENS FOR INDUCTION OF ANTITUMOR REACTIONS

G.V. Seledtsova¹, A.B. Dorzhieva¹, I.P. Ivanova¹, V.I. Seledtsov²

¹Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14, Yadrintsevskaya St., Novosibirsk, 630099, Russia

²Central Clinical Hospital of the Russian Academy of Sciences
1A, Litovskiy Blvd., Moscow, 117593, Russia

Abstract

Testicular antigens (TAGs) are normally expressed only by cells of testicular and placental tissues. Human immune system is tolerant to TAG, but if the integrity of the testicular membranes is disrupted, these antigens, entering the bloodstream, induce autoimmune reactions for eliminating them from the body. In malignancy, TAGs begin to be expressed by tumor cells of the liver, breast, pancreas, intestine, and lung. Immunological recognition of these AGs leads to autoimmune reactions against these AGs, i.e. antitumor reactions in the body. We used xenogenic TAGs derived from ram testis to increase TAG immunogenicity. The use of ram TAGs is justified by the fact that TAGs are evolutionarily conserved molecules and there is a high degree of homology between human and animal TAGs. **The purpose of the study** was to evaluate the lifespan of tumor-bearing mice and parameters of cellular immunity in various options for immunizing mice with ram TAGs. **Material and Methods.** C57BL/6 mice were used. The efficacy of therapeutic or prophylactic vaccination with xenogenic TAGs was studied by changing lifespan of B16 and LLC tumor-bearing mice. Formation of immune responses was evaluated by proliferative ability of splenocytes to respond to vaccination and control AGs and by their production of IFN-gamma and IL-10. **Results.** In the LLC carcinoma model with a preventive vaccination option, the lifespan of mice with syngeneic vaccination did not differ from the tumor control; the lifespan of mice with xenogeneic vaccination increased by 60%. In therapeutic vaccination option, no significant differences in lifespan of vaccinated mice were found. A significant increase in the proliferative activity of splenocytes in response to tumor AGs was found in both LLC- and B16 tumor-bearing mice previously vaccinated with xenogenic TAGs. The increased IFN-gamma production by splenocytes was observed in B16 and LLC tumor-bearing mice with xenogeneic vaccination. The IFN-gamma production by splenocytes in tumor-bearing mice with syngeneic vaccination was not increased. A significant decrease in IL-10 production was noted in mice with xenogeneic vaccination.

Key words: Testicular antigen, antitumor immunity, xenogenic vaccination.

Введение

Разработка эффективных препаратов с селективным противоопухолевым действием представляется проблематичной по причине схожести биохимических процессов, протекающих в нормальных и опухолевых клетках [1]. Вместе с тем, клетки тканей организма и опухолевые клетки различаются своими поверхностными структурами [2, 3]. Все опухолеассоциированные антигены разделяются на две группы. Первая группа включает в себя вирусные и мутантные антигены, вторая группа – дифференцировочные антигены, которые экспрессируются как на клетках здоровых тканей, так и на опухолевых клетках [4]. Так называемые тестикулярные антигены (ТАГ), продукты *MAGEA1*, *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *NY-ESO-1*, *PRAME*, *CT83*, *SSX2* и других генов – специфичные для сперматозоидов белки, которые могут быть связаны с мембраной клетки и находиться в растворимой форме в пределах тканей яичка, оболочки которого непроницаемы для миграции клеток. ТАГ практически не экспрессируются нормальными клетками, исключение составляют клетки яичка и плаценты. В норме организм человека толерантен

к ТАГ, но при нарушении целостности оболочек яичка эти АГ, попадая в кровоток, индуцируют в организме появление аутоиммунных реакций, направленных на элиминацию их из организма. Многими исследователями показано, что ТАГ высоко экспрессируются в клетках опухоли печени, молочной железы, поджелудочной железы, кишечника, легких и др. [5–7]. Исходя из этого, для индукции специфических противоопухолевых реакций и генерации опухолеспецифичных ТАГ *in vivo* в настоящее время разрабатываются ДНК, мРНК и пептидные вакцины [8]. Несмотря на многообещающие результаты доклинических исследований, противоопухолевая эффективность вакцин на основе ТАГ в клинических испытаниях ограничена, что может быть частично объяснено их слабой иммуногенностью, низкой эффективностью процессов доставки и презентации антигена, а также супрессорным опухолевым микроокружением, подавляющим иммунные реакции. Использование ксеногенного варианта ТАГ в качестве вакцины будет способствовать усилению иммуногенности материала и нацелено на формирование эффекторного звена иммунитета, направленного на ТАГ,

представленные на собственных опухолевых клетках. Возможность использования ксеногенных ТАГ обосновывается следующими соображениями. Характерной особенностью генов ТАГ является высокая внутри- и межвидовая гомология. Так, в геномах человека, приматов и грызунов идентифицирована гомология генов семейства MAGE, SSX, идентичность ортологических последовательностей которых составляла 40–80 % [9]. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что иммунизация организма ксеногенными аналогами эндогенных молекул может приводить к индукции иммунологических реакций к собственным АГ, к которым организм исходно толерантен.

Цель исследования – оценка продолжительности жизни мышей-опухоленосителей и параметров клеточного иммунитета при различных вариантах иммунизации мышей ТАГ барана.

Материал и методы

Животные

Мыши линии C57BL/6 получены из питомника НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ.

Характеристика опухолевых линий

Карцинома LLC

Культура клеток состоит из полиморфных клеток, большинство которых имеет округлую форму. Значительная часть клетки занята ядром с крупными ядрышками и крупными конденсированными зернами хроматина. Фигуры митозов наблюдаются в 36,7 % клеток. Цитоплазма не гомогенная. В ДНК определено наличие генов *tage A-1*, *GP100*, *тирозины*, *her2/neu*, *раково-эмбрионального антигена*, на мембране клеток определены рецепторы тирозиназы и *GP100*.

