МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ИЦиГ СО РАН)

На правах рукописи

Рузанова Вера Сергеевна

ХАРАКТЕРИСТИКА СИНЕРГИЧНОГО ДЕЙСТВИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПОДХОДА «КАРАНАХАН» И *IN SITU* ВАКЦИНАЦИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ МЫШИ

1.5.22. Клеточная биология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук

Богачев Сергей Станиславович

Новосибирск – 2026

Оглавление

Введение....7
Актуальность темы исследования 7
Степень разработанности темы исследования 8
Цель исследования 14
Задачи исследования 14
Научная новизна 15
Теоретическая и практическая значимость 16
Положения, выносимые на защиту: 17
Структура и объем работы 18
Личный вклад автора 18
Публикации и апробация результатов 18
Благодарности 20
Обзор литературы....22
Часть 1. Опухоль и иммунная система, «баланс сил» 24
1. Фазы взаимодействия опухоли и иммунной системы 24
2. Две составляющие противоопухолевого иммунитета 25
3. Врожденный противоопухолевый иммунитет. Механизмы киллинга клеток опухоли и типы клеток врожденного иммунитета, осуществляющих литическую функцию по отношению к неотрансформированной клетке 26
4. Активация адаптивного иммунитета 37
5. Механизмы ускользания неотрансформированных клеток и опухоли в целом от иммунологического надзора 40
Часть 2. Характеристика опухолевых стволовых клеток, рассматриваемых в качестве мишени таргетной терапии 44
6. Основные гипотезы возникновения опухолей 44
7. Основные характеристики опухолевых стволовых клеток 46
8. Терапевтические подходы, направленные на эрадикацию ОСК 47

Часть 3. Новейшие технологии лечения злокачественных опухолей начала 21 века 49

9. Блокирующие/активирующие моноклональные антитела, химические ингибиторы сигнальных путей и их мишени 49

10. Хронометрические подходы: ММХТ ЦФ, *in situ* вакцинация и терапевтический подход «Каранахан». Теоретическое обоснование возможности объединения трех современных хронометрических противоопухолевых подходов в единую терапевтическую платформу при лечении злокачественных новообразований 51

Заключение по обзору литературы 83

Материалы и методы 84

1. Используемые реактивы 84

2. Используемые приборы 85

3. Используемые программы 85

4. Экспериментальные животные 85

5. Опухолевые модели 86

6. Терапевтические препараты 86

7. Используемые антитела и изотип-контроли 87

8. Олигонуклеотидные последовательности праймеров 89

9. Выделение опухолевых клеток, мононуклеаров крови, клеток селезенки, перитонеальных макрофагов 90

10. Мечение ДНК флуоресцентным красителем TAMRA 90

11. Определение содержания дзОСК в опухоли 91

12. Анализ цикла репарации в опухолевых клетках 91

13. Определение времени синхронизации опухолевых клеток после трехкратной обработки цитостатиком в режиме, блокирующем выход клеток из репаративного процесса 92

14. Лечение экспериментальных животных 93

15. Активация перитонеальных макрофагов 94

16. Оценка влияния кондиционной среды В-лимфомы на активность перитонеальных макрофагов 94

17. Воздействие на активированные препаратом GcMAF мышиные перитонеальные макрофаги лизатами опухоли Льюис 94

18. Анализ активации фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мышей 95

19. Лечение карциномы лёгкого Льюис, используя подход «Каранахан» в сочетании с *in situ* вакцинацией активатором макрофагов GcMAF 95

20. Анализ изменения численности популяций иммунных клеток в опухоли, селезёнке, среди мононуклеаров крови и перитонеальных макрофагов 96

21. МТТ-тест 96

22. Приготовление мазков опухоли 96

23. Получение кДНК 97

24. ПЦР анализ 97

25. ПЦР в реальном времени 97

26. Патоморфологический анализ органов мышей 97

27. Анализ изменения численности популяций MDSC среди мононуклеаров крови мышей, получавших лечение согласно подходу «Каранахан» 98

28. Оценка количества клеток-супрессоров миелоидного происхождения с фенотипом CD11b+Ly-6G+, активированных к нетозу, после применения подхода «Каранахан» 98

29. Оценка количества клеток миелоидного происхождения, несущих на своей поверхности FcR и OX40R, после терапии согласно подходу «Каранахан» 99

30. Мечение антител αOX40 99

31. Лечение В-клеточной лимфомы А20, используя совмещенный терапевтический режим, объединяющий подход «Каранахан» и *in situ* вакцинацию CpG/αOX40 99

32. Оценка аддитивности/синергии комбинации подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации 99

33. Статистический анализ 100

Результаты 101

Экспериментальный дизайн исследования 101

Динамика роста опухолевого трансплантата в зависимости от пола экспериментального животного 102

Часть 1. Синергичное противоопухолевое действие подхода «Каранахан» и активности врожденного противоопухолевого иммунитета, индуцированного *in situ* вакцинацией GcMAF 103

1. Определение основных параметров подхода «Каранахан» на модели слабоиммуногенной карциномы лёгких Льюис, перевиваемой мышам линии C57BL/6 103

2. Характеристика противоопухолевого действия подхода «Каранахан» на модели карциномы лёгкого Льюис 106

3. Объединение подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации GcMAF в одну терапевтическую платформу. Оценка синергичного противоопухолевого действия 112

4. Обсуждение к первой части исследования 139

Часть 2. Аддитивное противоопухолевое действие подхода «Каранахан» и активности адаптивного противоопухолевого иммунитета, индуцированного *in situ* вакцинацией антителами к OX40R 148

1. Определение основных параметров подхода «Каранахан» на модели иммуногенной B-клеточной лимфомы A20, перевиваемой мышам линии BALB/c 148

2. Экспериментальное сравнение противоопухолевого действия подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации на модели B-клеточной лимфомы A20 151

3. Объединение подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации CpG/αOX40 в одну терапевтическую платформу. Оценка совместного противоопухолевого действия 154

4. Обсуждение ко второй части исследования 165

Общее заключение по работе 170

Выводы 172

Список сокращений 174

Список литературы 176

Приложения 209

Приложение 1. Экспериментальный дизайн исследования. Представлена последовательность проведенных экспериментов и перечислены методы, используемые в ходе каждого из экспериментов 209

Приложение 2. Краткие результаты первой части исследования. Совмещение подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации активатором маркрофагов GcMAF на модели карциномы Льюис 222

Приложение 3. Краткие результаты второй части исследования. Совмещение подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации антителами к OX40R на модели B-клеточной лимфомы A20 226

Приложение 4. Оценка эффективности подхода «Каранахан» на модели карциномы Льюис с прививкой графта в одну лапу. Эксперименты №1 и №2 230

Приложение 5. Оценка эффективности подхода «Каранахан» на модели карциномы Льюис с прививкой графта в две лапы. Эксперименты №3 и №4 231

Приложение 6. Оценка развития иммунного ответа, индуцированного проведенным лечением согласно подходу «Каранахан» и согласно подходу «Каранахан» в сочетании с *in situ* вакцинацией препаратом GcMAF у мышей с карциномой Льюис. Пилотное исследование. Эксперимент №7 233

Введение

Актуальность темы исследования

Онкологические заболевания считаются одной из основных причин преждевременной смерти во всех странах мира. По оценкам всемирной организации здравоохранения в 2019 году злокачественные опухоли являлись первой или второй ведущей причиной смерти в возрасте до 70 лет в 112 из 183 стран и занимали третье или четвертое место еще в 23 странах. По существующим оценкам, в 2022 году во всем мире было зарегистрировано 20 миллионов случаев онкологических заболеваний и почти 10 миллионов смертей от них. Рак легких является наиболее частой неоплазией, за которым следуют рак молочной железы, колоректальный рак, рак простаты и желудка. Более того, рак легких остается ведущей причиной смерти в группе основных онкологических заболеваний; за ним следуют рак прямой кишки, печени, молочной железы и желудка (L. Lin et al., 2021; Sung et al., 2021; WHO | World Health Organization, n.d.). В последнее время отмечается снижение летальности от онкологических заболеваний, что связано с внедрением методов ранней диагностики и новых способов лечения.

К основным методам лечения злокачественных опухолей в настоящее время относятся: хирургическое лечение, лучевая терапия, химиотерапия, гормональная терапия, иммунотерапия, терапия таргетными препаратами и фотодинамическая терапия. Нередко эти методы применяются в сочетании для полной элиминации опухолевых клеток. Хирургическое лечение заключается в удалении опухоли и зависит от её размера и степени поражения органов. При этом может удаляться часть новообразования, метастазы или опухоль полностью. Может быть удален весь орган, если имеет место большая область поражения (Z. Da Chen et al., 2021; Smolarz et al., 2022; B. Wang et al., 2024). Лучевая терапия служит для уменьшения размера опухоли и для устранения оставшихся злокачественных клеток. Она более эффективна при локализованных стадиях или при опухолях, полностью попадающих в поле воздействия гамма-лучей. Лучевая терапия может быть как внешней, так и внутренней, когда используют введение в организм различных источников излучения: капсул или жидкостей. Минусом данной терапии является то, что она может повреждать любые ткани в зоне своего действия (Koka et al., 2022; B. Wang et al., 2024; Wang and Tepper, 2021). Химиотерапия основана на циторедуцирующем действии различных химических препаратов (Behranvand et al., 2021; Nawara et al., 2021). Гормональная терапия вызывает изменения, связанные с функционированием гормонов, влияющих на разрастание опухоли (Desai et al., 2021; Mitra et al., 2022; Rozenberg et al., 2021). При иммунотерапии используются препараты, стимулирующие иммунную систему (Emens et al.,

2024; Kraehenbuehl et al., 2021; Yang et al., 2022). Таргетная терапия направлена на определенные молекулы злокачественных клеток, которые отвечают за их жизнеспособность. Такие препараты могут также повышать чувствительность клеток опухоли к лучевой терапии и химиотерапии (Glaviano et al., 2023; Labrie et al., 2022; Zeng et al., 2023). Фотодинамическая терапия включает в себя введение светочувствительных веществ, проникающих в опухолевые ткани, с последующей их активацией светом определенной длины волны. Под воздействием лазерного излучения происходит разрушение опухолевых клеток (Jiang et al., 2023; Koka et al., 2022).

Несмотря на все многообразие, современные методы лечения опухолей остаются недостаточно эффективными, что заставляет искать новые подходы и новые лекарственные средства.

Степень разработанности темы исследования

Активность человеческого организма в полной мере зависит от различных временных циклов (циркадных, сезонных, годовых и т.д.). На клеточном и молекулярном уровне это проявляется в изменениях, зависящих от времени, в сложном взаимодействии систем жизнеобеспечения клетки. Опухоль, как часть организма, следует биологическим часам, а механизмы, запущенные в опухолевых клетках, подвержены молекулярным сдвигам в зависимости от временных факторов (Shafi and Knudsen, 2019). Становится все более очевидным, что учет временной динамики молекулярных событий во всем организме, органах, тканях, опухоли и опухолевых клетках является ключом к успешной терапии различных злокачественных новообразований (Adam, 2019; Huang et al., 2023; Mazzoccoli et al., 2019; Patel and Kondratov, 2021).

Одним из эффективных терапевтических подходов при различных видах опухолей является иммунотерапия. На силу и время противоопухолевого иммунного ответа влияет сложный набор факторов окружающей среды (включая временные циклы), состояние пациента и биологические особенности самой опухоли. В этой связи была выдвинута парадигма индивидуального иммунного статуса организма как отправной точки для последующих иммунотерапевтических вмешательств (Chen and Mellman, 2017; Wang et al., 2021).

Эти новые концепции легли в основу подходов, базирующихся на хронометрической доставке терапевтических агентов к опухоли в зависимости от особенностей опухолевых и иммунных клеток, а также от иммунного статуса организма. Наиболее яркими из них являются *in situ* вакцинация (Sagiv-Barfi et al., 2018) и хронометрическая/метрономная малодозовая химиотерапия циклофосфамидом (химиотерапия на основе ММХТ ЦФ) (Cazzaniga et al., 2021; Leong et al., 2019; Muñoz et al., 2021; Simsek et al., 2019).

Традиционно при лечении онкологии применялся подход с использованием максимально переносимой дозы химиотерапевтического препарата и перерывами на восстановление. Однако у такого подхода была выявлена высокая токсичность, развитие резистентности и появление рецидивов. Метрономная химиотерапия — это альтернативный подход, представляющий собой частое и длительное применение низких доз цитотоксических препаратов без длительных перерывов в лечении. Этот подход нацелен на микроокружение опухоли и на иммунную систему (Attina et al., 2025). Доза препарата и временной интервал между введениями могут повлиять на общий исход лечения, даже при одинаковом суммарном количестве введенного препарата. Химиотерапевтические препараты при метрономной терапии могут вводиться ежедневно (циклофосфамид, 50 мг/день; распространенный эпителиальный рак яичников) (Samaritani et al., 2007), каждые два дня (винорельбин, 70 мг/м^2; метастатический рак молочной железы) (Addeo et al., 2010), каждые шесть дней (циклофосфамид, 140 мг/кг; имплантированные опухоли головного мозга на мышах SCID) (Chen et al., 2014; Wu and Waxman, 2018), каждые 7 дней (циклофосфамид, 200 мг/кг; 4T1 (рак молочной железы) и CT26 (колоректальный рак) на мышах линии BALB/c, Panc02 (рак поджелудочной железы) на мышах линии C57BL/6) (Manrique et al., 2016) и т.д. Метрономная химиотерапия обладает терапевтическими преимуществами, превосходящими те, которые наблюдаются при обычной химиотерапии в максимально переносимой дозе, и может вызывать ответы у пациентов, когда стандартная химиотерапия больше не эффективна.

Широко известные в медицинской практике вакцины могут обеспечить долгосрочную защиту и подходят для профилактики бактериальных и вирусных инфекций. Однако противораковые вакцины показали ограниченную терапевтическую эффективность, что связано с иммуносупрессией и иммунной толерантностью, обусловленной иммунноредактированием опухолевых антигенов. *In situ* вакцинация – это тип вакцинации, при котором терапевтические агенты (онколитические вирусы, агонисты толл-подобных рецепторов (TLR), химиотерапевтические препараты, облучение, ингибиторы контрольных точек, иммуномодуляторы и др.) доставляются непосредственно в очаг опухоли, при этом опухолевые клетки гибнут и в опухоли *in vivo* высвобождаются ассоциированные с опухолью антигены, что избавляет от необходимости их предварительного выделения, идентификации или очистки. Более того, *in situ* вакцины приводят к активации клеток врожденного иммунитета, таких как дендритные клетки, макрофаги и нейтрофилы, восстановлению активности Т-клеток, а также к превращению иммуносупрессивной среды опухоли в иммуностимулирующую, вызывая системный иммунный ответ и формирование иммунной памяти. Таким образом, опухоли пациентов преобразуются в источник опухолевых антигенов, которые поглощаются в локальной зоне антигенпрезентирующими клетками, такими как дендритные клетки. Дендритные клетки представляют эти антигены лимфоцитам в лимфатических узлах. Активированные наивные

CD8+ или CD4+ Т-лимфоциты распознают антигены первичной опухоли и созревают в цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты. Праймированные цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты разрушают клетки опухоли, несущие представленные антигены. Такая активность цитотоксических противоопухолевых Т-лимфоцитов препятствует метастазированию и снижает вероятность рецидивов опухоли. CD4+ Т-лимфоциты играют важную роль в координации иммунного ответа.

Учитывая вышесказанное, можно сделать вывод, что *in situ* вакцинация имеет ряд преимуществ перед обычной вакцинацией: при обычной вакцинации вводятся известные опухолеассоциированные антигены, которые могут различаться у разных пациентов или мутировать, а *in situ* вакцинация раскрывает всю гетерогенность антигенного репертуара конкретной опухоли пациента, включая неоантигены; локальное воздействие на первичную опухоль вызывает системный противоопухолевый иммунный ответ, который может уничтожать метастазы по всему организму; при *in situ* вакцинации используются агенты, которые «перепрограммируют» микроокружение опухоли с иммуносупрессивного на иммуностимулирующее; *in situ* вакцинация минимизирует токсические побочные эффекты (Giram et al., 2025; Shi et al., 2025).

В данной работе для активации адаптивного иммунного ответа будет использоваться *in situ* вакцинация на основе CpG олигонуклеотидов и антител к рецептору из семейства TNFR – OX40R (αOX40). CpG, вводимые в опухоль, активируют антигенпрезентирующие дендритные клетки (ДК) и одновременно индуцируют экспрессию OX40R на активированных эффекторных Т-лимфоцитах в микроокружении опухоли. Добавление агонистического антитела против OX40R обеспечивает развитие противоопухолевого иммунного ответа, в результате которого резорбируются отдаленные участки уже сформировавшихся опухолей.

Для активации врожденного иммунного ответа в данной работе будет использоваться *in situ* вакцинация специфическим активатором макрофагов – групп-специфическим активирующим макрофаги фактороом – GcMAF, который усиливает фагоцитарную активность макрофагов и профессиональные свойства дендритных клеток, а также способствует M1 поляризации макрофагов человека исходно M0 фенотипа.