Меланома B16

Культура представлена двумя типами клеток: эпителиоидные – 23,3 %, фибробластоподобные – 76,7 %. Эпителиоидные клетки имеют полиморфное строение, ядерно-цитоплазматическое соотношение смещено в сторону цитоплазмы. Хроматин в ядре слабо конденсирован, распределен равномерно. Фигур митоза не наблюдается. Цитоплазма не гомогенная. Фибробластоподобные клетки имеют полиморфное строение. Значительная часть клетки занята ядром с мелкоконденсированными зернами хроматина. Фигуры митоза наблюдаются крайне редко. 43,5 % клеток содержат пигмент. В ДНК определено наличие генов *tage A-1*, *GP100*, *тирозины*, *her2/neu*, *раково-эмбрионального антигена*, на мембране клеток определены рецепторы *Her2/neu*, тирозиназы и *GP100*.

Опухолевые линии поддерживались пассированием *in vitro* в среде RPMI 1640 с добавлением 10 % сыворотки плодов коров, L-глутамина в условиях 100 % влажности и содержанием 5 % CO₂. Рост опухолей в виде солидных образований фиксировался при введении 1×10^5 клеток/мышь подкожно.

В качестве вакцинальных АГ использованы:

1. Ксеногенный (по отношению к мышам) ТАГ барана, сингенный (мышинный ТАГ), спленоциты барана

Клетки яичка и селезенки были выделены из кусочков ткани в охлажденную среду с использованием стеклянного гомогенизатора, недиссоциированные клеточные конгломераты удаляли центрифугированием. Клетки фиксировали 1 % раствором параформальдегида в течение 15 мин, трижды отмывали центрифугированием от консерванта, подсчитывали клеточность и хранили в замороженном состоянии. Для экспериментов образцы размораживали и использовали в концентрации 5×10^6 клеток/мышь в 200 мкл физиологического раствора.

2. Антигены, приготовленные из опухолевых линий LLC и B16

Клетки опухолевых линий были зафиксированы 1 % раствором параформальдегида и заморожены. После разморозки использовались в экспериментах в различных концентрациях.

Терапевтический вариант вакцинации (привитие опухоли, затем вакцинация)

Мышам прививали 10^5 кл/мышь клетки карциномы LLC или меланомы B16. На 7-й и 14-й день после введения опухолевых клеток проводили вакцинацию мышей различными видами АГ (ксеногенный, сингенный) путем введения 2,5 млн вакцинальных клеток в область паховых лимфоузлов с двух сторон (5 млн клеток/мышь), далее фиксировали продолжительность жизни. В каждой группе было по 10 мышей.

Профилактический вариант вакцинации (вакцинация, затем привитие опухоли)

Мышей вакцинировали 2 раза с периодичностью в 7 дней различными видами АГ (ксеногенный, сингенный) путем введения вакцинальных клеток в область паховых лимфоузлов (5 млн клеток/мышь). Через 28 дней после начала вакцинации мышам вводили подкожно 10^5 кл/мышь клетки карциномы LLC или меланомы B16 и далее фиксировали продолжительность жизни. В каждой группе было по 10 мышей.

Для исследования параметров иммунитета в различных экспериментальных ситуациях и после инокуляции опухолевых клеток линий B16 и LLC мышам на 14-е сут у них забирались селезенка и сыворотка крови. Клеточную суспензию получали из селезенки методом мягкого выдавливания из кусочков ткани в охлажденную среду с использованием стеклянного гомогенизатора, недиссоциированные клеточные конгломераты осаждали путем отстаивания в течение 2–3 мин. Собранный надосадок 2-кратно отмывали центрифугированием, полученную фракцию клеток разводили средой RPMI в концентрации $1-2 \times 10^6$ /мл и использовали в тестах.

Пролиферативный тест

Клетки селезенки (10^6 /мл) культивировали в присутствии 5 мгк/мл КонА и АГ, полученного

из клеток опухолевых линий LLC и B16 в концентрации 1×10^6 кл/мл и 2×10^6 кл/мл в течение 72 ч. По окончании культивирования планшеты центрифугировали 5 мин при 1000 g, 4 °C, затем удаляли надосадок и в каждую лунку добавляли 50 мкл МТТ-реagenta (набор МТТ-assay kit (cell proliferation), Abcam). После культивирования в течение 3 ч в условиях CO₂-инкубатора к пробам добавляли растворитель МТТ. Через 15 мин пребывания планшета на орбитальном шейкере степень окрашивания лунок регистрировали на планшетном ридере при длине волны 490 нм и выражали в оптических единицах – о.е. Интенсивность окрашивания была пропорциональна количеству живых клеток в лунках.

Определение концентрации IFN-gamma и IL-10

Цитокины были измерены в сыворотке крови экспериментальных мышей методом ELISA с помощью наборов компании Cloud-Clone Corp. согласно инструкции производителя.

Статистическая обработка результатов

Представленные в статье данные получены в условиях одного эксперимента, количество образцов или животных (n) указано в подписи к рисунку. Результаты исследования подтверждены в двух экспериментах по выживанию мышей в условиях терапевтической вакцинации и в 3 однотипных экспериментах в условиях профилактической вакцинации. Эксперименты *in vitro* повторяли 2 раза. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Graph prism 8, используя непараметрические критерии Манна–Уитни. Анализ выживаемости мышей проводился методом Каплана–Мейера, достоверность отличий показателей выживаемости регистрировалась с помощью long-rank (Mantel–Cox) test.

Результаты

Трудность лечения злокачественных новообразований (ЗНО) в основном связана с проблемой эффективного распознавания организмом опухолевых клеток, которые по структуре мало чем отличаются от клеток здоровых тканей. Во взрослом здоровом организме дифференцировочные ТАГ, экспрессирующиеся только в клетках яичка, являются специфическими маркерами опухолей разного генеза и играют важную роль в поддержании высокой ростовой и инвазивной активности опухолевых клеток. Согласно нашей гипотезе, при иммунизации ксеногенными ТАГ у мышей будут формироваться иммунные реакции, направленные не только на вводимый АГ, но и перекрестным образом на имеющиеся в организме опухолевые клетки, если они несут на своей поверхности какие-либо ТАГ. Для этого параметры иммунитета были исследованы у вакцинированных ксеногенными (по отношению к линии мышей) ТАГ барана. Мышей вакцинировали 2 раза, с интервалом в 7 дней (рис. 1). Через 14 дней