Основной особенностью противоопухолевого действия указанных подходов является их независимость от конкретной мишени или молекулы. В результате их применения индуцируется интегральный противоопухолевый иммунитет и разрушается проопухолевая активность опухоль-ассоциированной стромы (ОАС) (Giram et al., 2025; Shi et al., 2025; Wu and Waxman, 2018). Однако данные подходы эффективны только для иммуногенных опухолей, а также при их использовании не элиминируется таргетно опухолевая стволовая клетка и не индуцируется масштабный апоптоз опухолевых клеток.

Существуют исследования, в которых предпринята попытка объединения иммунотерапии и химиотерапии в единый терапевтический подход (Liang et al., 2021; Salas-Benito et al., 2021; Zhu et al., 2021).

Иммунотерапия, активирующая иммунитет и способная повысить иммуногенность опухолей, стала одним из приоритетных методов лечения в онкологической практике. К наиболее распространённым иммунотерапевтическим методам относятся: ингибирование контрольных точек, терапия противораковыми вакцинами, терапия цитокинами, терапия модифицированными Т-лимфоцитами. Тем не менее монотерапия иммунокорректирующими техниками по-прежнему сталкивается с рядом серьёзных проблем, таких как низкий иммунный ответ, низкая инфильтрация опухоли и сложное иммуносупрессивное микроокружение опухоли (Логинова и др., 2022).

Одним из основных преимуществ цитотоксической химиотерапии перед иммунотерапией является циторедуцирующее воздействие непосредственно на опухоль и уменьшение её размеров. Как известно, опухолевые клетки являются причиной появления и развития иммуносупрессивного опухолевого микроокружения. Соответственно, при уменьшении количества опухолевых клеток снижается проопухолевая иммуносупрессивная активность опухоль-ассоциированной стромы. Более того, лечение химиотерапевтическими препаратами способно уменьшать количество клеток-иммуносупрессоров: супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) и регуляторные Т-лимфоциты (Treg), вызывая их апоптоз (Alizadeh and Larmonier, 2014). После гибели опухолевых клеток антигенпрезентирующие клетки поглощают опухолево-клеточный дебрис и представляют неоантигены опухоли иммунным клеткам (Barcelos et al., 2025).

Было сформулировано представление о том, что совмещение двух подходов в единый терапевтический режим может обладать улучшенной противоопухолевой эффективностью. Предполагалось, что для того, чтобы избежать негативных последствий такого совмещения, необходимо рассчитывать дозы, учитывать последовательность применения препаратов и составлять оптимальные схемы лечения. В научной литературе имеются данные, которые подтверждают эффективность сочетания химиотерапии и иммунотерапии. Например, показана эффективность совмещения пембролизумаба (ингибитор PD-1) с химиотерапией на основе препаратов платины при лечении аденокарциномы легких, совмещение атезолизумаба (ингибитор PD-L1) и дурвалумаба (ингибитор PD-L1) с химиотерапией на основе препаратов платины при лечении мелкоклеточного рака лёгкого (Liang et al., 2021; Salas-Benito et al., 2021; Zhu et al., 2021) и т.д.

В настоящее время опухоль рассматривается как аберрантный орган, развивающийся из популяции клеток, обладающих бесконечным пролиферативным потенциалом и

низкодифференцированным фенотипом – опухолевых стволовых клеток (ОСК) (Ефремов и др., 2019). Они являются центральными элементами развития опухолей, поэтому в ряде исследований их используют в качестве предпочтительной терапевтической мишени. В настоящее время общепринято, что ОСК представляют собой небольшую субпопуляцию опухолевых клеток и обладают всеми свойствами, характерными для клеток злокачественного новообразования: пролиферативной самодостаточностью, нечувствительностью к антипролиферативным сигналам, изменениями в ответе на стресс, способствующими общей выживаемости, перестройкой метаболизма, способностью избегать апоптоз, неограниченным репликативным потенциалом; а субпопуляция мигрирующих ОСК обладает также свойствами инвазивного роста и метастазирования (Aldoghachi et al., 2023; Oshimori et al., 2021). Этот тип клеток индуцирует интенсивный ангиогенез, ремоделирует микроокружение и воздействует на иммунную систему. Опухоль при этом чаще всего состоит из смеси ОСК и их дифференцированных потомков.

В лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН был разработан экспериментальный терапевтический подход, получивший название «Каранахан». Этот подход так же, как и вышеупомянутые техники (*in situ* вакцинация и ММХТ ЦФ), имеет хронометрический характер и состоит из привязанного к репаративному и клеточному циклам конкретной опухоли введения цитостатика циклофосфамида (ЦФ) и сложнокомпозиционного препарата двуцепочечной ДНК, состоящего из нативной и модифицированной азотистым ипритом ДНК (dsDNAmix). В результате применения нового терапевтического подхода «Каранахан» происходит уничтожение туморогенного начала в виде ОСК, при этом подавляющая масса опухолевых клеток гибнет путем апоптоза, что подтверждается фрагментацией нуклеосомной ДНК (Alyamkina et al., 2015; Potter et al., 2016b). Для данного подхода не важен иммунный статус организма и иммуногенность опухоли (Dolgova et al., 2021; Potter et al., 2018; Proskurina et al., 2021; Ruzanova et al., 2022, 2021). Было показано, что, используя различные опухолевые модели и мышей различных генетических линий, удалось достичь высокой противоопухолевой эффективности: вылечивание от 60% до 80% экспериментальных мышей (Ruzanova et al., 2022, 2021). Эффективность подхода «Каранахан» зависит от точности определения временного режима введения ЦФ и dsDNAmix и от наличия в опухоли ОСК и возможности воздействия на них.

Экспериментальный терапевтический подход «Каранахан» был успешно апробирован и показал свою эффективность на различных экспериментальных опухолевых моделях, таких как карцинома мышей Кребс-2 в солидной и асцитной форме, гепатокарцинома мышей Г-29, лимфосаркома мышей RLS, устойчивая к действию циклофосфамида, глиобластома U-87 (E.V.

Dolgova et al., 2018b; Kisaretova et al., 2020; Potter et al., 2018a, 2016b; Долгова и др., 2019; Поттер и др., 2018).

Проведя краткий общий сравнительный анализ трех новых подходов в лечении злокачественных новообразований, можно следующим образом охарактеризовать их основные векторы терапевтического воздействия. *In situ* вакцинация активирует полноценный противоопухолевый иммунный ответ через сложную сеть взаимодействий лиганд–рецептор–цитокин. Химиотерапия на основе ММХТ ЦФ в первую очередь нацелена на разрушение действия ОАС, супрессирующей иммунитет. В результате снятия опухоль-ассоциированной толерантности активируется противоопухолевая цитолитическая активность эффекторов, инфильтрирующих опухоль. Противоопухолевое действие терапевтического подхода «Каранахан» связано с необратимыми нарушениями в репаративных процессах, протекающих в опухолевых стволовых клетках после обработки кросслинкирующими цитостатиками, приводящими к аберрантному митозу и гибели неотрансформированных клеток (как стволовых, так и коммитированных) в результате активированного апоптоза.

Было показано, что *in situ* вакцинация, ММХТ ЦФ и подход «Каранахан» имеют общие характерные черты. *In situ* вакцинация и подход «Каранахан» обладают схожей терапевтической процедурой. В обоих подходах используются препараты на основе ДНК: CpG олигодезоксинуклеотид (CpG oligodeoxynucleotides – CpG ODN) и dsDNAmix, имеющие одну и ту же клеточную мишень – антигенпрезентирующие дендритные клетки. Общими чертами химиотерапии на основе ЦФ при ММХТ и подходе «Каранахан» являются сроки и дозы введения цитостатических препаратов (~200 мг/кг на 0 и 6-7 сутки при ММХТ ЦФ; суммарно 300 мг/кг в течение первых трех инъекций и 100 мг/кг на 5-9 сутки от начала терапии при применении подхода «Каранахан»), которые приводят к реполяризации ОАС и регрессии опухоли (Proskurina et al., 2021). В этом смысле ММХТ ЦФ представляет собой составную часть подхода «Каранахан».

В настоящем исследовании был осуществлен экспериментальный поиск режима совмещения подхода «Каранахан» (составной частью которого является ММХТ ЦФ) и *in situ* вакцинации, активирующей адаптивный и врожденный противоопухолевый иммунный ответ. В случае активации адаптивного иммунитета в качестве прототипа была выбрана *in situ* вакцинация с использованием антител к OX40R. В случае активации врожденного иммунитета использовался специфический активатор макрофагов GcMAF.

Мы предположили, что при объединении *in situ* вакцинации и подхода «Каранахан» помимо элиминации ОСК, индукции масштабного апоптоза опухолевых клеток и разрушения проопухолевой активности ОАС, опосредованных действием подхода «Каранахан» (ММХТ ЦФ, как составная часть подхода «Каранахан»), будет усиливаться вектор противоопухолевого

иммунного ответа, в связи с использованием вакцинирующих препаратов, направленных на активацию или врожденного, или адаптивного иммунитета. Такой режим, как предполагалось, значительно усилит эффективность противоопухолевой терапии. При этом терапевтическое воздействие будет эффективным как для слабоиммуногенных, так и для иммуногенных экспериментальных опухолей.

Цель исследования

Целью настоящей работы является определение клеточных механизмов комбинированного действия терапевтического подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации при лечении мышей с имплантированными опухолями слабоиммуногенной карциномы лёгкого Льюис и иммуногенной В-клеточной лимфомы А20; и определение безопасного и эффективного хронометрического режима объединения указанных подходов, учитывающего состояние клеточных популяций опухоль-ассоциированной стромы и периферической крови.

Задачи исследования

Для достижения указанной цели были поставлены две основные задачи, включающие экспериментальные подзадачи:

1. Определить безопасный и эффективный хронометрический режим противоопухолевого действия подхода «Каранахан» в сочетании с *in situ* вакцинацией активатором системы клеток врожденного иммунитета GcMAF на модели слабоиммуногенной карциномы лёгкого Льюис.

1.1. Детектировать в опухоли наличие стволовых опухолевых клеток. Проанализировать длительность цикла репарации межцепочечных сшивок в опухолевых клетках, время синхронного накопления опухолевых клеток в G2/M фазе клеточного цикла и перехода в G1 фазу. На основании полученных временных параметров разработать режим обработок экспериментальных мышей с имплантированной карциномой Льюис цитостатиком циклофосфамидом и препаратом dsDNAmix согласно подходу «Каранахан».

1.2. Оценить эффективность противоопухолевого действия разработанного режима согласно подходу «Каранахан» на модели карциномы Льюис *in vivo* и охарактеризовать связанную с ним активацию популяций клеток врожденного и адаптивного иммунитета, определяющих развитие противоопухолевого иммунного ответа.

1.3. На модели карциномы Льюис определить безопасный и эффективный режим комбинированного применения подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации препаратом GcMAF *in vivo*, при котором в дополнении к основным терапевтическим эффектам подхода «Каранахан» –

эрадикации опухолевых стволовых клеток и активации противоопухолевого иммунитета, препарат GcMAF будет оказывать влияние на функциональное состояние макрофагов – их активацию и противоопухолевую поляризацию в направлении M1 провоспалительного фенотипа.

2. Определить безопасный и эффективный хронометрический режим противоопухолевого действия подхода «Каранахан» в сочетании с *in situ* вакцинацией с использованием антител к OX40R, активирующих систему клеток адаптивного иммунитета, на модели иммуногенной В-клеточной лимфомы A20.

2.1. Детектировать в опухоли наличие стволовых опухолевых клеток. Проанализировать длительность цикла репарации межцепочечных сшивок в опухолевых клетках, время синхронного накопления опухолевых клеток в G2/M фазе клеточного цикла и перехода в G1 фазу. На основании полученных временных параметров разработать режим обработок экспериментальных мышей с имплантированной лимфомой A20 цитостатиком циклофосфамидом и препаратом dsDNAmix согласно подходу «Каранахан».

2.2. Оценить эффективность противоопухолевого действия разработанного режима согласно подходу «Каранахан» на модели лимфомы A20 *in vivo* и охарактеризовать его влияние на функциональное состояние клеток миелоидного ряда в периферической крови экспериментальных мышей.

2.3. На модели лимфомы A20 определить безопасный и эффективный режим комбинированного применения подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации с использованием антител к OX40R *in vivo*, при котором в дополнении к основному терапевтическому эффекту подхода «Каранахан» – эрадикации опухолевых стволовых клеток, будет активироваться адаптивное звено противоопухолевого иммунитета.

Научная новизна

В настоящей работе предложена концепция объединения в одну противоопухолевую терапию нескольких новых техник, основанных на хронометрическом введении лекарственных средств, каждая из которых имеет свою терапевтическую мишень и механизм действия (Proskurina et al., 2021). Были выбраны разработанный в лаборатории терапевтический подход «Каранахан», ММХТ ЦФ и техника *in situ* вакцинации. За основу новой терапевтической платформы был предложен подход «Каранахан», в результате применения которого происходит эрадикация ОСК, активируется масштабный апоптоз опухолевых клеток и индуцируются противоопухолевые иммунные реакции (Alyamkina et al., 2015; Dolgova et al., 2013, 2014; Potter et al., 2016b, 2018; Ruzanova et al., 2022). ММХТ ЦФ подавляет проопухолевые свойства ОАС: приводит к ингибированию регуляторных Т-лимфоцитов, клеток-супрессоров миелоидного ряда

и переходу опухоль-ассоциированных макрофагов из иммуносупрессивного М2-подобного фенотипа в иммуностимулирующий М1-подобный фенотип; оказывает антиангиогенное действие; препятствует эпителиально-мезенхимальному переходу (Bravetti et al., 2023; Zhong et al., 2020). Кроме того, ММХТ ЦФ является составной частью подхода «Каранахан», где объединяющим является хронометрический принцип введения терапевтических агентов (Doloff et al., 2014; Jordan and Waxman, 2016; Manrique et al., 2016; Moskalenko et al., 2015; Wu and Waxman, 2014). В качестве аддитивного/синергичного подхода была выбрана *in situ* вакцинация, представляющая собой процедуру активации иммунитета при локальных инъекциях агентов (Huppert and Daud, 2022; Li et al., 2020; Mao et al., 2020; Marabelle et al., 2017; Sagiv-Barfi et al., 2018).

В работе удалось объединить терапевтические эффекты противоопухолевых подходов, имеющих разные механизмы воздействия на опухоль, и была создана новая платформа терапии злокачественных опухолей, в результате применения которой разрушаются ключевые биологические свойства опухоли, определяющие её устойчивость к лекарственной терапии. В результате применения подхода «Каранахан» эрадицировались ОСК и дополнительно активировался масштабный апоптоз опухолевых клеток как в случае слабоиммуногенной карциномы лёгкого Льюис, так и в случае иммуногенной В-клеточной лимфомы А20. Более того, терапевтический подход «Каранахан», обладая свойствами метрономной малодозовой химиотерапии, разрушал проопухолевые свойства ОАС. Объединение подхода «Каранахан» с техникой *in situ* вакцинации в её двух вариантах дополнительно сопровождалось активацией врожденного (GcMAF) и адаптивного (αOX40) противоопухолевого иммунного ответа.

Таким образом, в исследовании были получены результаты, позволяющие констатировать тот факт, что существует принципиальная возможность создания новой терапевтической платформы лечения злокачественных новообразований на основе объединения режимов рассматриваемых походов. Оказалось, что основным вопросом объединения является корректировка режимов введения агентов относительно гуморального фона опухоль-ассоциированной стромы, а также относительно количества цитотоксических фагоцитов (зрелые макрофаги и нейтрофилы), появляющихся в периферической крови в результате применения подхода «Каранахан».

Теоретическая и практическая значимость

В настоящем исследовании была экспериментально показана возможность объединения двух противоопухолевых подходов – «Каранахан» и *in situ* вакцинации, основанных на хронометрическом введении лекарственных препаратов, в единую терапевтическую платформу с достоверным усилением противоопухолевого эффекта по сравнению с использованием

указанных терапий по отдельности. Полученные данные подтверждают и усиливают концептуальную возможность эффективной комбинации химиотерапии и иммунотерапии (Liang et al., 2021; Salas-Benito et al., 2021; Zhu et al., 2021).

Найдены условия и режимы, позволяющие эффективно вылечивать экспериментальных мышей от скоротечных, считающихся неизлечимыми, карциномы лёгких Льюис и В-клеточной лимфомы А20, которые могут быть использованы в качестве прототипов при разработке протиовоопухолевой терапии у человека.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный режим совместного использования сложнокомпозиционного препарата двуцепочечной ДНК (dsDNAmix) и цитостатика циклофосфамида, привязанный к времени репарации межцепочечных сшивок в ДНК опухолевых клеток и их синхронизации в G2/M фазе (подход «Каранахан»), приводит к индукции лизиса опухолевых клеток и развитию иммунного ответа – у мышей с карциномой лёгкого Льюис в опухоли увеличивается количество хелперных Т-лимфоцитов и снижается число супрессорных клеток миелоидного происхождения, в крови увеличивается количество NK (natural killer)-клеток; у мышей с В-клеточной лимфомой А20 в крови увеличивается количество гранулоцитов и моноцитов, несущих на своей поверхности Fc- и OX40-рецепторы, в гранулоцитах индуцируется механизм программируемой клеточной гибели с выбросом экстраклеточных ДНК-ловушек – нетоз (neutrophil extracellular traps).
2. У мышей с имплантированной опухолью слабоиммуногенной карциномы лёгкого Льюис сочетанное использование подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации активатором системы клеток врожденного иммунитета GcMAF усиливает противоопухолевый эффект – влияя на уровень экспрессии генов противо- и провоспалительных факторов TGF-β1, Arg1 и NOS2, изменяет функциональный фенотип опухоль-ассоциированных макрофагов с М2 проопухолевого на М1 противоопухолевый.
3. У мышей с иммуногенной В-клеточной лимфомой А20 противоопухолевый эффект совместного введения циклофосфамида и dsDNAmix, индуцирующих массовый выход цитотоксических фагоцитов в кровоток, и антител к OX40-рецептору, активирующих систему клеток адаптивного иммунитета, реализуется только при введении антител в момент минимального содержания фагоцитов с фенотипом CD11b+Ly-6C+/Ly-6G+ в периферической крови.