после последней иммунизации у мышей забирали селезенки и спленоциты культивировали 72 ч в присутствии АГ, полученного из клеток опухолевых линий B16 и LLC в двух концентрациях: 1×10^5 кл/лунка и 2×10^5 кл/лунка (или без них в контроле). В качестве неспецифического активатора был использован конканавалин А (Кона). Зарегистрировано достоверное увеличение пролиферации клеток селезенки в ответ на все используемые варианты опухолевых АГ. Высота ответа была сравнима с неспецифической стимуляцией митогеном Кона. Таким образом, вакцинация мышей ТАГ барана приводит к формированию в организме животного популяции лимфоцитов, перекрестным образом реагирующих на опухолевые АГ. В следующей серии экспериментов, представленных на рис. 2 и 3, мышей вакцинировали 2 раза с интервалом в 7 дней ксеногенными (обозначение группы В на рис. 2 и 3) и сингенными ТАГ (обозначение группы С на рис. 2 и 3). Контролем вакцинации служила группа мышей, которым вводили физиологический раствор (группа А на рис. 2 и 3). Через 14 дней после последней вакцинации мышам прививали клетки опухолевых линий LLC (рис. 2) и B16 (рис. 3). Для оценки влияния опухолевого процесса на величину и перекрестную реактивность иммунного ответа мышей выводили из эксперимента на 14-й день после введения опухолевых клеток и оценивали пролиферацию спленоцитов на опухолевые АГ, полученные из B16 и LLC, для чего спленоциты культивировали 72 ч в присутствии АГ в концентрациях 1×10^5 кл/лунка и 2×10^5 кл/лунка (или без них в контроле). С помощью такого экспериментального

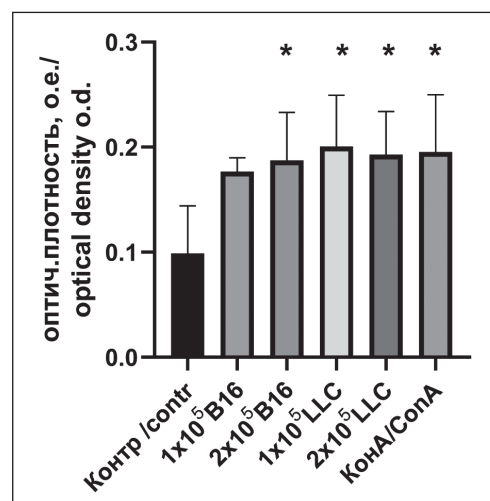


Рис. 1. Проллиферативный ответ спленоцитов мышей (n=5), полученных от предварительно вакцинированных тестикулярными АГ барана животных.

В качестве АГ – B16 и LLC в 1×10^6 кл/мл и 2×10^6 кл/мл и неспецифический стимулятор – Кона (5 мг/мл). * – $p < 0,05$.

Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 1. Proliferative response of splenocytes obtained from mice (n=5) pre-vaccinated with ram TAGs. B16 and LLC cells in different concentrations (1×10^6 cells/mL and 2×10^6 cells/mL) and non-specific activator – ConA (5 mg/mL).

* – $p < 0.05$. Note: created by the authors

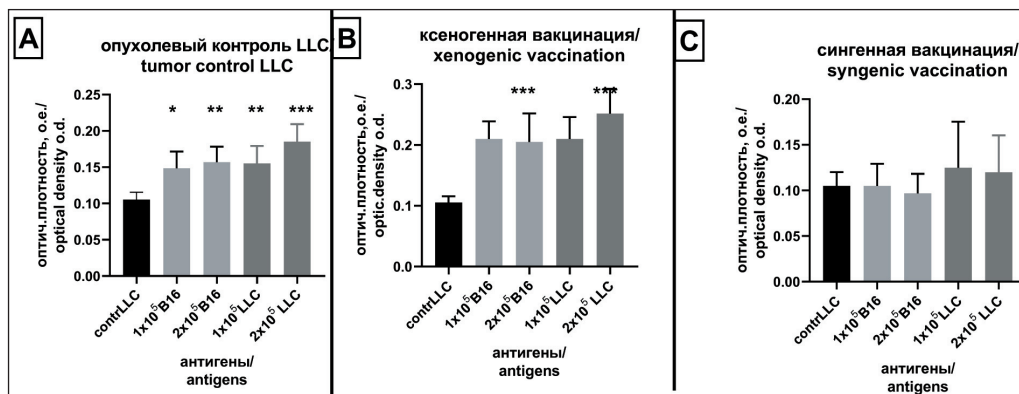


Рис. 2. Пролиферация лимфоцитов селезенки мышей (n=6), полученных от носителей карциномы LLC (A) через 14 дней после введения опухолевых клеток в режиме профилактического варианта вакцинации. Профилактическая вакцинация ксеногенными (B) и сингенными (C) ТАГ. Контроль – без добавления АГ. Антигены, полученные из клеток опухолевых линий B16 и LLC в концентрациях 1×10^5 кл/мл и 2×10^5 кл/мл. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,005$, *** – $p < 0,0001$. Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 2. Proliferation of mice splenocytes obtained from LLC tumor-bearing mice (n=6) 14 days after administration of tumor cells in the prophylactic vaccination mode (A). Prophylactic vaccination with xenogenic (B) and syngenic (C) TAG. Control: without addition of AG. Antigens were obtained from B16 and LLC tumor cells and added in an amount of 1×10^5 cells/mL and 2×10^5 cells/mL. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,005$, *** – $p < 0,0001$. Note: created by the authors