Структура и объем работы

Настоящая работа состоит из разделов: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, общее заключение по работе, выводы, список литературы и приложения. Список литературы включает 462 источника. Диссертация изложена на 239 страницах, содержит 26 рисунков, 4 таблицы и 6 приложений.

Личный вклад автора

Оценка основных параметров терапевтического подхода «Каранахан» для обеих опухолевых моделей была проведена лично автором. Экспериментальная оценка эффективности подхода «Каранахан», сравнение его эффективности с подходом *in situ* вакцинации с использованием активатора макрофагов GcMAF и антител к OX40R и эксперименты по объединению двух терапевтических подходов на мышиных моделях опухолей проводились автором совместно с сотрудниками лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН. Поиск и характеристика условий проявления противоопухолевых свойств препарата GcMAF было проведено автором совместно с Кирикович С.С. и Левитесом Е.В. Оценка развития иммунного ответа, индуцированного проведенным лечением согласно подходу «Каранахан» и подходу «Каранахан» в сочетании с *in situ* вакцинацией препаратом GcMAF, у мышей с карциномой лёгкого Льюис проводилась автором совместно с Проскуриной А.С. Поиск временного режима введения антител αOX40 на фоне использования подхода «Каранахан» проводился автором совместно с Богачевым С.С. Анализ и осмысление полученных результатов были проведены автором совместно с научным руководителем диссертации – Богачевым С.С.

Публикации и апробация результатов

Результаты данной работы были представлены и обсуждены на 58-й Международной научной студенческой конференции (Новосибирск, Россия, 2020); 59-й Международной научной студенческой конференции (Новосибирск, Россия, 2021); 60-й Международной научной студенческой конференции (Новосибирск, Россия, 2022); VIII молодежной школе-конференции по молекулярной биологии и генетическим технологиям Института Цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия, 2022); I Международном конгрессе «Новейшие достижения в области медицины, здравоохранения и здоровьесберегающих технологий» (Кемерово, Россия, 2022); XX Всероссийской молодёжной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, Россия, 2023); X Международной конференции молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов (Кольцово, Новосибирская область, Россия, 2023).

Материалы диссертации представлены в девяти публикациях в российских и зарубежных рецензируемых журналах из списка ВАК, входящих в международные базы цитирования (WOS, Scopus):

1. Проскурина А.С., **Рузанова В.С**., Тыринова Т.В., Струнки Д.Н., Кирикович С.С., Риттер Г.С., Ефремов Я.Р., Богачев С.С. Основы механизма развития противоопухолевого иммунитета при *in situ* вакцинации. Журнал Сибирского федерального университета. Биология. 2020; 13(3): 235-269. DOI: 10.17516/1997-1389-0326. Scopus.

2. Кирикович С.С., Левитес Е.В., Долгова Е.В., Проскурина А.С., Риттер Г.С., **Рузанова В.С.**, Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Останин А.А., Рябичева Т.Г., Рыжикова С.Л., Дружинина Ю.Г., Вараксин Н.А., Черных Е.Р., Богачев С.С. Влияние GcMAF-RF на *ex vivo* поляризацию макрофагов, активацию дендритных клеток и продукцию цитокинов клетками цельной крови человека. Медицинская иммунология. 2021; 23 (2): 257-274. DOI: 10.15789/1563-0625-EOM-2132. Scopus.

3. **Ruzanova V.S.**, Proskurina A.S., Ritter G.S., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Naprimerov V.A., Dolgova E.V., Potter E.A., Kirikovich S.S., Levites E.V., Mustafin Z.S., Lashin S.A., Burakova E.A., Stetsenko D.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Experimental comparison of the *in vivo* efficacy of two novel anticancer therapies. Anticancer Research. 2021; 41(7): 3371-3387. DOI: 10.21873/anticanres.15125. WOS, IF 1,8.

4. Proskurina A.S., **Ruzanova V.S.**, Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Theoretical premises of a “three in one” therapeutic approach to treat immunogenic and non-immunogenic cancers: a narrative review. Translational Cancer Research. 2021; 10(11): 4958-4972. DOI: 10.21037/tcr-21-919. WOS, IF 2,1.

5. **Ruzanova V.**, Proskurina A., Efremov Y., Kirikovich S., Ritter G., Levites E., Dolgova E., Potter E., Babaeva O., Sidorov S., Taranov O., Ostanin A., Chernykh E., Bogachev S. Chronometric administration of cyclophosphamide and a double-stranded DNA-mix at interstrand crosslinks repair timing, called “Karanahan” therapy, is highly efficient in a weakly immunogenic Lewis Carcinoma model. Pathology and Oncology Research. 2022; 28: 1610180. DOI: 10.3389/pore.2022.1610180. WOS, IF 2,7.

6. Dolgova E.V., Kirikovich S.S., Levites E.V., **Ruzanova V.S.**, Proskurina A.S., Ritter G.S., Taranov O.S., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Analysis of the biological properties of blood plasma protein with GcMAF functional activity. International Journal of Molecular Sciences. 2022; 23(15): 8075. DOI: 10.3390/ijms23158075. WOS, IF 5,6.

7. **Ruzanova V.S.**, Kirikovich S.S., Levites E.V., Proskurina A.S., Dolgova E.V., Ritter G.S., Efremov Y.R., Dubatolova T.D., Sysoev A.V., Koleno D.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R.,

Bogachev S.S. The macrophage activator GcMAF-RF enhances the antitumor effect of Karanahan technology through induction of M2–M1 macrophage reprogramming. Journal of Immunology Research. 2024; 2024: 7484490. DOI: https://doi.org/10.1155/2024/7484490. WOS, IF 3,2.

8. Kirikovich S.S., Levites E.V., Proskurina A.S., Ritter G.S., Peltek S.E., Vasilieva A.R., **Ruzanova V.S.**, Dolgova E.V., Oshihmina S.G., Sysoev A.V., Koleno D.I., Danilenko E.D., Taranov O.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. The molecular aspects of functional activity of macrophage-activating factor GcMAF. International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24(24): 17396. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms242417396. WOS, IF 5,6.

9. **Vera Ruzanova**, Anastasia Proskurina, Genrikh Ritter, Evgeniya Dolgova, Sofya Oshikhmina, Svetlana Kirikovich, Evgeniy Levites, Yaroslav Efremov, Oleg Taranov, Alexandr Ostanin, Elena Chernykh, Nikolay Kolchanov, Sergey Bogachev. The synergistic antitumor effect of Karanahan technology and *in situ* vaccination using anti-OX40 antibodies. Oncology Research. 2025; 33(5): 1229–1248. DOI: https://doi.org/10.32604/or.2025.059411. WOS, IF 4,6.

Также по тематике диссертации опубликован патент на изобретение:

1. Патент № 2837589 от 02.04.2025 (заявка № 2024106957 от 14.03.2024). Способ лечения распространенного рака молочной железы в терминальной стадии прогрессии. Маркина В.А., Проскурина А.С., Рузанова В.С., Риттер Г.С., Долгова Е.В., Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ошихмина С.Г., Ефремов Я.Р., Верещагин Е.И., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Сидоров С.В., Богачев С.С. Патентообладатели – Зайцева Инга Николаевна, Богачев Сергей Станиславович.

С использованием режима воздействия «Каранахан» было проведено пилотное клиническое исследование персонифицированной химиотерапии рака молочной железы малыми дозами циклофосфана с учетом репаративного цикла опухолевых клеток (Протокол № 7 заседания Ученого совета ФГБНУ «Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ) от 15 октября 2019 года, протокол № 120 заседания локального этического комитета при НИИФКИ от 7 ноября 2019 года).

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность коллективу лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН за доброжелательную атмосферу, поддержку и готовность всегда прийти на помощь. Все работники лаборатории в той или иной степени принимали участие в выполнении работ, представленных в диссертации, и являются соавторами полученных результатов и опубликованных статей. Автор выражает особую благодарность научному руководителю – д.б.н. Богачеву Сергею Станиславовичу – за неоценимую помощь на всех этапах работы: за постановку задач и планирование хода экспериментов, постоянное внимание, ценные

советы, конструктивную критику, терпение, и, наконец, за то, что он привил искренний интерес к науке. Автор выражает глубокую признательность члену-корреспонденту РАН, профессору, д.м.н. Черных Елене Рэмовне и профессору, д.м.н. Останину Александру Анатольевичу за обсуждение концепции и дизайна исследования. Автор выражает искреннюю благодарность академику РАН, профессору, д.б.н. Колчанову Николаю Александровичу за научное консультирование и помощь при подготовке диссертации к защите. Автор выражает особую благодарность к.б.н. Ефремову Ярославу Рейнгольдовичу и Беловежец Татьяне Николаевне за помощь в проведении проточной цитометрии, к.б.н. Байбородину Сергею Ивановичу за анализ клеток путем конфокальной микроскопии, Таранову Олегу Святославовичу за патоморфологический анализ тканей и органов, Дубатоловой Татьяне Дмитриевне за анализ мазков опухоли. Автор выражает благодарность к.б.н. Мустафину Захару Сергеевичу и д.б.н. Лашину Сергею Александровичу за подсчет индексов indLast для двух типов опухолей с целью построения шкалы иммуногенности.

Исследования, проведенные в данной работе, были поддержаны бюджетным проектом No. FWNR-2026-0025.

Обзор литературы

Злокачественные опухоли занимают одну из лидирующих позиций в списке заболеваний человечества с высокой долей неизбежной летальности. По этой причине новые прорывные технологии, направленные на лечение пациентов со злокачественными новообразованиями, находятся в области повышенного общественного интереса, и их удачное применение имеет глубокий социальный резонанс. Очевидно, что появление новых подходов в терапии злокачественных новообразований связано с глубоким пониманием всех аспектов биологии опухоли, представляющей собой естественную, интегрированную часть организма. Единственной надзирающей системой организма, контролирующей развитие новообразования и способной противостоять развитию очага опухоли, является иммунная система. К сожалению для человека, опухоль обладает способностью изменять свойства иммунной системы, направляя её активность на поддержание собственного опухолевого гомеостаза, что приводит к развитию иммунологической толерантности и способствует прогрессии заболевания.

Основная задача настоящего исследования заключается в сравнении терапевтической эффективности и определении аддитивного/синергичного противоопухолевого действия двух новейших противоопухолевых подходов, появившихся в 21 веке, один из которых связан с активацией противоопухолевого иммунитета при *in situ* вакцинации, а второй основывается на эрадикации опухолевых стволовых клеток (ОСК) и индукции тотального апоптоза опухолевых клеток, происходящих в результате совместного действия малодозового циклофосфамида и сложнокомпозиционного препарата двуцепочечной ДНК – dsDNAmix (экспериментальный терапевтический подход «Каранахан»). В этой связи при анализе литературных источников основное внимание было уделено различным аспектам противоопухолевого иммунитета и биологии ОСК.

В первой части настоящего обзора литературы обобщены знания о взаимодействии опухоли и иммунной системы. Охарактеризованы популяции клеток, инфильтрирующие опухоль. Рассмотрены иммунные механизмы надзора за развивающимся очагом новообразования и механизмы, благодаря которым опухоль может избегать иммунного надзора.

Во второй части дается характеристика ОСК и обосновывается возможность влияния на них в качестве мишеней таргетной терапии.

В третьей части анализа литературы дается подробная характеристика новейшим принципам противоопухолевого воздействия, которые по своей сути являются идеологическим основанием подходов, основная концепция которых связана с хронометрированием терапии по

различным признакам опухолевых или иммунных клеток и оценке иммунного статуса организма (терапевтический подход «Каранахан», ММХТ ЦФ, *in situ* вакцинация).

И, наконец, приводится теоретическое обоснование возможности объединения подходов новой парадигмы хронометрического локального воздействия на опухоль на фоне генерализованного циторедуцирующего воздействия в единую платформу лечения злокачественных новообразований.

Часть 1. Опухоль и иммунная система, «баланс сил»

1. Фазы взаимодействия опухоли и иммунной системы

Известно, что иммунная система способна распознавать злокачественные клетки и запускать различные реакции, приводящие к их разрушению и элиминации опухолевой ткани. В свою очередь опухоль способна активно противодействовать иммунной атаке.

Существует три фазы взаимоотношений между опухолью и иммунной системой, которые в большинстве случаев коррелируют со стадиями заболевания: элиминация (elimination), равновесие (equilibrium) и ускользание (escape), которые в англоязычной литературе обозначают, как «три E» (Kroemer et al., 2024; Zingoni et al., 2024).

Первая фаза характеризуется тем, что появляются единичные опухолевые клетки, которые распознаются и уничтожаются врожденным (естественные киллеры (NK-клетки), естественные киллерные Т-лимфоциты (NKT-клетки), γδТ-лимфоциты, макрофаги, гранулоциты) и адаптивным иммунитетом (дендритные клетки (ДК) при контактном и дистантном взаимодействии с хелперным Т-лимфоцитом (Th) и последующая активация иммунитета).

Вторая фаза характеризуется увеличением объема опухолевой массы (интенсивный рост опухоли и активация ангиогенеза), где канцерогенез превалирует над защитными процессами. В течение этой фазы происходит селекция клеток опухоли, обладающих сниженной иммуногенностью, которым удается избежать иммунного контроля.

Для фазы ускользания характерен дисбаланс эффекторных и супрессорных иммунокомпетентных клеток, что вызывает местную или системную иммунодепрессию. При этом увеличивается доля незрелых ДК и супрессорных регуляторных Т-лимфоцитов (Treg). Появляются дефекты в механизмах распознавания, презентации антигена Т-лимфоцитам и передачи сигнала внутрь клетки. Регуляция продукции цитокинов сдвигается в сторону иммуносупрессии (Nishikawa and Miyazono, 2024).

Тем не менее, несмотря на многочисленные механизмы, формирующие иммунологическую толерантность, иммунная система обладает способностью распознавать злокачественное новообразование. Главным условием, определяющим возможность иммунного разрушения опухоли, является снятие иммунологической толерантности и активация всех звеньев противоопухолевого иммунного ответа. Необходимым условием определения опухоли как мишени для активированных иммунных клеток является появление опухолевых антигенов (АГ), несвойственных нормальной клетке, возникших при злокачественной трансформации. Основной причиной появления нехарактерного антигенного репертуара являются активно проходящие процессы генетических и эпигенетических изменений при злокачественном перерождении (Andersen, 2022; Emilius et al., 2024; Finn, 2017).

Взаимодействие между опухолью и иммунной системой представляет собой сложный процесс обоюдного влияния, в котором в подавляющем большинстве случаев «побеждает» опухоль. Тем не менее существуют условия, при которых может развиться системный иммунитет, в результате чего опухоль будет полностью уничтожена (Prokopeva et al., 2024; Sagiv-Barfi et al., 2018).

2. Две составляющие противоопухолевого иммунитета

Иммунный ответ организма на возникшую опухолевую ткань складывается из немедленного лизиса неотрансформированных клеток активированными клетками врожденного иммунитета и отсроченного противоопухолевого цитолитического действия АГ-специфических CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов (адаптивный иммунитет) (Anderson and Simon, 2020; Yi et al., 2023). Проблема первичной атаки опухоли клетками врожденного иммунитета заключается в том, что в тот же самый момент времени, когда система клеток врожденного иммунитета начинает «осознавать врага» и запускает арсенал цитолитических механизмов, нарождающийся опухолевый очаг формирует специфическую противоиммунную платформу, состоящую из гуморального вектора, индуцирующего немедленную проопухолевую поляризацию инфильтрирующих опухоль иммунных клеток и блокирующего миграцию активных иммунных клеток в очаг опухоли (Cardoso et al., 2021; Hinshaw and Shevde, 2019; Wegiel et al., 2018). Также в неотрансформированных клетках запускаются эпигенетические преобразования, формирующие новый молекулярно-функциональный статус опухолевой клетки, позволяющий избегать активной атаки иммунными клетками (Cao and Yan, 2020; Ilango et al., 2020). По-видимому, начало взаимодействия возникшей опухоли и организма характеризуется разрушением большого количества опухолевых клеток системой клеток врожденного иммунитета и связанным с этим массированным высвобождением опухолевых АГ. Одновременно в опухоли индуцируются механизмы ускользания от иммунного надзора и формируется опухоль-ассоциированная строма (ОАС). В индуцированном противостоянии часть опухолевых клеток, включая ОСК, сохраняется. Именно у оставшихся после первичной иммунной атаки неотрансформированных клеток появляется способность контролировать противоопухолевую активность иммунных клеток за счет проопухолевой поляризации и формирования супрессорной активности у клеток ОАС.