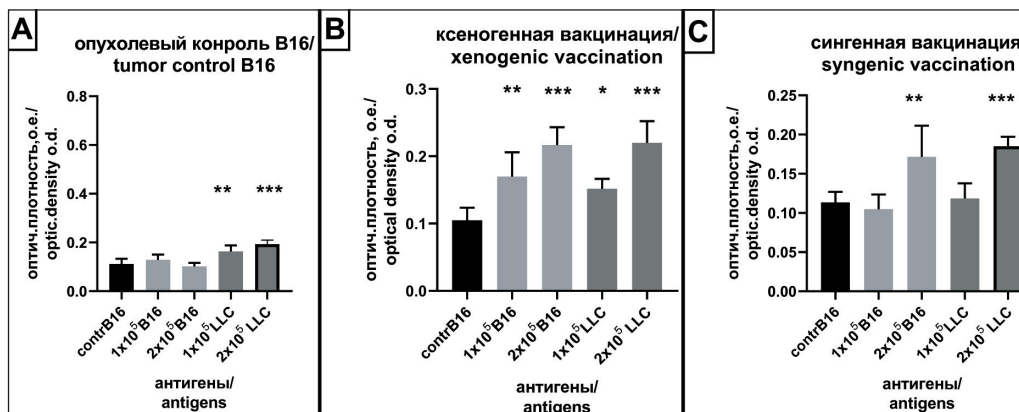


Рис. 3. Пролиферация лимфоцитов селезенки мышей (n=6), полученных от носителей меланомы B16 (A) через 14 дней после введения опухолевых клеток в режиме профилактического варианта вакцинации. Профилактическая вакцинация ксеногенными (B) и сингенными (C) тестикулярными АГ. Контроль – без добавления АГ. Антигены, полученные из клеток опухолевых линий B16 и LLC в концентрациях 1×10^5 кл/мл и 2×10^5 кл/мл. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,005$, *** – $p < 0,0001$.

Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 3. Proliferation mice splenocytes obtained from B16 tumor-bearing mice (n=6) 14 days after administration of tumor cells in the prophylactic vaccination mode (A). Prophylactic vaccination with xenogenic (B) and syngenic (C) TAG. Control: without addition of AG. Antigens were obtained from B16 and LLC tumor cells and added in an amount of 1×10^5 cells/mL and 2×10^5 cells/mL. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,005$, *** – $p < 0,0001$. Note: created by the authors

подхода мы исследовали параметры клеточного иммунитета в условиях начала развития опухолевой болезни. Обнаружено достоверное увеличение пролиферативной активности спленоцитов в ответ на опухолевые АГ у мышей с карциномой LLC, которые не были иммунизированы (контроль LLC-0,1 о.е., при добавлении АГ: $+ 1 \times 10^5$ B16-0,14 о.е. ($p=0,004$), $+ 2 \times 10^5$ B16-0,15 о.е. ($p=0,002$), $+ 1 \times 10^5$ LLC-0,15 о.е. ($p=0,004$), $+ 2 \times 10^5$ LLC-0,19 о.е. ($p=0,002$). Сплелоциты, полученные от предварительно вакцинированных ксеногенными ТАГ мышей, также отвечали пролиферацией в ответ на разные концентрации АГ, ответ достоверно отличался от неиммунизированного опухолевого контроля (контроль LLC-0,1 о.е., при добавлении АГ: $+ 1 \times 10^5$ B16-0,2 о.е. ($p=0,002$), $+ 2 \times 10^5$ B16-0,2 о.е.

($p=0,002$), $+ 1 \times 10^5$ LLC-0,23 о.е. ($p=0,004$), $+ 2 \times 10^5$ LLC-0,26 о.е. ($p=0,002$). Интенсивность пролиферативного ответа спленоцитов при ксеногенной вакцинации была выше ответа, зафиксированного в условиях сингенной вакцинации, и в сравнении с ответом спленоцитов неиммунизированного опухолевого контроля (рис. 2). Аналогичная картина пролиферативного ответа зарегистрирована в модели мышей-носителей B16 (рис. 3). Нужно отметить, что у контрольных мышей-носителей опухолей LLC и B16 зафиксировано наличие в селезенке популяции лимфоцитов, реагирующей на опухолевые АГ, что говорит об иммуногенности прививаемых опухолевых клеток. Таким образом, было доказано, что при иммунизации мышей ксеногенным (но не сингенным!) ТАГ формируется популяция

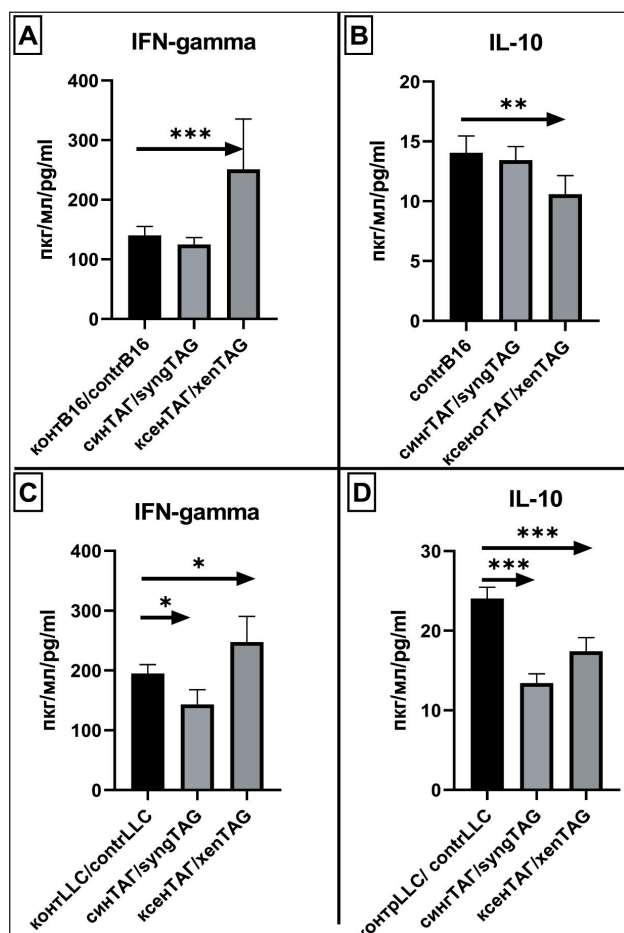


Рис. 4. Концентрация IFN-gamma и IL-10 в сыворотке крови мышей (n=6), подвергшихся профилактическому варианту вакцинации тестикулярной вакциной мышам с последующим введением клеток меланомы B16 (A, B) и карциномы LLC (C, D). Забор сыворотки на 14-е сут после введения опухолевых клеток. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,005$, *** – $p < 0,0001$.

Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 4. Concentration of IFN-gamma and IL-10 in blood serum of B16 melanoma (A, B) and LLC (C, D) mice (n=6) treated with prophylactic TAG vaccination. Serum sampling on day 14 after administration of tumor cells.

* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.005$, *** – $p < 0.0001$. Note: created by the authors

лимфоцитов, которая реагирует перекрестным образом на опухолевые АГ по вторичному типу, и в организме вакцинированных мышей индуцируются реакции, позволяющие защищать животных от развития сингенных опухолей или способствующие замедлению роста опухолевой массы. В условиях ксеногенной вакцинации у опухоленосителей B16 и LLC (рис. 4) в сыворотке крови мышей, полученной на 14-е сут эксперимента, определена концентрация IFN-gamma и IL-10. Зафиксирован достоверно повышенный уровень IFN-gamma как у мышей-опухоленосителей B16 (рис. 4A), так и у мышей-опухоленосителей LLC (рис. 4C). Значения IFN-gamma у мышей-опухоленосителей в сингенном варианте вакцинации не были повышены. Отмечено также достоверное снижение продукции IL-10 в ксеногенном варианте предварительной иммунизации (рис.

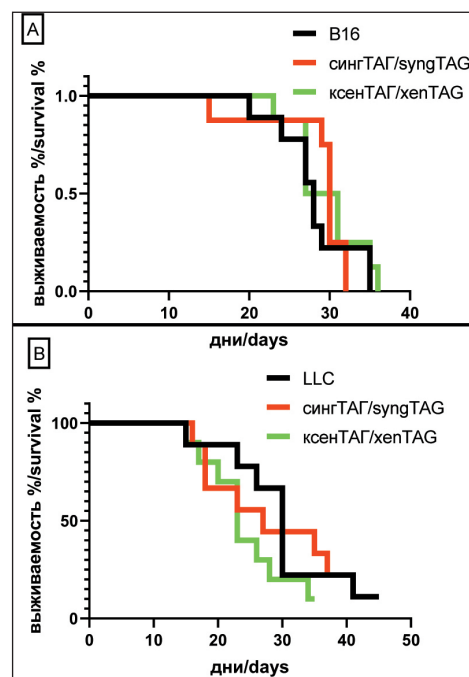


Рис. 5. Выживаемость мышей-опухоленосителей меланомы B16 (A) и карциномы LLC (B) в режиме терапевтической вакцинации. Мышам вводили клетки опухолевых линий B16 или LLC подкожно в концентрации 10^5 кл./мышь. Через неделю с интервалом в 7 дней мышам дважды вакцинировали ксеногенным (ксенотАГ) или сингенным (сингенн ТАГ) тестикулярным АГ п/к в 2 точки (5 млн клеток/мышь), далее фиксировали продолжительность жизни мышей. В контрольной группе мышей (B16 и LLC) вакцинации не проводилось. В каждой группе было по 10 мышей.

Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 5. Survival of B16 melanoma (A) and LLC (B) tumor-bearing mice with therapeutic vaccination. Mice were subcutaneously injected with of B16 or LLC cells at a concentration of 10^5 cells/mouse. A week later, at a 7-day interval, mice were subcutaneously vaccinated twice with xenogenous (xenogenic TAG) or syngenic (syngeneTAG) testicular AG at 2 points (5mln cells/mouse), then the lifespan of the mice was recorded. No vaccination was performed in the mouse control group (B16 and LLC). There were 10 mice in each group.

Note: created by the authors

4B, D). Сингенный вариант вакцинации мышей с LLC даже сопровождался достоверным снижением концентрации IFN-gamma и IL-10 ниже значений, зафиксированных у мышей-опухоленосителей без вакцинации. Далее представлены результаты исследования *in vivo* по оценке продолжительности жизни мышей-опухоленосителей, иммунизированных ТАГ в терапевтическом и профилактическом варианте исследования на двух моделях опухолей-меланомы B16 и карциномы LLC. Терапевтический вариант иммунизации подразумевает следующие манипуляции: мышам вводят опухолевые клетки и через 14 дней начинают иммунизацию. Результат иммунизации оценивают по изменению продолжительности жизни мышей-опухоленосителей. На рис. 5 представлена кривая выживаемости мышей с привитой им карциномой LLC или меланомой B16.

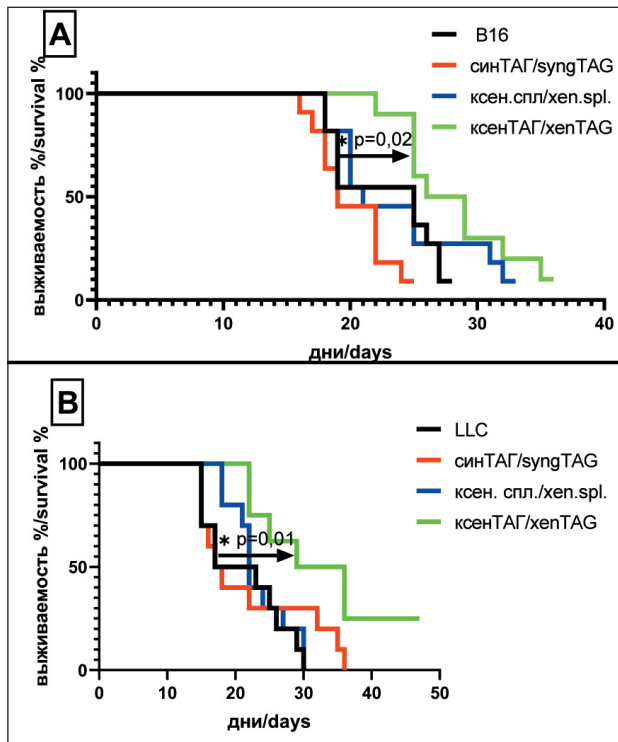


Рис. 6. Выживаемость мышей-опухоленосителей меланомы B16 (А) и карциномы LLC (В) в режиме профилактической вакцинации. Мышей вакцинировали ксеногенным (ксеног ТАГ), сингенным (сингеннТАГ) тестикулярным АГ и АГ, полученным из клеток селезенки барана (ксеног. спленоциты) 2 раза с интервалом в 7 дней п/к в 2 точки (5 млн клеток/мышь), через 14 дней после последней вакцинации мышам вводили клетки опухолевых линий B16 или LLC п/к в концентрации 10^5 кл/ мышь, далее фиксировали продолжительность жизни. В контрольной группе мышей (B16 и LLC) вакцинации не проводилось. В каждой группе было по 10 мышей, * – $p < 0,05$. Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 6. Survival of B16 (A) and LLC (B) tumor-bearing mice with prophylactic vaccination. Mice were vaccinated with xenogenous (xenog TA), syngenic (syngenntA) testicular AG and AG derived from ram spleen cells (xenog.splenocytes) 2 times with an interval of 7 days in 2 points (5mln cells/mouse), 14 days after the last vaccination, mice were injected with B16 or LLC cells subcutaneously at a concentration of 10^5 cells/mouse, then the lifespan was fixed. No vaccination was performed in the mouse control group (B16 and LLC). There were 10 mice in each group, * – $p < 0,05$.