Все фазы развития первичного противоопухолевого иммунного ответа имеют многочисленные векторы активации, включающие взаимодействие различных типов клеток, взаимодействие специфических рецепторов и их лигандов, секрецию растворимых молекул, создающих гуморальный фон, поддерживающий развивающийся иммунный ответ. Именно активность системы клеток врожденного иммунитета и первичный лизис неопластических

клеток являются первопричиной индукции адаптивного специфического противоопухолевого иммунитета (Hu et al., 2022; R. Wang et al., 2024; Yi et al., 2023).

Адаптивная ветвь иммунитета развивается спустя определенное время и зависит от презентации образовавшихся в результате первичного лизиса опухолевых клеток антигенов опухоли антигенпрезентирующими клетками (АПК) в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC). В ходе развития адаптивного иммунитета происходит созревание антигенпрезентирующих ДК и активация макрофагов, презентация антигена или *in situ*, или после миграции фагоцитов в периферические лимфоузлы, прайминг Т-лимфоцитов, формирование цитотоксических Т-лимфоцитов, а также активация В-лимфоцитов и антителообразование (Labani-Motlagh et al., 2020). Такая форма противоопухолевого ответа предполагает, что две дополняющих друг друга системы действуют на опухоль: это система клеток врожденного иммунитета и система клеток приобретенного иммунитета.

3. Врожденный противоопухолевый иммунитет. Механизмы киллинга клеток опухоли и типы клеток врожденного иммунитета, осуществляющих литическую функцию по отношению к неотрансформированной клетке

Появление антигенного репертуара, который далее приведет к развитию адаптивного иммунного ответа, возможно только в случае лизиса опухолевых клеток в первичном очаге опухоли. Специфическое разрушение опухолевых клеток будет определяться клетками врожденного иммунитета, обладающими арсеналом литических механизмов. К таким механизмам можно отнеси прямую цитолитическую активность NK-клеток, NKT-клеток, макрофагов, нейтрофилов, ДК, CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов и апоптоз, индуцируемый через систему рецепторов смерти. Производным механизмом лизиса клеток опухоли является осуществляемый NK-клетками и некоторыми другими клетками врожденного иммунитета антителозависимый лизис.

Принципиально существует три варианта разрушения клеток, происходящего за счет активности иммунной системы: 1) прямой осмотический лизис, который характерен для системы комплемента (Fishelson and Kirschfink, 2019); 2) некротический лизис, который развивается при секреции галогенов и их производных, токсичных соединений азота и кислорода макрофагами и нейтрофилами (Kovaleva et al., 2022; Yee and Li, 2021); 3) запуск регулируемого апоптоза или некроза (Ahmed and Tait, 2020; Yu et al., 2022). Имеются два основных пути реализации клеточной цитотоксичности, связанной с индукцией апоптоза: перфорин-зависимый и Fas-зависимый механизмы лизиса. В общих чертах эти процессы описаны в следующих параграфах (Proskurina et al., 2020).

3.1. Перфорин-зависимый механизм лизиса

Этот механизм лизиса реализуется после распознавания антигена клетки-мишени клеткой-киллером. Формируется прочный контакт клетки-киллера с клеткой-мишенью или при участии специфических иммунных комплексов (например, NKG2D/MICA, MICB), или при взаимодействии других лиганд-рецепторных пар (например, LFA/ICAM-1) (Fan et al., 2021; X. Zhang et al., 2020). Происходит реорганизация цитоплазматических гранул и компонентов цитоскелета клеток-киллеров, вследствие чего содержимое гранул выходит в зону межклеточного контакта. Освободившийся из гранул перфорин (в присутствии ионов кальция) активируется и полимеризуется. Через сформированную пору в клетку-мишень проникают гранзимы, представляющие собой сериновые протеазы. Гранзимы активируют систему каспаз, которые являются исполнительным механизмом запуска процесса апоптоза (Tuomela et al., 2022).

3.2. Fas-зависимый механизм лизиса. Система рецепторов смерти

Практически все клетки организма, за исключением клеток иммунопривилегированных тканей, CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток, имеют в составе цитоплазматической мембраны Fas-рецепторы (FasR) или объединенные в одно семейство, схожие структурно и функционально, TNF-α-рецепторы (TNFR) (Salomon, 2021; Sarabia-Sánchez et al., 2024). Эти рецепторы называются рецепторами клеточной смерти и представляют собой связанные с мембраной белки. Для всех рецепторов смерти существуют свои лиганды, связь с которыми запускает внутриклеточные механизмы или апоптоза, или клеточного спасения. Охарактеризованы следующие рецепторы смерти и их лиганды, посредством которых индуцируется апоптоз клеток: FasR/FasL, TNFR1/TNF-α, TRAIL-R1, TRAIL-R2/TRAIL и DR3/TL1A (Tummers and Green, 2022).

Для системы рецепторов смерти описан принципиально один механизм индукции апоптоза с некоторыми незначительными различиями. Начало развития апоптотического каскада происходит при физическом взаимодействии рецептора смерти и его лиганда. В результате конформационных изменений молекулы рецептора и следующей за этим активации системы каспаз, передающей апоптотический сигнал, активируется специфический ДНКазный комплекс CAD/ICAD. Запускается апоптотическое разрушение клетки (Tuomela et al., 2022). Для запуска апоптоза FasR/FasL и TNFR1/TNF-α комплексы должны интернализоваться. Ассоциация TRAIL-R1, TRAIL-R2/TRAIL и DR3/TL1A индуцирует апоптотический каскад без интернализации комплекса во внутренние компартменты клетки. TRAIL-R3 и TRAIL-R4 участвуют в запуске антиапоптотической программы (Мисюрин, 2015).

Различные типы клеток врожденного иммунитета способны осуществлять первичный лизис опухолевых клеток. В следующих разделах обзора будет предпринята попытка ответа на

вопрос: какие инициирующие молекулы и клеточные взаимодействия из известных являются первопричиной инициации развития процесса такого лизиса (Proskurina et al., 2020).

3.3. Иммунные клетки, инфильтрирующие опухоль

NK-клетки. Антителозависимый лизис

NK-клетки представляют собой систему клеток врожденного иммунитета, которые обладают способностью к контактному цитолизу клеток-мишеней. Кроме того, эти клетки в ответ на активирующий или ингибирующий сигнал секретируют множество цитокинов и хемокинов, которые влияют на другие системы клеток врожденного иммунитета – макрофаги, ДК, нейтрофилы, участвуя тем самым в акселерации петли активации врожденного иммунитета и активации адаптивного иммунного ответа (Cózar et al., 2021).

NK-клетки на своей поверхности экспрессируют множество важных маркеров, таких как CD11b и NKp46. CD11b является важным маркером созревания NK-клеток. Было показано, что NK-клетки можно разделить на две популяции: $CD11b^{lo}$ и $CD11b^{hi}$. NK-клетки $CD11b^{hi}$ были значительно более зрелыми, чем NK-клетки $CD11b^{lo}$. Кроме того, большинство NK-клеток и некоторые врождённые лимфоидные клетки экспрессируют активирующий рецептор NKp46. Блокировка NKp46 препятствует уничтожению NK-клетками многих опухолевых клеток. Таким образом, мышиные NK-клетки обладают фенотипом CD3–NKp46+CD11b+ (Hu et al., 2020; Sen Santara et al., 2023).

Литическая функция NK-клеток реализуется тремя литическими механизмами: с участием экзоцитируемых азурофильных гранул (Huang et al., 2024), при непосредственном контакте (FasL, TRAIL и др.) с рецепторами смерти на поверхности клеток-мишеней (Bakhtiyaridovvombaygi et al., 2024) и с использованием механизма антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (C. Zhang et al., 2020). В результате активации нескольких литических механизмов формируется синергичный независимый киллинг опухолевых клеток-мишеней через разные активирующие молекулярные пути.

NK-клетки имеют несколько механизмов распознавания клеток-мишеней, в том числе опухолевых клеток. Существует общепринятая концепция, что в основе клеточного распознавания мишеней и цитолитической активности NK-клеток лежит принцип «утраты своего» (missing self) (Polidoro et al., 2020). Картина представленных на цитоплазматической мембране молекул главного комплекса гистосовместимости I класса (MHCI) и их количество распознается NK-клетками (семейство KIR рецепторов, CD94/NKG2A, другие лектиноподобные белки С типа). Сдерживание литической активности NK-клеток связано с взаимодействием KIR или CD94/NKG2A ингибирующих рецепторов с белками MHCI (Cózar et al., 2021). Если при контактном взаимодействии клетки-киллера и клетки-мишени, осуществляемом за счет других рецепторов, количество белков MHCI соответствует опознаваемой NK-клетками «норме», то

лизиса клетки не происходит. Если количество или характерный паттерн MHCI белков не опознается NK-клетками, то реализуется цитолитическая активность естественного киллера. Опухолевые клетки несут на своей цитоплазматической мембране незначительное количество белков MHCI, что делает их главной мишенью цитолитической функции NK-клеток (Zhang et al., 2024).

В трансформированных клетках постоянно активированы сигнальные каскады, сообщающие клетке о многочисленных разнообразных нарушениях клеточного метаболизма. В норме при таких обстоятельствах через систему p53 запускается апоптоз и клетка лизируется. В случае опухолевых клеток система p53 инактивирована и апоптоз не происходит. Тем не менее сигналы о нарушениях продолжают возникать и поддерживать системы клеточного наблюдения. Такая перманентная стресс-активация приводит к синтезу и экспрессии на поверхности опухолевых клеток стресс-индуцированных молекул MICA и MICB, относящихся к семейству неканонических молекул гистосовместимости MHC класса Ic. Экспонирование этих белков на поверхности цитоплазматической мембраны предшествует появлению в клетке антигена, не зависит от него и является наиболее ранней манифестацией трансформированной клетки (D. R. Wang et al., 2024). Представленные на поверхности стресс-индуцированные молекулы опознаются NKG2D рецептором NK-клетки, который индуцирует цитолиз клетки-мишени (Coënon et al., 2024). То есть опухолевые клетки, на которых экспрессированы стресс-индуцированные молекулы, могут подвергаться лизису независимо от количества молекул MHC класса Ia и Ib. Однако, если клетка-мишень, тем не менее, экспрессирует значительное количество молекул MHCI, то они распознаются ингибиторными рецепторами, сигналы которых блокируют активацию и развитие иммунных реакций. Таким образом, для активации цитолитической активности NK-клеток важен баланс между активационными и ингибирующими сигналами (принцип «наличия или отсутствия»).

Основой феномена «неоднозначности» в принятии решения NK-клетками лизировать клетку-мишень или нет является тот факт, что сигнальные молекулы, определяющие передачу активационного и ингибиторного сигналов, на этапе «принятия решения» одни и те же и полярность сигнала определяется их статусом фосфорилирования. Проведение активирующего сигнала запускается фосфорилированием сигнальных молекул при связывании активирующих рецепторов. При связывании ингибиторных рецепторов происходит дефосфорилирование тех же самых сигнальных молекул, что приводит к отмене активирующего сигнала (Imširović et al., 2024).

NK-клетки имеют еще один универсальный механизм распознавания клеток-мишеней – ADCC. ADCC представляет собой механизм, посредством которого эффекторные клетки, несущие на своей поверхности Fc-рецепторы (FcR, например, CD16), могут опознавать и

лизировать покрытые антителами таргетные клетки, экспонирующие на своей поверхности опухолевые или патоген-ассоциированные антигены (Bakhtiyaridovvombaygi et al., 2024). Необходимо отметить, что киллинг опухолевых клеток по механизму ADCC также реализуется при активации нейтрофилов и макрофагов (Habib et al., 2024; R. Wang et al., 2024).

Проведенный анализ предполагает, что начало литического процесса опухоли и его дальнейшее развитие в первую очередь принадлежит именно NK-клеткам. Апоптотически разрушенные опухолевые клетки образуют совокупность опухолевых антигенов, которые могут поглощаться расположенными в непосредственной близости в опухолевом очаге активированными АПК, что сопровождается развитием адаптивного иммунного ответа (Proskurina et al., 2020).

Макрофаги

Макрофаги относятся к системе клеток врожденного иммунитета и также являются популяцией клеток, немедленно реагирующей на раздражитель в виде трансформированных клеток. Тем не менее эти фагоцитирующие клетки первоначально должны быть активированы. Активация макрофагов осуществляется активированными Th1 при физическом контакте клеток или паракринно цитокинами. Активация макрофагов на уровне транскрипции генов наблюдается через час после добавления к культуре клеток активирующего коктейля цитокинов, а начало секреции активных молекул происходит через 24 часа инкубации. Полная активация макрофагов, происходящая вследствие поглощения комплекса антиген-антитело через Fc-фрагмент/Fc-рецептор взаимодействие, занимает от одного до нескольких (5-7) дней после первого контакта с антигеном. Эти факты предполагают, что макрофаги начинают активное цитолитическое действие во втором эшелоне активации противоопухолевого врожденного иммунного ответа (Cherdyntseva et al., 2017; Никонова и др., 2017).

Выделяют два основных фенотипа макрофагов: M1/провоспалительный (противоопухолевый) и M2/противовоспалительный (проопухолевый). Макрофаги выполняют в организме множество функций, что обусловлено их функциональной гетерогенностью и высокой пластичностью. Пул резидентных макрофагов может пополняться за счет дифференцировки циркулирующих моноцитов при их попадании в ткани из кровотока. Макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) являются основными регуляторами дифференцировки моноцитов в макрофаги. При этом M-CSF стимулирует дифференцировку моноцитов в макрофаги, характеризующиеся M2/противовоспалительным фенотипом (про-M2 клетки), тогда как GM-CSF индуцирует дифференцировку моноцитов в макрофаги с M1/провоспалительным фенотипом (про-M1 клетки) (Goswami et al., 2021; He and Zhang, 2021).

Известно, что макрофаги, инфильтрирующие опухоль, поляризуются в проопухолевые макрофаги М2 фенотипа и функционируют как супрессоры Т-лимфоцитов. Это означает, что опухоль-ассоциированные макрофаги М2 фенотипа (ТАМ2) с малой долей вероятности принимают участие в формировании первой волны опухолевых антигенов (Sami and Raza, 2024).

Классически активированные макрофаги относятся к противоопухолевым клеткам М1 фенотипа, способным разрушать опухолевые клетки. Предполагается, что активированные периферические макрофаги М1 фенотипа, впервые попавшие в опухолевый очаг, но не ТАМ2 фагоциты, могут принимать участие в первичном лизисе опухолевых клеток до момента их проопухолевой реполяризации. При таких условиях опухоль-ассоциированные макрофаги М1 фенотипа (ТАМ1 макрофаги) могут участвовать в образовании первой волны опухолевых антигенов (Liu et al., 2021; Proskurina et al., 2020).

Описан путь активации макрофагов, связанный с гликозидазной активностью «воспаленных» Т- и В-лимфоцитов, который определяется превращением белка, связывающего витамин D3 (DBP), в групп-специфический активирующий макрофаги фактор (GcMAF) (Greilberger and Herwig, 2020; Ostanin et al., 2019). Гликозилированный DBP содержит один трисахарид в позиции 420 остатка треонина, состоящий из N-ацетилгалактозамина с двумя разветвленными остатками сахаров галактозы и сиаловой кислоты. Известно, что в зоне воспаления (опухолевый очаг характеризуется постоянно текущим воспалительным процессом) на цитоплазматической мембране активированных воспалительным процессом В- и Т-лимоцитов экспонируются ферменты β-галактозидаза и сиалидаза, соответственно. В результате сайт-специфического двойного дегликозилирования DBP конвертируется в GcMAF, содержащий остаточный сахар N-ацетилгалактозамин (GalNAc) (Bouillon et al., 2020).

Можно предположить, что секретируемые медиаторы воспаления индуцируют выход на цитоплазматическую мембрану лимфоцитов специфических гликозидаз, и что этот процесс является более ранним событием в активации лимфоцитов по сравнению с их антигензависимой активацией. В работах Yamamoto и его команды (Homma and Yamamoto, 1990; Yamamoto and Kumashiro, 1993; Yamamoto et al., 2008) было показано, что культивирование Т- и В-лимфоцитов в течение 30 минут в присутствии синтетического аналога мембраносвязанных фосфолипидов додецилглицерола приводит к способности этих клеток конвертировать DBP в GcMAF. При этом сам процесс активации макрофагов «воспаленными» Т- и В-лимфоцитами занимает в эксперименте 1-2 часа. Это означает, что постоянно находящийся в плазме крови DBP может быть «немедленно» конвертирован в GcMAF специфическим дегликозилированием. Этот процесс может составлять основу первичного лизиса опухолевых клеток макрофагами, активированными таким путем.

Известно, что различные типы клеток, включая опухолевые, экспрессируют на своей поверхности CD1d молекулы главного комплекса гистостовместимости. CD1d молекулы имеют гидрофобную антигенсвязывающую бороздку, способную селективно «заякоривать» процессированные гликолипидные антигены (East et al., 2014; Webb et al., 2016; Zajonc and Girardi, 2015; Акинфиева и др., 2010). Для клеток опухоли показана повышенная экспрессия CD1d на цитоплазматической мембране, которая связана с изменениями метаболизма клетки (Subrahmanyam et al., 2014; T. J. Webb et al., 2016). В некотором смысле можно считать, что CD1d, с повышенной эффективностью экспрессирующийся на поверхности трансформированной клетки, является еще одним стресс-сигналом, маркирующим опухолевую клетку. Именно липидные антигены в составе CD1d, контактируя с Т- и В-лимфоцитами, могут являться «спусковым механизмом» для появления на поверхности инфильтрирующих опухоль Т- и В-лимфоцитов специфических гликозидаз и следующей за этим конверсии DBP в GcMAF и активации макрофагов. В эксперименте, как было сказано выше, этот процесс занимает 1-2 часа и при экстраполяции на условия *in vivo* может считаться немедленным ответом врожденной иммунной системы на стимул. Именно таким образом активированные макрофаги могут входить в группу клеток, участвующих в появлении первой волны антигенов опухолевых клеток. Следует отметить, что активированные таким образом макрофаги осуществляют свои профессиональные функции, в частности фагоцитоз, используя FcR-опосредованный механизм (Xiao et al., 2024).

Макрофаги способны лизировать клетку многими описанными для других цитотоксических клеток механизмами (FasL/FasR, TRAIL/TRAILR, TNF-α/TNFR, ADCC). Тем не менее считается, что одним из основных механизмов цитотоксичности макрофагов является индукция апоптоза или некроза клетки-мишени секретируемыми макрофагами продуктами перекисного окисления, оксидом азота (NO) и свободными формами кислорода (Zafrilla et al., 2022).

Нейтрофилы

Нейтрофилы – это еще один тип клеток иммунной системы, которые инфильтрируют опухоль и обладают цитолитической активностью. Они могут осуществлять лизис, используя механизм дегрануляции азурофильных и специфических гранул. Также нейтрофилы секретируют цитокины, и в том числе TNF-α, индуцирующий апоптоз опухолевых клеток через систему рецепторов смерти. Ключевая роль в литической активности нейтрофилов отводится секретируемым ими активным формам кислорода и азота, а также галогенов, включая гипохлорную кислоту (Curi et al., 2020; Y. J. Lin et al., 2021; Poto et al., 2022).

Фагоцитоз уже разрушенных опухолевых клеток или опухолевых клеток, опсонизированных антителами, при взаимодействии с FcR нейтрофилов, приводит к активации

фагоцитов. Лизис опухолевых клеток сопровождается нарастающим увеличением количества антигенного материала в опухолевом очаге (Antuamwine et al., 2023).

Следует отметить, что такая цитотоксическая активность нейтрофилов характерна только для опухоли на начальных этапах развития. Это связано с тем, что развивающаяся опухоль инициирует быструю TAN2 проопухолевую реполяризацию TAN1 опухоль-реактивных нейтрофилов (TAN – опухоль-ассоциированные нейтрофилы). И, таким образом, на более поздних стадиях развития опухоли нейтрофилы, инфильтрирующие неопластический очаг, проявляют проопухолевую активность. Такие нейтрофилы представляют собой часть популяции супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) ОАС (Antuamwine et al., 2023; Baci et al., 2020; Poto et al., 2022; Лисяный и Лисяный, 2018)

В настоящее время установлено, что MDSC (для мышиной модели) представлены двумя наиболее многочисленными популяциями: гранулоцитарная, или полиморфноядерная фракция MDSC, несущая маркеры CD11b+Ly-6G+Ly-6C^{low} и морфологически схожая с нейтрофилами; и моноцитарная, несущая маркеры CD11b+Ly-6G–Ly-6C^{high} и морфологически схожая с макрофагами. Характерной особенностью обеих популяций клеток является супрессия иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль. Основной мишенью супрессии являются Т-лимфоциты. Супрессия осуществляется различными механизмами и зависит от различных факторов, включая CD62-ADAM17 и Gal-9-TIM-3-взаимодействие, аргиназу 1, iNOS, TGF-β, IL-10, COX-2, VEGF, индоламин-2-3-диоксигеназу (IDO) (Haist et al., 2021; Hegde et al., 2021; Wang et al., 2020).

Проведенный анализ предполагает, что активированные TAN1 так же, как и макрофаги в случае их первичного попадания в опухолевый очаг, могут принимать участие в первичном лизисе опухолевых клеток (Proskurina et al., 2020).

NKT-клетки

Этот тип клеток относится к классу лимфоцитов, экспрессирующих маркеры NK-клеток (CD16, CD56) и Т-лимфоцитарные дифференцировочные антигены (CD3, CD4, CD8). NKT-клетки экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR), который участвует в распознавании липидных антигенов, связанных с молекулой гистосовместимости CD1d, экспрессирующейся на антигенпрезентирующих макрофагах, ДК, В-лимфоцитах. Показано, что CD1d может сверхэкспрессироваться на поверхности опухолевых клеток, что отражает изменение клеточного метаболизма. Это означает, как уже было отмечено, что CD1d может представлять собой еще один стресс-сигнал, свидетельствующий о трансформированности клетки (Bayatipoor et al., 2022; Brettschneider and Terabe, 2021; Burks et al., 2022).

Стимуляция NKT-клеток происходит при связывании их TCR с CD1d. Стимулированные NKT-клетки в течение 1-2 часов начинают активную секрецию цитокинов IFN-γ и TNF-α. Такой

быстрый ответ на стимул, по-видимому, связан с присутствием предшественников цитокинов в инфламмасомах до активации клеток. Считается, что NKT-клетки вносят минимальный вклад в прямой лизис клеток опухоли. Основное действие этого типа клеток связано с активной продукцией цитокинов, действующих как стимулирующий сигнал для активации NK-клеток и CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов (Nelson et al., 2021).

Имеются данные о прямой цитолитической активности NKT-клеток в отношении TAM2 и MDSC, инфильтрирующих опухоль. Этот факт означает, что NKT-клетки могут опосредованно, через уменьшение числа TAM2 и MDSC, влиять на опухоль. Также этот факт может означать, что при определенных условиях в отношении неопластических клеток может осуществляться прямая цитолитическая активность NKT-клеток (Almeida et al., 2023; Nelson et al., 2021; Proskurina et al., 2020).

Цитотоксическая активность ДК

Наряду с классическими эффекторными клетками (NK-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты), киллерной активностью против опухолевых клеток-мишеней обладают ДК. CD80 является одним из маркеров созревания ДК, а CD83 считается маркерной молекулой для идентификации зрелых ДК. Таким образом, ДК обладают следующим фенотипом: CD80+CD83+ (Liedtke et al., 2020; Wu et al., 2020).

На сегодняшний день цитотоксическая функция продемонстрирована для различных типов ДК (миелоидных ДК, в том числе и клеток Лангерганса, плазмоцитоидных ДК, ДК моноцитарного происхождения), хотя механизмы её реализации и биологическая значимость остаются во многом неизученными. Как и классические эффекторные клетки, ДК экспрессируют медиаторы грануло-опосредованной цитотоксичности: перфорин и гранзим Б; а также молекулы семейства TNF (TRAIL, FasL, TNF-α), опосредующие рецептор-зависимую цитотоксичность (Monti et al., 2024, 2020).

Показано, что ДК обладают прямым цитолитическим действием против различных опухолевых линий, осуществляемым через механизмы запуска апоптоза. Установлено, что медиаторами цитотоксической активности являются незрелые ДК, при этом в процессе созревания их цитотоксическая активность снижается или полностью исчезает. Можно предположить, что именно незрелые ДК (входящие в популяцию инфильтрирующих опухоль MDSC) выполняют функцию киллерных клеток, которые лизируют опухолевую клетку (Plesca et al., 2022).

Таким образом, ДК также можно отнести к популяции клеток, инфильтрирующих опухоль, от активности которых зависит появление первых опухоль-ассоциированных антигенов, требующихся в качестве материала для развития системного иммунного ответа. Логично предположить, что лизис, осуществляемый этими клетками, сопровождается

немедленным поглощением ими материала разрушенных клеток опухоли непосредственно в месте произошедших деструктивных событий. Нагруженные антигеном зрелые ДК промотируют активацию и экспансию антиген-специфичных Т-лимфоцитов (Lucarini et al., 2021; Proskurina et al., 2020).

Цитокины и их роль в инициирующих событиях и поддержании первичного иммунного ответа

В конце проведенного анализа необходимо кратко определить положение цитокиновой поддержки при «завязке» противоопухолевого иммунного ответа в опухолевом очаге при условии активации киллерных функций иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль. Клетки секретируют цитокины в небольшом объёме опухолевого очага, что позволяет непрерывно поддерживать их высокую локальную концентрацию. Это создает условия для длительного поддержания иммунных клеток в активном состоянии. Одновременно при активации на цитоплазматической мембране инфильтрирующих опухоль иммунных клеток экспрессируются многочисленные специфические рецепторы или их лиганды, а также рецепторы к различным цитокинам. То есть клетка готова в любом формате отвечать на специфическое взаимодействие с агонистами.

Активированные иммунные клетки, инфильтрирующие опухоль, секретируют в очаге опухолевого роста практически всю известную палитру цитокинов, хемокинов и факторов роста, которые создают гуморальный фон перманентного самоподдержания их активного состояния. Четыре из них формируют базовые векторы поддержания иммунных реакций клеток иммунной системы, инфильтрирующих опухоль. Это IFN-γ, TNF-α, IL-12 и IL-2.

IFN-γ прямо стимулирует клетки иммунной системы, такие как макрофаги и NK-клетки, повышает синтез молекул белков MHC классов I и II и активирует иммунопротеасомы. Высокий уровень молекул MHCII обеспечивает презентацию процессированных антигенов, включая опухолевые антигены, Th1-клеткам. Th1, в свою очередь, выделяют цитокины, которые координируют активность других клеток иммунной системы (Du et al., 2021; Poncette et al., 2022).

TNF-α и его рецепторы формируют сигнальную систему широкого спектра действия, включая регуляцию врожденного и адаптивного иммунного ответа. TNF-α индуцирует активацию нейтрофилов, макрофагов, ДК, а также их хемотаксис. В макрофагах и нейтрофилах под влиянием TNF-α повышается образование активных форм кислорода, которые вызывают деструкцию мембран и гибель клетки-мишени по механизму некроза (Laha et al., 2021).

IL-12 является важным иммунорегулирующим цитокином, который продуцируют АПК. Секреция IL-12 регулирует врожденный иммунный ответ и определяет развитие адаптивного иммунного ответа (Mirlekar and Pylayeva-Gupta, 2021).

IL-2 имеет важное значение для появления и развития иммунного ответа. Этот цитокин индуцирует пролиферацию В-лимфоцитов, активирует цитотоксические Т-лимфоциты и макрофаги, стимулирует NK-клетки (Muhammad et al., 2023; Niederlova et al., 2023).

Первичная реакция клеток иммунной системы на распознавание неопластических клеток заключается в секреции воспалительных цитокинов, ключевыми из которых являются IFN-γ и TNF-α. Макрофаги в ответ на распознавание опухолей секретируют TNF-α, а при активном фагоцитозе спектр цитокинов, продуцируемых макрофагами, увеличивается и включает в себя продукцию IL-12, IL-1, IL-6, IL-8, IFN-γ, CSF. NK-клетки, Т-лимфоциты и NKT-клетки в результате активации секретируют IFN-γ. IFN-γ стимулирует дозревание ДК, активирует макрофаги и CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты. Зрелые ДК начинают секрецию IL-12, который, в свою очередь, стимулирует продукцию IFN-γ и IL-2. Это в совокупности дополнительно стимулирует киллерные системы иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль.

Таким образом, для цитокинов начальной фазы развития иммунного ответа характерно взаимоактивирующее и взаимоусиливающее действие. Последующие цитокиновые каскады в той или иной степени унифицированы и связаны с цитокинами, определяющими формирование базовых векторов поддержания иммунных реакций инфильтрирующих опухоль клеток. IFN-γ активирует клетки, которые начинают секретировать TNF-α, и, наоборот, TNF-α создает условия для миграции в данную область клеток, способных секретировать IFN-γ. IL-12 и IL-2 усиливают синтез TNF-α и IFN-γ и стимулируют продукцию этих цитокинов в неактивированных клетках (Guglielmo et al., 2024; Yi et al., 2024).

В такой стохастической неопределенности создается взаимосвязанная самоподдерживающаяся гуморальная сеть, в которой происходят процессы, связанные с межклеточным взаимодействием и направленные на киллинг трансформированных клеток.

Дополнительно необходимо упомянуть о роли системы толл-подобных рецепторов (TLR) в событиях активации противоопухолевого иммунного ответа. Известно, что эта группа рецепторов может экспрессироваться как иммунными, так и опухолевыми клетками. При активации TLR клетки начинают секретировать различные цитокины и кофакторные молекулы. Стимуляция TLR, экспрессируемых иммунными клетками, является одним из терапевтических подходов, используемых для усиления противоопухолевой активности клеток врожденного иммунитета (например, CpG). При стимуляции TLR, экспрессируемых клетками опухоли, наблюдается активация пролиферации, развитие устойчивости к химиотерапии и увеличение общей выживаемости опухолевых клеток. Это означает, что для формирования устойчивого противоопухолевого ответа необходимо создание условий для смещения баланса в направлении активации иммунных клеток опухолевой стромы в противовес супрессорной активности клеток опухоли (Pahlavanneshan et al., 2021; Proskurina et al., 2020).

Лимфоциты

Среди лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, определяются CD3+CD4+ хелперные (Th), CD3+CD8+ цитотоксические и другие популяции Т-лимфоцитов, а также В-лимфоциты. Существует два типа хелперных CD4+ клеток: Th1 и Th2. Th1 стимулируют обучение цитотоксических Т-лимфоцитов и индуцируют реакцию гиперчувствительности замедленного типа, стимулируя макрофаги в опухолевых очагах. Th2 обеспечивают формирование плазматических клеток, продуцентов антител к антигенам опухолевых клеток. CD3+CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты представляют собой адаптивное звено иммунного ответа и осуществляют прямой антигензависимый лизис опухолевых клеток. CD3+CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты могут уничтожать клетки-мишени тремя основными способами: 1) лизируют таргетные клетки перфорин/гранзим-опосредованным путем; 2) индуцируют апоптоз клетки-мишени взаимодействием FasL на поверхности цитотоксического Т-лимфоцита и FasR клетки-мишени; 3) секретируют растворимые медиаторы, такие как IFN-γ и TNF-α, которые играют значительную роль в разрушении клеток. Цитотоксические Т-лимфоциты, благодаря продукции IFN-γ, могут индуцировать секрецию клетками стромы антиангиогенных факторов, которые блокируют васкуляризацию опухоли (Basu et al., 2021; Butcher and Zhu, 2021; Crispin and Tsokos, 2020; Sanchez-Ruiz et al., 2021).

Около 5-10% от числа CD3+CD4+ клеток приходится на угнетающие иммунные реакции регуляторные Т-лимфоциты (Treg), которые характеризуются экспрессией CD25 и FOXP3 (Tay et al., 2023). Эти клетки могут влиять на иммунные клетки тремя разными путями. За счет секреции определенных цитокинов они подавляют функции эффекторных клеток, осуществляют прямое цитотоксическое разрушение иммунных клеток и ингибируют созревание дендритных клеток, которые необходимы для презентации антигенов и инициации иммунного воспаления (Proskurina et al., 2020; Scott et al., 2021).

4. Активация адаптивного иммунитета

Возможность проявления адаптивного иммунного ответа и развития адаптивного противоопухолевого иммунитета связана с генетическими и эпигенетическими изменениями, характеризующими опухолевую трансформацию. Опухолевые клетки экспрессируют ряд генов, молчащих в здоровых клетках, их белковые продукты могут быть распознаны Т- и В-клеточными рецепторами, как чужеродные. Все эти антигены можно разделить на 3 группы: продукты онкогенов и других генов, поддерживающих злокачественный фенотип опухолевых клеток; антигены, происходящие из молекул, создающих селективное преимущество для опухолевой клетки; антигены, появляющиеся в результате нестабильности генома опухолевой клетки и опухолевой катаплазии (являются следствием, а не причиной злокачественности). Эти опухоль-ассоциированные антигены могут быть: уникальными, которые появляются в результате

специфической одиночной клеточной мутации; общими для многих опухолей близкого гистогенеза; тканеспецифическими; общими для опухолей и нормальных тканей, но присутствующими в опухолевых клетках в больших количествах (Chong et al., 2021; Emilius et al., 2024).

Адаптивный иммунный ответ на опухолевые антигены, появившиеся в результате литической активности клеток врожденного иммунитета, развивается в результате тесной кооперации антигенпрезентирующих ДК, макрофагов, Th и наивных CD8+ Т-лимфоцитов. Процессинг и презентация активированными ДК множеству индивидуальных Т-лимфоцитов исчерпывающего репертуара индивидуальных опухолевых антигенов означает, что формируется всевозможное разнообразие Т-лимфоцитов с уникальной антигенной специфичностью. Миграция активированных эффекторных Т-лимфоцитов в периферическое русло и закрепление в паренхиме селезенки, формирование в селезенке герминативных центров, пролиферация киллерных перфорин+гранзим+ клонов Т-лимфоцитов и их распространение по организму составляют основу адаптивного иммунного ответа. Вследствие такого продолжения первичной активности клеток врожденного иммунитета происходит генерализация иммунного ответа и антиген-опосредованный специфический лизис клеток опухоли (Jhunjhunwala et al., 2021; Del Prete et al., 2023).