Note: created by the authors

Процесс иммунизации мышей ТАГ ксеногенного или сингенного происхождения не повлиял на продолжительность жизни мышей-опухоленосителей LLC и B16. На рис. 6 представлены кривые выживаемости мышей-опухоленосителей меланомы B16 (А) и карциномы LLC(В), полученные в результате выполнения профилактического варианта вакцинации мышей. В качестве контрольных АГ были использованы клетки селезенки барана и клетки яичка мышей. Наиболее значимые результаты были получены в модели карциномы LLC. При вакцинации ксеногенными ТАГ продолжительность жизни мышей-опухоленосителей LLC достоверно увеличилась на 60 % (медиана жизни мышей-опухоленосителей – 20 дней, при

введении ксеногенных ТАГ – 32,2 дня). Изменения продолжительности жизни мышей контрольных групп и невакцинированных опухоленосителей не зарегистрировано. Обнаружено достоверное увеличение продолжительности жизни и у мышей-опухоленосителей меланомы B16, однако это увеличение продолжительности жизни было не столь значительным.

Обсуждение

Вакцинация против опухолей является многообещающим подходом в иммунотерапии ЗНО, поскольку она обладает высокой специфичностью и небольшим количеством побочных эффектов. Однако большинство противоопухолевых вакцин содержат только один опухолевый антиген, и этого количества недостаточно для индукции мощного иммунного ответа, что позволяет опухоли уклониться от распознавания иммунной системой [10]. Низкую эффективность вакцинации можно объяснить не только недостаточной иммуногенностью опухоли, которая препятствует образованию достаточного количества Т-клеток, необходимых для индукции долгосрочного иммунитета, но и наличием иммуносупрессорного окружения. Иммуносупрессивные клетки, такие как ассоциированные с опухолью макрофаги, регуляторные Т-клетки, опухоль-ассоциированные фибробласты (CAFs) и миелоидные клетки-супрессоры, накапливаются в опухоли и создают иммуносупрессивное микроокружение путем экспрессии супрессорных рецепторов и продукции иммуносупрессивных цитокинов [11–13]. Для оптимальной активации иммунных реакций с использованием опухолевых вакцин дендритные клетки должны поглотить широкий спектр опухолеспецифичных антигенов. Однако из-за гетерогенности и сложности опухолевых антигенов немногие антигены могут быть использованы для приготовления универсальных вакцин [14]. Кроме того, спектр иммуногенных АГ может варьировать не только в зависимости от типа рака, но даже у разных пациентов. Исходя из вышеизложенного, мы предлагаем использовать в качестве источника АГ не опухоль-специфичные АГ, а опухоль-ассоциированные АГ (ТАГ). Дифференцировочные тестикулярные АГ (продукты генов *MAGEA1*, *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *NY-ESO-1*, *PRAME*, *CT83*, *SSX2* и др.) относятся к группе ТАГ и являются специфическими маркерами опухолей разного генеза. Показано, что ТАГ высоко экспрессируются в клетках опухоли молочной железы, печени, поджелудочной железы, легких, толстой кишки и др., но слабо экспрессируются клетками организма, за исключением клеток яичка и плаценты [5–7]. По сути, эти антигены являются универсальными, высокоспецифичными опухолевыми маркерами, наиболее подходящими как для профилактической, так и для терапевтической противоопухолевой

вакцинации. Дифференцировочные антигены, в том числе тестикулярные, являются эволюционно консервативными молекулами. Следствием этого, с одной стороны, является высокая степень гомологии между дифференцировочными антигенами человека и животных, а с другой стороны, небольшие межвидовые структурные отличия этих антигенов придают им высокую иммуногенность и способность индуцировать перекрестную иммунологическую реактивность по отношению к аутоантигенам. Основываясь на вышеизложенном, мы в своей работе использовали ТАГ барана, которые обеспечивали полиантигенность и высокую иммуногенность за счет ксеногенности происхождения. Эффективность использования ксеногенных дифференцировочных антигенов для прерывания иммунной толерантности к опухоли была продемонстрирована в многочисленных экспериментальных исследованиях [6, 15–17]. Клетки семи опухолевых линий человека (рак поджелудочной железы HPAF II, рак головного мозга U-87 МГ, фибросаркома, рак яичников OVCAR3 и SKOV3 и рак молочной железы MCF7 и MDA-MB231) культивировали с двумя ксеногенными клеточными линиями фибробластов обезьяны и курицы в системе культивирования Transwell. Пролиферация большинства линий опухолевых клеток увеличилась на 14–26 % при совместной культуре с ксеногенными фибробластами [19]. С.Р. Huang et al. показано, что сочетание химиотерапии с иммунотерапией ксеногенными уротелиальными клетками было более эффективным, чем любое из этих лечений в монорежиме, что регистрировалось увеличением продолжительности жизни мышей в модели опухоли мочевого пузыря [18]. Данные, представленные на рис. 1 и 2, показали, что иммунизация мышей тестикулярным АГ барана сопровождается формированием в организме мыши популяции лимфоцитов, реагирующей на АГ, приготовленный из клеток опухоли B16 и LLC по вторичному типу, уровень пролиферативного ответа *in vitro* был сравним с митогенной стимуляцией КонА. Значимость «ксеногенности» АГ была подтверждена в экспериментах с вакцинацией мышей ТАГ барана по сравнению с ТАГ мышей (рис. 2, 3). При использовании ксеногенного ТАГ уровень пролиферации был выше по сравнению с сингенным вариантом вакцинации. Показан также дозозависимый эффект ответа в присутствии АГ, полученного из опухолевых клеток линий B16 и LLC в концентрациях 1×10^6 кл/мл и 2×10^6 кл/мл. Привитие опухолей B16 и LLC в профилактическом варианте иммунизации не изменило направленности и снижения высоты ответа. В сыворотках крови мышей-опухоленосителей зафиксирован прирост количества IFN-gamma и снижение концентрации IL-10 в условиях ксеногенного варианта вакцинации. Сингенная вакцинация ТАГ не вызывала стимуляции столь