Для полноценного развития адаптивного противоопухолевого иммунного ответа необходимо созревание АПК, в результате которого происходит усиление презентации антигенов, и миграция ДК из опухоли в регионарные лимфатические узлы. Для созревания АПК требуется участие TNF-α и других цитокинов, синтезируемых макрофагами и незрелыми Т-лимфоцитами. При созревании в клетке активируется транскрипционный фактор NF-κB, приводящий к синтезу и секреции определенного набора цитокинов, которые позволяют активировать наивные Т-лимфоциты, стимулируя их развитие в функциональные CD4+ или CD8+ Т-лимфоциты (Barnabei et al., 2021).

В результате развития адаптивного иммунного ответа формируются два типа клеток, обеспечивающих лизис опухоли: CD4+ хелперные и CD8+цитотоксические Т-лимфоциты. Основными клеточными эффекторами адаптивного иммунитета являются цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты, опосредующие лизис опухолевых клеток при взаимодействии TCR и опухолевого антигена. Цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты секретируют IFN-γ, рецептор к которому находится на клетках опухолевой стромы. Продукция IFN-γ цитотоксическими Т-лимфоцитами приводит к усилению кросс-презентации опухолевых антигенов в эндотелии стромы и индуцирует уничтожение опухолевых клеток за счет активации FasR. Кроме того, секретируемый Т-лимфоцитами IFN-γ активирует макрофаги ОАС (Aichele et al., 2022; Jorgovanovic et al., 2020).

В формировании адаптивного иммунитета ведущую роль играет МНС. Белки МНС подразделяются на два класса: МНСI имеются на поверхности почти всех ядерных клеток организма, МНСII имеются только на поверхности клеток иммунной системы. Именно молекулы МНС обеспечивают связь между Т-лимфоцитами и АПК в процессе формирования иммунного ответа. После фагоцитоза и процессинга антигенов антигенные эпитопы презентируются Т-лимфоцитам в комплексе с белками МНС (праймирование). Презентация может происходить как в активированных, так и в неактивных АПК, разница заключается лишь в том, что в первых блокируется уход комплекса МНС с пептидом с клеточной поверхности, а во вторых поддерживается рециркулирование молекул МНС. Презентация опухолевых антигенов происходит как через МНСII (основной путь презентации экзогенных антигенов), так и через МНСI (в норме презентируют эпитопы белков, синтезируемых в самой клетке) – процесс, известный как кросс-презентация (Jhunjhunwala et al., 2021; Pishesha et al., 2022).

Известно, что молекулы МНС класса I выполняют функцию рецепторов для CD8+ Т-лимфоцитов, в то время как молекулы МНС класса II выполняют ту же функцию для CD4+ Т-лимфоцитов (Barbosa et al., 2021; Ishina et al., 2023). Таким образом, АПК способны активировать CD4+ хелперные Т-лифоциты, которые принимают участие в регуляции иммунного ответа: они распознают пептиды в комплексе с молекулами МНСII и получают дополнительные сигналы от АПК, которые определяют вектор дальнейшей дифференцировки хелперного Т-лимфоцита по Th1 или Th2 пути; и CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты, которые распознают пептиды в комплексе с молекулами МНСI и способны лизировать клетки-мишени при помощи секреции перфорина и гранзима.

Взаимодействие наивных Т-лимфоцитов с соответствующей по специфичности антигенной детерминантой и костимулятором B7, представленными на поверхности АПК (для CD8+ Т-лимфоцитов это макрофаги), инициирует полноценный синтез и секрецию IL-2, который аутокринным способом стимулирует наивные Т-лимфоциты к пролиферации и дифференцировке. По окончании пролиферативной фазы Т-лимфоцитов, длящейся 4-5 дней, они дифференцируются в зрелые эффекторные Т-лимфоциты, которые способны синтезировать все белки, необходимые для выполнения специализированных функций. В результате дифференцировки наивных Т-лимфоцитов в зрелые эффекторные клетки они приобретают способность непосредственно действовать на чужеродные клетки без использования каких-либо костимуляторов, благодаря количественному и качественному изменению состава молекул на своей поверхности (Gaudino and Kumar, 2019; Hilligan and Ronchese, 2020). Во-первых, завершившие дифференцировку Т-лимфоциты характеризуются усилением экспрессии на своей поверхности молекул LFA-1 и CD2, которые обеспечивают более эффективное их взаимодействие с адгезивными молекулами ICAM и LFA-3, обильно представленными на поверхности

макрофагов, что необходимо для клеточного контакта и праймирования. Кроме того, усиление экспрессии молекул LFA-1 и CD2 особенно важно для цитотоксических Т-лимфоцитов, нуждающихся для проявления своей активности в непосредственном контакте с опухолевыми клетками-мишенями (носителями антигенных детерминант), также несущих на свой поверхности интегрины ICAM (Broere and Van Eden, 2019; Tai et al., 2018).

В-лимфоциты также являются клетками адаптивного иммунитета и представляют собой антителосинтезирующие клетки. Активированные CD4+ Th2 секретируют IL-4 и IL-13, стимулируя антигенпрезентирующую активность В-лимфоцита. Антиген, образованный в результате первичного лизиса опухолевых клеток, проникает в крово- или лимфоток, доходит до лимфатических узлов, где распознается В-клеточными рецепторами (BCR) резидентных В-лимфоцитов. Комплекс BCR-антиген интернализуется и антиген подвергается лизосомальной переработке. В это время на поверхности В-лимфоцита начинает экспрессироваться белок CD40, который является рецептором костимуляции. Процессированный антиген в комплексе с молекулами MHCII презентируется на поверхности В-лимфоцита, где может быть распознан CD4+ Th2, активированными АПК. Распознавание специфичного антигена приводит к костимуляции при взаимодействии CD40R с его лигандом CD40L. Контактная костимуляция поддерживается цитокинами IL-4 и IL-10, секретируемыми Т-лимфоцитами. В результате произошедших событий В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, которые производят антитела (Cyster and Allen, 2019; Hong et al., 2018). При участии антител осуществляется важнейший механизм реализации противоопухолевого эффекта – ADCC. В результате связывания Fab-фрагмента антитела с клеткой-мишенью эффекторные клетки (NK-клетки, гранулоциты, макрофаги) осуществляют цитолиз мишени, связываясь с Fc-фрагментом того же антитела. Одной из ключевых функций В-клеточного адаптивного иммунитета является формирование иммунологической памяти в виде В-клеток памяти, которые сохраняются в костном мозге и обеспечивают быстрое появление высокой концентрации специфических антител при повторном обнаружении патогена (Rastogi et al., 2022).

5. Механизмы ускользания неотрансформированных клеток и опухоли в целом от иммунологического надзора

Главным положением теории противоопухолевого иммунитета является существование системы иммунологического надзора, благодаря которой иммунная система обладает способностью распознавать и разрушать опухолевые клетки, играя важную роль при возникновении, развитии, прогрессии злокачественного заболевания и при образовании метастазов (Leon et al., 2021; Saadh et al., 2024). На первом этапе часть опухолевых клеток при взаимодействии с иммунными клетками элиминируется. На втором этапе сохранившиеся опухолевые клетки претерпевают последующее генетическое перерождение и замещаются

генетически трансформированными клонами. Трансформированные клоны опухолевых клеток возникают в процессе иммунологического редактирования – процесса отбора клеток опухоли, устойчивых к действию иммунной системы, дающего низкоиммуногенные клоны (Gubin and Vesely, 2022; Holmström et al., 2020). Клоны, возникшие в результате прогрессии, дают начало гетерогенной популяции злокачественных клеток, которая обеспечивает выживаемость опухоли за счет резистентности к воздействию активной иммунной системы. Именно отсутствие выраженной иммуногенности является причиной вяло текущего иммунного противоопухолевого процесса или его полного отсутствия (Huang et al., 2021).

Низкая иммуногенность опухолей обусловлена различными причинами. В первую очередь она может быть обусловлена отсутствием специфических опухолевых антигенов. Это происходит в том случае, например, если для презентации отбирается эпитоп, не содержащий мутаций, способных вызвать иммунный ответ. Дело в том, что при внутриклеточном протеолизе может произойти негативная селекция именно того пептидного участка белка, который Т-лимфоциты организма способны распознать в качестве чужеродного. Из множества фрагментов белковой молекулы протеасомальная система формирует около десяти различных пептидов подходящего размера. Затем эти сформированные фрагменты попадают в клеточные компартменты, в которых происходит сборка и загрузка молекул комплекса гистосовместимости. На следующем этапе происходит дополнительная деградация пептидных фрагментов ферментом ERAP-1. В результате только часть пептидов после деградации оказываются подходящими по размеру для дальнейшего процессинга. Встраивание пептида в молекулу МНС происходит благодаря взаимодействию его «якорных» аминокислот с участками молекулы МНС в процессе встраивания в пептидсвязывающую щель этой молекулы. Таким образом, именно определенная последовательность аминокислот в сформировавшемся пептиде определяет возможность его презентации в комплексе с молекулами МНС. В результате образуется всего лишь 2-3 пептида, которые отвечают всем критериям на каждом этапе осуществления презентации. Если эти 2-3 пептида не содержат области с мутациями, то молекула воспринимается Т-лимфоцитами как собственная (Requesens et al., 2024; Roerden et al., 2024; Shklovskaya and Rizos, 2021).

Утрата молекул комплекса гистосовместимости MHCII у АПК и аберрантная повышенная экспрессия MHCI на опухолевых клетках также являются причинами снижения иммуногенности опухоли и её ускользания от иммунологического надзора. В первом случае отсутствует адекватная презентация антигенов Т-лимфоцитам. Во втором – избыточное присутствие MHCI (HLA-I) на цитоплазматической мембране опухолевых клеток блокирует цитолитическую активность NK-клеток. Дополнительно блокирование цитолиза опухолевых клеток NK-клетками обеспечивается сбрасыванием опухолевой клеткой избытка стресс-индуцированных молекул

MICA/B (Cornel et al., 2020; Dhatchinamoorthy et al., 2021; Jhunjhunwala et al., 2021; Taylor and Balko, 2022).

Известно, что для возникновения полноценного иммунного ответа, помимо взаимодействия Т-клеточного рецептора и антигена в комплексе с молекулами гистосовместимости, необходим костимулирующий сигнал (CD28/B7/BB1) на поверхности АПК. Гуморальный фон опухоли супрессирует экспрессию костимулирующих сигналов АПК, при этом цитотоксическая активность Т-лимфоцитов в отсутствие костимуляции подавляется, и опухоль не подвергается атаке со стороны антиген-специфической иммунной системы (Verma et al., 2023).

Т-лимфоциты на своей цитоплазматической мембране несут ингибирующие их иммунную реактивность молекулы иммунных контрольных точек (checkpoint molecules): CTLA4R и PD-1R. При связывании этих молекул с соответствующими лигандами, синтезирующимися опухолевыми клетками, индуцируется анергия или лизис активированных лимфоцитов, что также приводит к ослаблению иммунного надзора за развивающейся опухолью (Kim et al., 2024).

Важнейшим, если не главным, механизмом ускользания опухоли от иммунного надзора является супрессорная активность ОАС. Опухоль инфильтрируют две популяции клеток, определяющие супрессию иммунного ответа на развивающуюся трансформированную ткань. Это супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) и регуляторные Т-лимфоциты (Treg) (Haist et al., 2021).

MDSCs, маркерами которых у мышей являются Gr1+ и CD11+, способны выделять различные вещества (CXCR1, CCR2, CXCL10, CD206, IL-1β, TNF-α, TGF-β), которые способствуют неоваскуляризации, ингибируют специфические и неспецифические ответы на опухоль, влияя на CD4+, CD8+ Т-лимфоциты и NK-клетки, блокируют созревание ДК. Иммуносупрессирующее действие этого типа супрессоров может осуществляться разными путями, включающими, например, секрецию реактивных форм кислорода, усиление катаболизма L-аргинина и триптофана за счет увеличения продукции аргиназы-1 (Arg1) и индоламин 2,3-диоксигеназы (IDO). Дефицит триптофана и аргинина замедляет Т-клеточную пролиферацию и приводит к Т-клеточной супрессии.

MDSC могут влиять на миграцию и жизнеспособность Т-лимфоцитов. CD62L является молекулой адгезии, с помощью которой наивные лимфоциты задерживаются в лимфатических узлах и дифференцируются в активные Т-лимфоциты при взаимодействии с антигеном. При расщеплении CD62R, экспрессированного на плазматической мембране супрессорных клеток, протеазой ADAM17 нарушается фиксация и последующая активация наивных Т-лимфоцитов в опухолевой строме (Giannotta et al., 2023; Haist et al., 2021; Hegde et al., 2021; Ma et al., 2021).

Регуляторные CD4+CD25+FOXP3+ Т-лимфоциты за счет мембраносвязанного и секретируемого TGF-β и системы рецепторов молекул иммунных контрольных точек и их лигандов индуцируют анергию цитотоксических Т-лимфоцитов, что прямо угнетает противоопухолевый иммунитет (Hariyanto et al., 2022).

Еще одним механизмом ускользания опухоли от иммунной системы является рецептор-лиганд взаимодействие между CD95R Т-лимфоцита и Fas/APO1/CD95L, экспрессированным на поверхности опухолевых клеток. Такой тип взаимодействия существует в иммунологически привилегированных органах и способствует передаче сигнала апоптоза Т-лимфоциту при его контакте с опухолевой клеткой (Seyrek et al., 2024).

Таким образом, согласно теории противоопухолевого иммунитета, существует система иммунологического надзора, благодаря которой иммунная система обладает способностью распознавать и разрушать опухолевые клетки. Тем не менее в опухоли отбираются клоны клеток, которые устойчивы к действию иммунной системы, что характеризуется термином «ускользание от иммунного надзора». Именно это противостояние является главной ареной действия, характеризующей взаимоотношения опухоли и иммунной системы.

Основным действующим фактором опухоли, определяющим её устойчивость к иммунному надзору, являются опухолевые стволовые клетки (ОСК), обладающие неограниченным, крайне разнообразным потенциалом противостояния надзирающей иммунной системе.

Часть 2. Характеристика опухолевых стволовых клеток, рассматриваемых в качестве мишени таргетной терапии

6. Основные гипотезы возникновения опухолей

Существует точка зрения, согласно которой опухоль рассматривается как аберрантный орган, развивающийся, как любая нормальная ткань, из стволовой клетки, которая обладает бесконечным пролиферативным потенциалом и низкодифференцированным фенотипом. При этом опухоль обладает рядом интегральных злокачественных признаков, складывающихся из свойств стволовых и коммитированных клеток. Опухоль характеризуется инвазивным ростом; в ней индуцируется интенсивный ангиогенез; происходит ремоделирование микроокружения и формируется ОАС с ярко выраженным супрессивным воздействием на иммунную систему; в опухоли происходит перестройка метаболизма с преобладанием гликолиза в опухолевых клетках (эффект Варбурга) и с формированием метаболического симбиоза с опухоль-ассоциированными фибробластами, которые вырабатывают лактат, поглощаемый опухолевыми клетками для осуществления окислительного фосфорилирования (обратный эффект Варбурга) (Benny et al., 2020; Johar et al., 2021; Mallard and Tiralongo, 2017). Лекарственная устойчивость опухоли обеспечивается с помощью развитой системы детоксикации и её способности избегать апоптоза (A. Zhang et al., 2022).

В ходе истории изучения злокачественных опухолей сложились две гипотезы об их возникновении. Модель клональной эволюции не предполагает иерархической организации опухоли. В этом случае приобретение признаков стволовости происходит стохастически вследствие генетической нестабильности неотрансформированных клеток. Другая гипотеза полагает, что опухоль развивается из однажды возникшей и размножившейся ОСК. Находясь на вершине иерархической пирамиды, эти клетки за счет различных сигнальных систем формируют эпигенетические изменения клеток опухоли, тем самым индуцируя прогрессию опухоли.

Эти гипотезы не являются взаимоисключающими, так как обе предполагают существование онкогенных клеток, однако возникает разногласие относительно того, является ли онкогенная популяция клеток в опухоли статичной и редкой и проявляет ли признаки стволовых клеток или же повышенная туморогенность является временной характеристикой конкурирующих популяций клеток (Jassim et al., 2023; Trosko, 2021).

Общепризнанной является гипотеза об ОСК, где злокачественные опухоли представляют собой иерархическую организацию из коммитированных клеток с небольшим количеством стволовых клеток на вершине этой иерархии (Mohan et al., 2021). Предположение о существовании стволовой или инициирующей опухолевой клетки было впервые выдвинуто в работах (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994), где было показано, что только

незначительное количество CD34+CD38– клеток, выделенных из крови больных лейкемией, имеют перевивочный потенциал. Остальные клетки оказались не в состоянии индуцировать развитие опухоли. В дальнейшем это предположение получило свое подтверждение в исследованиях, проведенных на опухолях различной этиологии (Collins et al., 2005; Curley et al., 2009; Dalerba et al., 2007; Eramo et al., 2008; Hermann et al., 2007; O'Brien et al., 2007; Prince et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Schatton et al., 2008; Singh et al., 2004; Wu et al., 2007; Yang et al., 2008).

Известны несколько гипотез, описывающих механизм возникновения ОСК. Очевидно, что ОСК имеют много общего с нормальными стволовыми клетками. В этой связи была высказана мысль о том, что, например, лейкемия является следствием злокачественной трансформации нормальных гемопоэтических предшественников (Chakraborty and Park, 2022). При нарушении регуляции сигнальных путей стволовые клетки становятся мишенями процесса онкогенеза, что приводит их к злокачественной трансформации.

Описан механизм *de novo* возникновения ОСК в растущей опухоли. Этот процесс, как считается, связан с активацией определенных генов коммитированных клеток опухоли в условиях гипоксии, оксидативного стресса, повышения содержания эндогенных ксенобиотиков, которые вместе называются общим понятием генерализованного клеточного стресса (Farahzadi et al., 2023). В условиях стресса активируются транскрипционные факторы SOX2, OCT4/POU5F1, Nanog, KLF4 и c-Myc, высокая активность которых может приводить к репрограммированию коммитированной опухолевой клетки в ОСК (Correnti et al., 2022; Dolgova et al., 2014; Fatma and Siddique, 2023; Potter et al., 2016a, 2016b). Это свойство опухолевых клеток не однонаправленное. Существует возможность перехода как в направлении приобретения, так и в направлении утраты стволовости. Это явление носит название «динамической стволовости» и считается, что оно обусловлено эпигенетическими изменениями (Loh and Ma, 2024; Sahoo et al., 2022).

Одним из принципиальных свойств, которое отличает злокачественные стволовые клетки от нормальных, является их «независимое» поведение от регулирующего влияния стволовых ниш. Понятие ниши стволовой клетки относится к клеточному окружению стволовой клетки, которое поддерживает баланс между промитогенными и антимитогенными сигналами и тем самым поддерживает клетки в недифференцированном состоянии, позволяет покидать нишу только коммитированным клеткам-предшественникам (Ефремов и др., 2019). Другими словами, в норме существование стволовой клетки вне стволовой ниши невозможно. Основным качеством ОСК, определяемым как злокачественность, является способность формировать и поддерживать стволовые свойства вне специфической ниши.

7. Основные характеристики опухолевых стволовых клеток

Основными «академическими» свойствами, характерными для ОСК, являются: самоподдержание в ряду неограниченного числа делений; способность производить коммитированную дочернюю клетку, обладающую высоким неконтролируемым пролиферативным потенциалом, но не способной инициировать новую опухоль; устойчивость к многократной пересадке с сохранением гистологических характеристик опухоли. ОСК способны к метастазированию. Метастазирующая клетка обладает уникальными способностями: избегает анойкис (апоптоз, вызванный неприкрепленным состоянием), вследствие чего может существовать в неприкрепленном состоянии в кровяном или лимфатическом русле; за счет секреции молекул клеточной адгезии способна существовать и пролиферировать в непривычном тканевом окружении; синтезирует и секретирует различные иммунносупрессивные медиаторы и цитокины, за счет чего избегает иммунного ответа (Fouad and Aanei, 2017; Guo et al., 2024; Kuol et al., 2017; Mohan et al., 2021; Shan et al., 2021).

Существует несколько подходов и методов идентификации ОСК.

Наиболее принятыми считаются метод лимитирующих разведений и метод формирования сфер (Bubin et al., 2023; Mai et al., 2023; Salinas-Jazmín et al., 2021). В первом случае, используя многочисленные разведения, клеточную культуру титруют до разведения, когда при пересадке трансплантата развития опухоли не происходит. Тестирование большого числа разведений в многочисленных повторах и статистическая обработка результатов позволяют выбрать образец, содержащий одну клетку с необходимым признаком. Метод формирования сфер является классическим способом определения плюрипотентной стволовой клетки, которая в полужидкой среде формирует вокруг себя сферу из клеток-потомков. Для оценки туморогенных (инициирующих) свойств полученных сфер используется их последующая трансплантация и цитологическая и биохимическая характеристика опухолевого графта.

В экспериментальной онкологической практике широко используются биохимические маркеры ОСК. К сожалению, до настоящего времени не обнаружены универсальные опухолевые маркеры. Наиболее широко распространенными являются CD133 (проминин-1), CD44 (рецептор для гиалуронана), CD166, CD34, CD38 (маркеры острого миелогенного лейкоза), CD138 (маркер для терминально дифференцированных В-лимфоцитов), CD24 (маркер фактора эпителиальной клеточной адгезии EpCAM или ESA), B5(ABCB5 ATP-связывающий белок) (Das et al., 2024; Mohan et al., 2021; Xia et al., 2022).

Еще одним подходом в выявлении ОСК является их способность выбрасывать из цитоплазмы определенные липофильные флуоресцентные красители, такие как Hoechst 33342 или родамин 123. Эта особенность позволяет не только идентифицировать стволовые клетки при проточной цитофлуориметрии, но и собирать их для различных исследований, как фракцию

неокрашенных или слабоокрашенных клеток с помощью сортировщика клеток (Quesenberry et al., 2022; Venkatachalapathy et al., 2024; J. Wang et al., 2024).

Известен подход на примере двух типов клеток MDA-MB-436 и MCF-7, позволяющий сортировать опухолевые клетки по их способности к деформации. Известно, что опухолевая клетка, обладающая инициирующими характеристиками, способна к миграции и имеет многочисленные нарушения в системах формирования актинового цитоскелета. Такие подверженные деформации клетки обладают повышенной метастазирующей способностью и способностью формировать мамосферы. Используя метод проточной селекции по деформационной способности клеток опухоли, была получена популяция клеток, обладающая характеристиками ОСК (H. Chen et al., 2022).

8. Терапевтические подходы, направленные на эрадикацию ОСК

Выявление в массе опухолевых клеток главной мишени – стволовой инициирующей опухолевой клетки – является приоритетной задачей, вслед за которой встает вопрос о том, как убить эту клетку в её естественных условиях существования.

Свойства опухолевых стволовых клеток таковы, что сложно найти действенное лечение, которое могло бы преодолеть их «видимую неубиваемость». Устойчивость опухоли обеспечивается рядом механизмов: циркулирующими опухолевыми клетками, диссеминированными опухолевыми клетками, везикулярными щитами (экзосомы опухолевых клеток обычно содержат как опухолевые антигены, так и иммуносупрессивные белки), эффектом Варбурга и системами детоксикации (Saha and Lukong, 2022; Zhou et al., 2020). Именно ОСК определяют резистентность опухоли ко многим традиционным терапевтическим воздействиям. Так показано, что ОСК рака молочной железы (РМЖ), растущие в культуре, резистентны к химиотерапевтическим агентам. Более того, в ходе исследований было обнаружено, что у женщин, страдающих РМЖ, после курса химиотерапии увеличилось количество клеток, обладающих характеристиками ОСК (Saha and Lukong, 2022; Zheng et al., 2021). Это позволяет предположить, что химиотерапия может быть менее эффективна в уничтожении ОСК по сравнению с их коммитированными потомками. Лейкемические ОСК, ОСК из поджелудочной железы и толстого кишечника также проявляют повышенную резистентность к химотерапевтическим лекарствам. Установлено, что некоторые ОСК устойчивы к радиации (Alamilla-Presuel et al., 2022; van Gils et al., 2021; Lei et al., 2021; Wang et al., 2022; Yu et al., 2021). Механизмы резистентности к лекарствам у ОСК изучены недостаточно. Известно, что детоксикация осуществляется за счет эффлюкса лекарственных препаратов или внутриклеточного метаболизма доставленных в клетку химических агентов. В ОСК избыточно экспрессируются антиапоптические белки и активны системы репарации хроматина. ОСК слабо реагирует на изменения в структуре хроматина, вызванные применением цитостатических

препаратов, что подразумевает, что для жизнедеятельности такой клетки достаточна активность крайне скудного набора генов (Francescangeli et al., 2023).

Тем не менее в клинической практике известны лекарства, которые таргетно элиминируют ОСК. Например, партенолид и рапамицин воздействуют на ОСК при острой миелоидной лейкемии (Liesveld et al., 2022; Xu et al., 2024). Темозоломид преимущественно элиминирует ОСК глиобластомы, а ОСК опухоли мозга под воздействием бевацизумаб снижают свою туморогенность (Alves et al., 2021; Khan et al., 2021). Для воздействия на ОСК острой миелоидной лейкемии также применяется препарат тиоридазина в сочетании со стандартной химиотерапией (Colturato-Kido et al., 2021). Описан подход, направленный на уничтожение ОСК с использованием генетически модифицированных бактерий (Nallar et al., 2017). Еще один способ основан на применении специфических антител H90, блокирующих CD44 на ОСК острого миелолейкоза. CD44 является ключевым регулятором, необходимым для хоуминга ОСК и их дальнейшего поддержания в недифференцированном состоянии. H90 влияет на обе функции этой молекулы, нарушая как хоуминг, так и приводя к дифференцировке лейкемических бластов и их последующей гибели. H90 блокирует хоуминг примитивных CD34+CD38– клеток как в костный мозг, так и в селезёнку, а также препятствует трансмиграции лейкемических клеток через стенки капилляров (Doustmihan et al., 2023; Yadav and Desai, 2019).

Все перечисленные подходы и способы целевого воздействия на ОСК имеют существенные недостатки, не позволяющие рекомендовать их как универсальные или близкие к универсальным подходы, направленные на удаление ОСК. Ограниченность применения этих подходов и определяющих их лекарств связана в первую очередь с их специфичностью к определенным строго детерминированным опухолям.

Часть 3. Новейшие технологии лечения злокачественных опухолей начала 21 века

В современной клинической практике за последние 20 лет появилось несколько технологий, в которых элементы иммунной системы выступают в качестве основного фактора воздействия на развивающуюся и прогрессирующую опухоль. Это специфические моноклональные антитела, активирующие/ингибирующие проведение сигнала внутрь клетки и развитие иммунного ответа; химические соединения, блокирующие сигнальные каскады и ингибирующие иерархические киназы и фосфатазы в опухолевых клетках, что приводит к запуску механизмов апоптотического саморазрушения опухолевых клеток; три новых техники, основанных на хронометрическом принципе и запускающие интегральный ответ организма и опухоли на режимы воздействия.

9. Блокирующие/активирующие моноклональные антитела, химические ингибиторы сигнальных путей и их мишени

Иммунотерапия зарекомендовала себя как эффективный терапевтический подход, вызывающий опухоль-реактивный иммунный ответ против широкого спектра злокачественных новообразований в результате специфической противоопухолевой стимуляции иммунных клеток, таких как CD4+/CD8+ Т-лимфоциты, В-лимфоцииты, макрофаги, дендритные клетки и естественные киллерные клетки (Adhikary et al., 2024).

В настоящее время доказали свою эффективность и широко распространены в клинической практике так называемые ингибиторы иммунных контрольных точек (моноклональные антитела), к которым относятся цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-4 (CTLA-4), рецептор программируемой клеточной гибели (PD-1) и его лиганд — PD-L1. Повышенная экспрессия молекул иммунных контрольных точек в микроокружении опухоли является одним из механизмов, используемых опухолевыми клетками для ускользания от активного иммунного надзора. Ингибиторы иммунных контрольных точек блокируют пути, негативно регулирующие Т-клетки. Это приводит к активации цитолитических противоопухолевых свойств Т-лимфоцитов.

CTLA-4 экспрессируется в больших количествах на начальной фазе активации Т-лимфоцитов, где он конкурирует с костимулирующим рецептором Т-лимфоцитов CD28 за связывание с CD80 и CD86 на антигенпрезентирующих клетках, посылая Т-лимфоцитам ингибирующие сигналы и предотвращая их активацию и выполнение эффекторных функций.

PD-1 экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах на более поздних стадиях иммунного ответа. PD-1 взаимодействует с PD-L1 и PD-L2, которые в большом количестве экспрессируются на поверхности опухолевых клеток многих злокачественных новообразований. Взаимодействие PD-1 с его лигандами приводит к активации тирозинфосфатазы, которая

дефосфорилирует сигнальные молекулы, расположенные ниже по направлению от Т-клеточного рецептора (TCR). Это блокирует опосредованную TCR пролиферацию Т-лимфоцитов и ослабляет реакцию Т-клеток на опухолевые клетки, позволяя неоплазии избегать воздействия иммунной системы.

В иммунотерапии опухолей ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, воздействуя на CTLA-4 или прерывая взаимодействие PD-1/PD-L1, могут восстанавливать циторедуцирующую активность цитотоксических Т-лимфоцитов, тем самым оказывая противоопухолевый эффект. Антитела, блокирующие PD-1, на сегодняшний день являются наиболее широко используемыми ингибиторами иммунных контрольных точек. К ним относятся: ниволумаб, пембролизумаб, цемиплимаб, достарлимаб, ретифанлимаб, тислелизумаб и торипалимаб. К антителам, блокирующим CTLA4, относятся два антитела: ипилимумаб и тремелимумаб.

В современной клинической практике используется подход иммунотерапии с двойной блокадой, что связано с различиями в активации иммунного ответа Т-лимфоцитов через CTLA-4 и PD-1/PD-L1. Ингибиторы CTLA-4 инициируют активацию Т-лимфоцитов, а ингибиторы PD-1/PD-L1 участвуют в реактивации эффекторных реакций на более поздних стадиях. Появление иммунотерапии с двойной блокадой позволило эффективно преодолевать иммунную толерантность опухоли (Cheng et al., 2024; Paul et al., 2024; Sultanbaev et al., 2024; S. Wang et al., 2024).

За последнее десятилетие таргетная терапия, направленная на конкретные сигнальные пути, произвела революцию в стратегиях лечения онкологических заболеваний. Фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K) и сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR являются одними из ключевых модуляторов передачи сигналов в клетке, способные активировать или регулировать важнейшие клеточные процессы, такие как рост, пролиферация, метаболизм, апоптоз и ангиогенез. Аномальная активация этого пути связана с возникновением, прогрессированием и метастазированием опухоли и имеет решающее значение для развития лекарственной устойчивости опухолевх клеток. В PI3K/Akt/mTOR сигнальном пути задействовано несколько молекул, включая рецепторную тирозинкиназу (RTK), рецепторы, сопряжённые с G-белком (GPCR), PI3K, AKT протеинкиназу, фосфоинозитид-зависимую протеинкиназу 1 (PDK1) и мишень рапамицина млекопитающих (mTOR). Аномальная активация PI3K/Akt/mTOR сигнального каскада характерна для многих неоплазий включая рак лёгких, рак желудка, колоректальный рак, рак предстательной железы и карциномы головы и шеи.

В клинической практике используют два препарата, ингибирующих сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR (одобрены FDA): эверолимус (ингибитор mTOR) и алпелисиб (ингибитор

PI3Kα), они показаны для лечения пациентов с раком молочной железы (Deng et al., 2024; Khorasani et al., 2024; Leiphrakpam and Are, 2024; Tufail et al., 2024).

10. Хронометрические подходы: ММХТ ЦФ, in situ вакцинация и терапевтический подход «Каранахан». Теоретическое обоснование возможности объединения трех современных хронометрических противоопухолевых подходов в единую терапевтическую платформу при лечении злокачественных новообразований

Как было сказано выше, в современной экспериментальной и клинической практике появилось три новых подхода к лечению опухолей различного происхождения и состояния прогрессии, основанных не на действии принципа «атакующая молекула/мишень», а на принципе интегрального ответа организма и опухоли на терапевтическую обработку, приводящую к эрадикации новообразования. Это *in situ* вакцинация, малодозовая метрономная химиотерапия циклофосфамидом (ММХТ ЦФ) и универсальный терапевтический подход «Каранахан», основанный на эрадикации ОСК опухоли. Одновременно с появлением указанных подходов оформились представления о принципиальной важности знания временных ритмов активности молекулярных процессов, протекающих в клетках организма, в различных клеточных системах, в тканях, органах, в клетках опухоли и опухоли, как отдельного аберрантного органа, то есть принципиальных мишенях воздействия терапевтических препаратов (Adam, 2019; Amiama-Roig et al., 2022; Damato and Herzog, 2022; Fagiani et al., 2022; Munteanu et al., 2024; Sancar and Van Gelder, 2021). Кроме того, сформировалась важнейшая парадигма, связанная с представлением об индивидуальном иммунном статусе организма, как точки отсчета, при лечении злокачественных новообразований иммунологическими подходами (Bruni et al., 2020; Chen and Mellman, 2017; Tan et al., 2020; Wang et al., 2021). Эти новые представления по своей сути стали идеологическим основанием указанных подходов, основная концепция которых связана с хронометрированием терапии по различным признакам опухолевых или иммунных клеток и оценке иммунного статуса системы.

Общий взгляд на принципы, использующиеся в рассматриваемых подходах, и некоторые детали проведения терапевтических мероприятий согласно выбранным технологическим режимам свидетельствуют о существовании принципиальных элементов, общих для всех указанных подходов. Этот факт предполагает существование принципиальной возможности объединения трех новейших терапий в единую терапевтическую платформу, где элементы одного подхода, направленные на разрушение опухоли, будут аддитивно/синергично усливать векторы воздействия на опухоль других подходов. И, таким образом, настоящая работа посвящена изучению возможности объединения трех современных противоопухолевых подходов, а именно ММХТ ЦФ, *in situ* вакцинации, экспериментального терапевтического

подхода «Каранахан», в единую терапевтическую платформу при лечении злокачественных новообразований.