мощного Т-клеточного варианта ответа (рис. 4.). Эффективность использования ксеногенного ТАГ подтверждена в экспериментах *in vivo*, несмотря на то, что терапевтический вариант вакцинации не сопровождался увеличением продолжительности жизни мышей-опухоленосителей меланомы B16 и карциномы LLC. Мы полагаем, что это связано с особенностями экспериментальной модели. Введение мыши 10^5 клеток приводит к возникновению у нее опухоли, продолжительность жизни животного в этом случае составляет 21–30 дней, что соответствует IV стадии ЗНО у человека. В этих условиях иммунная система не успевает запустить противоопухолевые механизмы отторжения, кроме того, иммуносупрессорное значение самой опухоли в этом случае может быть значимым. При профилактической иммунизации (вначале 2-кратная иммунизация, затем привитие опухоли) наблюдалось значимое увеличение продолжительности жизни: мышей-опухоленосителей LLC – на 60 % и носителей меланомы B16 – на 20 %. В качестве контрольных АГ были использованы клетки селезенки барана и клетки яичка мышей. Изменения продолжительности жизни мышей контрольных групп и невакцинированных опухоленосителей не зарегистрировано. Разницу в продолжительности жизни мышей мы связываем с разным количеством АГ на опухолевых клетках линий B16 и LLC и их гомологией с ТАГ и степенью экспрессии. Эффективность использования ксеногенных тканей в лечении мышей-опухоленосителей подтверждена J.A. Kraško et al. [17]. Мышей C57BL/6 с карциномой легких Льюис (LLC) лечили либо ксеногенной вакциной, изготовленной из цельного эмбриона цыпленка, либо ксеногенной вакциной, изготовленной из эмбриональной ткани мозга крысы с белком *Bacillus subtilis* в качестве адьюванта. После удаления первичной опухоли курс из трех подкожных вакцинаций ксеногенной вакциной из куриного эмбриона привел к значительному увеличению общей выживаемости мышей (100 % через 70 дней наблюдения по сравнению с 40 % у необработанных контрольных мышей) и значительному уменьшению площади и частоты очагов метастазирования. Основываясь на данных литературы [17] и результатах собственных исследований, можно констатировать, что результат ксеногенной вакцинации очень сильно зависит от вида ксеногенного АГ, его происхождения. Так, ксеногенная вакцина на основе ткани мозга крысы не улучшила ни один из исследованных параметров в работе J.A. Kraško et al. [17]. Поэтому подбор универсального ксеногенного АГ, позволяющего индуцировать широкий спектр иммунных реакций против многих опухолевых АГ, является очень важным и перспективным направлением исследования. Таким образом, добавление в схему лечения онкологических больных иммунотерапии с использованием ксеногенного полиантигенного

варианта стимуляции противоопухолевого иммунитета будет способствовать повышению эффективности терапии. В перспективе использование ксеногенного варианта вакцинации в профилактическом варианте использования поможет создать в организме основы защиты от малигнизации при наличии доброкачественных опухолей, например фиброаденомы молочной железы, полипоза кишечника или желудка и др.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Christofi T., Baritaki S., Falzone L., Libra M., Zaravinos A. Current Perspectives in Cancer Immunotherapy. *Cancers* (Basel). 2019; 11(10): 1472. doi: 10.3390/cancers11101472.
2. Quail D.F., Joyce J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013; 19(11): 1423–37. doi: 10.1038/nm.3394.
3. Klemm F., Joyce J.A. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends Cell Biol*. 2015; 25(4): 198–213. doi: 10.1016/j.tcb.2014.11.006.
4. Gordeeva O. Cancer-testis antigens: Unique cancer stem cell biomarkers and targets for cancer therapy. *Semin Cancer Biol*. 2018; 53: 75–89. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.08.006.
5. Gjerstorff M.F., Andersen M.H., Ditzel H.J. Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget*. 2015; 6(18): 15772–87. doi: 10.18632/oncotarget.4694.
6. Strioga M.M., Darinskas A., Pasukoniene V., Mlynska A., Ostapenko V., Schijns V. Xenogeneic therapeutic cancer vaccines as breakers of immune tolerance for clinical application: to use or not to use? *Vaccine*. 2014; 32(32): 4015–24. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.05.006.
7. Salmaninejad A., Zamani M.R., Pourvahedi M., Golchehre Z., Hosseini Bereshneh A., Rezaei N. Cancer/Testis Antigens: Expression, Regulation, Tumor Invasion, and Use in Immunotherapy of Cancers. *Immunol Invest*. 2016; 45(7): 619–40. doi: 10.1080/08820139.2016.1197241.
8. Ren S., Zhang Z., Li M., Wang D., Guo R., Fang X., Chen F. Cancer testis antigen subfamilies: Attractive targets for therapeutic vaccine (Review). *Int J Oncol*. 2023; 62(6): 71. doi: 10.3892/ijo.2023.5519.
9. Plaen E.D., Backer O.D., Arnaud D., Bonjean B., Chomez P., Martelange V., Avner P., Baldacci P., Babinet C., Hwang S.Y., Knowles B., Boon T. A New Family of Mouse Genes Homologous to the Human MAGE Genes. *Genomics*. 1999; 55(2): 176–84. doi: 10.1006/geno.1998.5638.
10. Zhang X., Cui H., Zhang W., Li Z., Gao J. Engineered tumor cell-derived vaccines against cancer: The art of combating poison with poison. *Bioact Mater*. 2022; 22: 491–517. doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.10.016.
11. Welters M.J., van der Sluis T.C., van Meir H., Loof N.M., van Ham V.J., van Duikeren S., Santegoets S.J., Arens R., de Kam M.L., Cohen A.F., van Poelgeest M.I., Kenter G.G., Kroep J.R., Burggraaf J., Melief C.J., van der Burg S.H. Vaccination during myeloid cell depletion by cancer chemotherapy fosters robust T cell responses. *Sci Transl Med*. 2016; 8(334). doi: 10.1126/scitranslmed.aad8307.
12. Mazzearella L., Duso B.A., Trapani D., Belli C., D'Amico P., Ferraro E., Viale G., Curigliano G. The evolving landscape of 'next-generation' immune checkpoint inhibitors: A review. *Eur J Cancer*. 2019; 117: 14–31. doi: 10.1016/j.ejca.2019.04.035.
13. Mariathasan S., Turley S.J., Nickles D., Castiglioni A., Yuen K., Wang Y., Kadel E.E., Koeppen H., Astarita J.L., Cubas R., Jhunjunwala S., Banachereau R., Yang Y., Guan Y., Chalouni C., Ziai J., Şenbabaoğlu Y., Santoro S., Sheinson D., Hung J., Giltman J.M., Pierce A.A., Mesh K., Lianoglou S., Riegler J., Carano R.A.D., Eriksson P., Höglund M., Sommarriba L., Halligan D.L., van der Heijden M.S., Loriot Y., Rosenberg J.E., Fong L., Mellman I., Chen D.S., Green M., Derleth C., Fine G.D., Hegde P.S., Bourgon R., Powles T. TGFβ attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature*. 2018; 554(7693): 544–8. doi: 10.1038/nature25501.
14. You G., Kim Y., Lee J.H., Song J., Mok H. Exosome-modified PLGA microspheres for improved internalization into dendritic cells and macrophages. *Biotechnol Bioproc E*. 2020; 25(4): 521–7. doi: 10.1007/s12257-020-0008-7.
15. Palena C., Schlom J. Vaccines against human carcinomas: strategies to improve antitumor immune responses. *J Biomed Biotechnol*. 2010. doi: 10.1155/2010/380697.
16. Seledtsov V.I., Shishkov A.A., Seledtsova G.V. Xenovaccinotherapy for cancer, current cancer treatment – Novel Beyond Conventional Approaches, Öner Özdemir (Ed.). InTech. 2011. 416–28. doi: 10.5772/23671.
17. Kraško J.A., Žilionytė K., Darinskas A., Dobrovolskienė N., Mlynska A., Riabceva S., Zalutsky I., Derevyanko M., Kulchitsky V., Karaman O., Fedosova N., Symchych T.V., Didenko G., Chekhun V., Strioga M., Pašukoniene V. Post-operative unadjuvanted therapeutic xenovaccination with chicken whole embryo vaccine suppresses distant micrometastases and prolongs survival in a murine Lewis lung carcinoma model. *Oncol Lett*. 2018; 15(4): 5098–104. doi: 10.3892/ol.2018.7950.
18. Huang C.P., Wu C.C., Shyr C.R. Combination of novel intravesical xenogeneic urothelial cell immunotherapy and chemotherapy enhances antitumor efficacy in preclinical murine bladder tumor models. *Cancer Immunol Immunother*. 2021; 70(5): 1419–33. doi: 10.1007/s00262-020-02775-6.
19. Usha L., Klapko O., Edassery S. Xenogeneic fibroblasts inhibit the growth of the breast and ovarian cancer cell lines in co-culture. *Neoplasma*. 2021; 68(6): 1265–71. doi: 10.4149/neo_2021_210226N252.

Поступила/Received 20.07.2023

Одобрена после рецензирования/Revised 07.12.2023

Принята к публикации/Accepted 15.12.2023

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Селедцова Галина Викторовна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 1086-8579. Researcher ID (WOS): B-1085-2014. ORCID: 0000-0001-8072-6255.

Доржиева Аяна Баяровна, аспирант, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск, Россия). ORCID: 0000-0002-7109-4687.

Иванова Ирина Петровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 9322-2073. Researcher ID (WOS): D-9386-2014. ORCID: 0000-0003-1435-2616.

Селедцов Виктор Иванович, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, ФГБНУЗ «Центральная клиническая больница РАН» (г. Москва, Россия). SPIN-код: 6469-9230. ORCID: 0000-0002-4746-8853.

ВКЛАД АВТОРОВ

Селедцова Галина Викторовна: планирование научной работы, анализ результатов, написание статьи.

Доржиева Аяна Баяровна: выполнение экспериментального раздела по работам *in vivo*.

Иванова Ирина Петровна: выполнение экспериментального раздела с оценкой состояния иммунитета, Исследование содержания цитокинов и уровня пролиферации спленоцитов.

Селедцов Виктор Иванович: разработка научной идеи, общая концепция написания статьи, подбор материала.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой части работы.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соответствие принципам этики

Все животные содержались в виварии в условиях, соответствующих международному стандарту. Работы с животными проводились в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации и положениями директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных. Все протоколы и методы исследования были утверждены этическим комитетом НИИФКИ (Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14), протокол № 143 от 29.11.2023.

ABOUT THE AUTHORS

Galina V. Seledtsova, MD, DSc, Chief Researcher, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): B-1085-2014. ORCID: 0000-0001-8072-6255.

Ayana B. Dorzhieva, Postgraduate, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk, Russia). ORCID: 0000-0002-7109-4687.

Irina P. Ivanova, MD, PhD, Senior Researcher, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): D-9386-2014. ORCID: 0000-0003-1435-2616.

Viktor I. Seledtsov, MD, DSc, Chief Researcher, Central Clinical Hospital of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0002-4746-8853.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Galina V. Seledtsova: planning of scientific work, analysis of results, writing of the manuscript.

Ayana B. Dorzhieva: performing *in vivo* studies.

Irina P. Ivanova: performing an experimental section assessing the state of immunity, studying the cytokine content and the level of splenocyte proliferation.

Viktor I. Seledtsov: development of a scientific idea, general concept of writing the manuscript, data selection.

All authors approved the final version of the manuscript prior to publication and agreed to be responsible for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were appropriately investigated and resolved.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Compliance with Ethical Standards

All animals were kept in a vivarium under conditions that meet international standards. Work with animals was carried out in strict accordance with the legislation of the Russian Federation and the provisions of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of the European Union of September 22, 2010 on animal protection. All protocols and research methods were approved by the ethical committee of the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (14, Yadrintsevskaya St., Novosibirsk, 630099, Russia), protocol No. 143 dated November 29, 2023.