За основу новой терапевтической платформы был выбран подход «Каранахан», в результате применения которого происходит эрадикация ОСК, активируется масштабный апоптоз опухолевых клеток и индуцируются противоопухолевые иммунные реакции. ММХТ ЦФ подавляет проопухолевые свойства ОАС и является составной частью подхода «Каранахан», где объединяющим является хронометрический принцип введения терапевтических агентов. В качестве аддитивного/синергичного подхода была выбрана *in situ* вакцинация, представляющая собой уникальную процедуру активации иммунитета при локальных инъекциях агентов. В зависимости от применяемых терапевтических веществ в данном случае может активироваться как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ.

В заключение следует отметить, что иммунотерапия с использованием активирующих/ингибирующих моноклональных антител или химических соединений, блокирующих сигнальные каскады в опухолевых клетках, требует наличия или антигена, или специфической молекулы-мишени, что является существенным ограничивающим фактором в терапии злокачественных новообразований. Для использования подхода «Каранахан» не требуется наличие любых специфических мишеней. Более того, не имеет значения иммуногенность опухоли и иммунный статус организма, что является обязательным условием эффективнсти для ММХТ ЦФ или *in situ* вакцинации (Dolgova et al., 2021; Potter et al., 2018; Proskurina et al., 2021; Ruzanova et al., 2022, 2021). Независимость подхода «Каранахан» от иммуногенности опухоли и иммунного статуса организма проверяли путем многократных экспериментов с использованием мышей различных линий и с использованием различных опухолевых моделей. Известно, что иммунный фенотип мышей значительно варьирует в зависимости от генетической линии (Gol’dberg et al., 2005). Более того, уровень иммуногенности развитого новообразования варьирует в зависимости от используемой опухолевой модели (Huang et al., 2021). Было показано, что вне зависимости от используемой линии мышей и опухолевой модели терапевтический подход «Каранахан» обладает высокой противоопухолевой эффективностью (вылечивание от 60% до 80% экспериментальных мышей) (Ruzanova et al., 2022, 2021). Такое видение проблемы позволяет уверенно говорить об универсальности подхода «Каранахан» и перспективности его применения в лечении различных онкологических заболеваний.

10.1. Краткая характеристика основных элеменов рассматриваемых подходов: ММХТ ЦФ, in situ вакцинации и экспериментального терапевтического подхода «Каранахан»

10.1.1. Хронометрическая/метрономная малодозовая химиотерапия циклофосфамидом

В последнее время уделяется много внимания способности цитостатика циклофосфамида (ЦФ) корректировать состояние иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль.

Инфильтрирующие опухоль иммунные клетки подвержены супрессии опухолью и, находясь в опухолевом очаге, не способны в полной мере выполнять свои иммунные функции. Как оказалось, цитостатик ЦФ оказывает стимулирующее действие на инфильтрирующие опухоль супрессированные иммунные клетки (Gephart et al., 2025). Прогресс в понимании действия ЦФ определился при его использовании в малодозовом метрономном режиме (хронометрическая/метрономная малодозовая химиотерапия).

ЦФ, как монопрепарат, при введении максимально переносимой дозы (150–170 мг/кг × 2-3 последовательных дня, с перерывом в 21 день) приводит к длительной редукции количества иммунных клеток в периферической крови, костном мозге и селезенке экспериментальных мышей (Wu and Waxman, 2018). Кроме того, применение ЦФ, направленное на разрушение опухолевых клеток, приводит к индукции проопухолевых свойств у ОАС, что ведет к стимуляции роста и прогрессии опухоли. Несмотря на деструктивное воздействие в основном на коммитированные опухолевые клетки, проопухолевая активность ОАС, ведущая к угнетению активности иммунных клеток, и связанное с этим длительное снижение иммунного контроля над опухолью приводят к формированию устойчивых клонов, происходящих из ОСК, которые практически не чувствительны к действию ЦФ (Alrefaei et al., 2022; El-Serafi and Steele, 2024; Motoyoshi et al., 2006; Moynihan and Cohen, 1989; Potter et al., 2016b; Salem et al., 2012). В то же время введение ЦФ как монопрепарата по малодозовой метрономной схеме (например, 140 мг/кг каждые 6 дней) оказывает стимулирующее действие на иммунные клетки и в особенности иммунные клетки, инфильтрирующие опухоль, такие как NK-клетки, NKT-клетки, ДК. Характерной для такой обработки также является смена поляризации опухоль-ассоциированных макрофагов (ТАМ). Реактивация профессиональных свойств иммунных клеток сопровождается регрессией опухоли (Cheng et al., 2022; Merlano et al., 2022; Naicker et al., 2021; Swan et al., 2020; Tran et al., 2020; Wu and Waxman, 2018).

Противоопухолевая активность хронометрической/метрономной малодозовой химиотерапии с применением ЦФ связана с ремоделированием проопухолевых характеристик популяции MDSC и зрелых миелоидных клеток и может быть охарактеризована как регуляторная терапия, ремоделирующая строму опухоли и создающая основу для проявления противоопухолевой активности факторов врожденного и адаптивного иммунитета. Именно это свойство ЦФ рассматривается в настоящее время как терапевтически важное при его применении

в различных противоопухолевых терапиях. Метрономная химиотерапия ЦФ позволяет комбинировать прямую клеточную цитотоксичность против опухолевых клеток и разрушение клеточного окружения опухоли (Bravetti et al., 2023; Ho et al., 2020; Jan et al., 2024).

В настоящее время действие ЦФ исследуется в трех направлениях: анализируются различные схемы малодозового хронометрического/метрономного введения, исследуется совместное действие цитостатика и CpG олигодезоксинуклеотида (CpG oligodeoxynucleotides – CpG ODN; агонист TLR9 – CpG-ODN 1826: 5′-tccatgaCGttcctgaCGtt-3′; агонист TLR3 – polyI:C (полиинозиновая кислота: полицитидиловая кислота)), а также совместное действие ЦФ и различных таргетных антител и цитокинов (Jordan and Waxman, 2016; Manrique et al., 2016).

В нескольких работах были подобраны режимы ММХТ ЦФ и проанализированы разнообразные параметры ММХТ ЦФ и CpG (Chen et al., 2014; Doloff and Waxman, 2012; Jordan and Waxman, 2016; Manrique et al., 2016; Wu and Waxman, 2014). Все режимы были подобраны эмпирически и не несут другого биологического смысла кроме конечного терапевтического эффекта – вылечивания мышей от злокачественных новообразований. Так в работе (Manrique et al., 2016) были изучены различные химиотерапевтические препараты (циклофосфамид, 5-фторурацил, иринотекан, сунитиниб и темозоломид, гемцитабин, доцетаксел, паклитаксел, оксалиплатин и доксорубицин) и дозы введения, различные CpG (агонист TLR9 – CpG-ODN 1826; агонист TLR3 – polyI:C) и дозы введения, расписание введения препаратов в сочетанном режиме, места введения препаратов (внутрибрюшинное, подкожное, внутриопухолевое), продолжительность циклов ММХТ. Оказалось, что: доза ЦФ 100 мг/кг не давала стабильного терапевтического результата, в то время как дозы 100-300 мг/кг оказались эффективными и хорошо переносились; место инъекций не имело значения, однако внутрибрюшинное введение оказалось лучше по причине переносимости инъекций и в некоторых случаях недоступности опухолевого очага; все указанные выше химиотерапевтические препараты в сочетании с агонистами TLR оказались или не эффективными, или крайне токсичными и плохо переносимыми, за исключением циклофосфамида (авторы работы не смогли с уверенностью определить причины такого эффекта). Таким образом, было показано, что оптимальным является режим: 200 мг/кг ЦФ внутрибрюшинно каждые 7 дней + CpG в дозе 5 мг/кг внутрибрюшинно на 3 сутки после введения ЦФ, поскольку такой режим совпадает с восстановлением костного мозга после химиотерапии ЦФ + 4-дневный восстановительный период. Найденный еженедельный режим повторялся в течение 7 циклов.

В других работах одной и той же группы ученых (Jordan and Waxman, 2016; Wu and Waxman, 2014) было подобрано подобное расписание совмещения ЦФ и CpG-ODN 1826, где так же наблюдалось полное вылечивание мышей от нескольких типов опухолей. ЦФ вводили внутрибрюшинно каждые 6 или 12 суток в дозе 45, 90 или 140 мг/кг всего до 4 циклов. CpG в

дозе 100 мкг/на одну внутриопухолевую инъекцию вводили совместно с ЦФ: суммарно три инъекци CpG-1826 с интервалом в 3 дня, начиная с 3 суток после введения ЦФ. Интересно, что ежедневная малодозовая химиотерапия ЦФ не приводит к какому-либо значимому противоопухолевому эффекту. Показано, что хронометрическое/метрономное введение ЦФ каждые 6 суток индуцирует рекрутирование клеток врожденной иммунной системы в очаг опухоли и одновременно стимулирует их активность (Jordan and Waxman, 2016; Wu and Waxman, 2014).

Малодозовое хронометрическое/метрономное введение цитостатика ЦФ в форме монопрепарата активирует различные популяции клеток врожденного иммунитета и определяет несколько направлений противоопухолевого воздействия. Так, обработка ЦФ в малых дозах увеличивает в костном мозге количество предшественников ДК, которые созревают в активные ДК, *in vivo* способные активировать адаптивный ответ CD8+ Т-лимфоцитов; увеличивает количество ДК в периферической крови с 9 по 16 сутки от введения (Simsek et al., 2019); индуцирует секрецию опухолевой стромой хемокинов (CCL21), в результате чего в сайт опухоли рекрутируются периферические иммунные клетки, такие как макрофаги, NK-клетки, NKT-клетки, ДК, за счет цитолитической активности которых происходит регрессия опухоли (Neophytou et al., 2020; Roussot et al., 2022; Vorontsova et al., 2020). В рекрутировании в опухолевый очаг ДК и макрофагов также ответственны NK-клетки (Russo et al., 2021). Несмотря на тот факт, что при ММХТ ЦФ обнаруживается задержка в рекрутировании CD4+ и CD8+ цитолитических эффекторных Т-лимфоцитов в сайт регрессирующей опухоли, регуляторные Т-лимфоциты, как независимая клеточная популяция ОАС, исчезают. Этот факт означает, что ММХТ ЦФ разрушает супрессорную доминанту опухоли, но при этом слабо воздействует на эффекторы (Zhong et al., 2020).

Малодозовый ЦФ активирует профессиональные свойства инфильтрирующих опухоль иммунных клеток. В сайте опухолевого очага повышается экспрессия маркера B220, маркирующего киллерные интерферонпродуцирующие ДК. Киллерные ДК лизируют рядом расположенные опухолевые клетки и тут же захватывают и презентируют антигены, проводя мост между врожденным иммунным киллингом и активацией адаптивного Т- и В-клеточного ответа (Del Prete et al., 2023). Активируется литическая активность CD90+ NK1.1 - клеток (Wagner and Koyasu, 2021). ММХТ приводит к смене поляризации макрофагов с М2 на М1 фенотип (макрофагальные маркеры CD68, лизозим 1 и 2, и F4/80, а также рецептор смерти Fas) (Wang et al., 2023). Это сопровождается активной секрецией макрофагами лизозимов и нарастанию специфической фагоцитарной активности за счет прогрессивного роста филоподий и стимуляции контакта с опухолевыми клетками, при котором опухолевые клетки лизируются

ADCC-опосредованным механизмом через контакт Fc-фрагмента антител, покрывающих опухолевую клетку, и FcR макрофагов (Gogesch et al., 2021).

Активация иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль, сопровождается повышением экспрессии маркерных генов. В очаге опухоли детектируется повышенная экспрессия генов, относящихся к разным активированным клеткам иммунной системы, инфильтрирующим опухоль. Это гены, маркирующие NK-клетки: NK1.1, Nkp46 и NKG2D, и маркеры их активации Prf1, Gzmb; маркеры ДК: CD207 и CD74; маркеры макрофагов: CD86 (F4/80 и Emr1). Максимум экспрессии приходится на 12 сутки после 6-суточных инъекций малодозового ЦФ. Также обнаруживается высокая экспрессия других генов, таких как IL-15 и IL-18, которые ответственны за развитие, пролиферацию и цитотоксичность NK-клеток; FasL NK-клеток и FasR опухолевых клеткок, контакт которых обеспечивает лизис опухолевых клеток; CXCL12 – плейотропного хемокина, рекрутирующего в опухоль нейтрофилы и моноциты; TLR7, участвующего в созревании ДК; CSF1, индуцирующего созревание и пролиферацию макрофагов и моноцитов; ICAM2 и ICAM1, которые экспрессируются на эндотелиальных и иммунных клетках и необходимы для трансэндотелиальной миграции иммунных клеток к сайту опухолевого очага (Jordan and Waxman, 2016; Lei et al., 2020; Paijens et al., 2020; Wu and Waxman, 2014). ЦФ стимулирует экспрессию опухолевыми клетками MICB, являющегося активирующим цитолитические процессы лигандом для NKG2D на NK-клетках и других иммунных клетках.

В строме опухоли присутствуют два типа клеток, имеющих проопухолевые свойства: Treg и MDSC. Нетоксическая малодозовая химиотерапия ЦФ делает опухолевые клетки более иммуногенными за счет элиминации супрессорных Treg и смены функциональной активности MDSC с проопухолевой на опухоль-реактивную (Muraro et al., 2023).

Механизмы регуляции проопухолевой активности супрессоров различны. Так, известно, что CD8+ популяция ДК поддерживает активность Treg в опухоли. Обработка ЦФ приводит к деплеции CD8+ ДК и, как следствие, к утрате супрессорными Т-лимфоцитами ингибирующих иммунные клетки свойств (Fu et al., 2022).

В свою очередь, CD25+FOXP3+ клетки (Treg) секретируют цитокины TGF-β, IL-10, IFN-γ, IL-35, а также экспрессируют на своей поверхности рецептор CTLA-4. В результате паракринного действия цитокинов или при взаимодействии CTLA-4 с лигандом осуществляется супрессия эффекторных Т-лимфоцитов и ДК. ММХТ ЦФ эффективно разрушает супрессорную функцию лимфоцитов или удаляет супрессоры из опухолевого очага. Как было сказано, одной из особенностей ММХТ ЦФ является дифференцированное воздействие на CD25+FOXP3+ Tregs и другие популяции Т-лимфоцитов. В различных публикациях показано, что ЦФ полностью эрадицирует супрессоры из опухоли, тогда как эффекторные Т-клетки сохраняются в достаточном для развития иммунного ответа количестве. Предполагается, что такой эффект

связан с нарушениями в репаративной машине Treg, что препятствует восстановлению разрывов хроматина после индукции цитостатиком межцепочечных сшивок (МЦС) (Bakar and Kue, 2025; Hariyanto et al., 2022; Principe et al., 2021).

Основную популяцию иммунных клеток опухолевой стромы составляют MDSC. MDSC – это совокупность CD11b+Gr-1+ миелоидных клеток на промежуточных стадиях дифференцировки, которая составляет 30% от общего количества клеток костного мозга и около 4% всех мононуклеаров селезенки. В настоящее время установлено, что у мыши MDSC представлены двумя наиболее многочисленными популяциями клеток. Было показано, что специфические к Gr-1 моноклональные антитела взаимодействуют с одним и тем же эпитопом на двух различных молекулах Ly-6G и Ly-6C, расположенных на двух типах клеток общей популяции MDSC. В этой связи выделяют гранулоцитарную, или полиморфноядерную, фракцию MDSC (PMN-MDSC), несущую маркеры CD11b+Ly-6G+Ly-6C^{low}, морфологически схожую с нейтрофилами; и моноцитарную (M-MDSC), несущую маркеры CD11b+Ly-6G-Ly-6C^{high}, морофологически схожую с моноцитами. Количество супрессоров, принадлежащих к гранулоцитарной популяции, по разным оценкам может достигать 80%. Моноцитарная популяция клеток, представленная в первую очередь TAM, может составлять до 50% массы клеток ОАС. Известно, что в солидной опухоли при её развитии M-MDSC быстро дифференцируются в TAM2 (Cherdyntseva et al., 2017; Petty and Yang, 2017). Характерной особенностью обеих популяций клеток, составляющих общую массу меилоидных супрессоров, является супрессия иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль. Основной мишенью супрессии являются Т-лимфоциты. Супрессия осуществляется различными механизмами и зависит от различных факторов, включая Arg1, iNOS, TGF-β, IL-10, COX-2, VEGF, IDO. Актиность IDO приводит к дефициту триптофана, что способствует повышению уровня иммуносупрессивных клеток. Недостаток аргинина, связанный с синтезом NO и активностью Arg1, приводит к замедлению Т-клеточной пролиферации, подавляет экспрессию CD3ζ цепей TCR, что приводит к ингибированию Т-клеточного иммунного ответа. Кроме того, продукция MDSC активных форм кислорода и азота приводит к образованию пироксинитрита за счет реакции супероксид анион-радикала с оксидом азота. Пироксинитрит участвует в нитровании и нитрозилировании аминокислот TCR комплекса, непосредственно изменяя его структуру, что сопровождается разрушением связи рецептора и молекул MHC. В итоге исчезает возможность активации Т-клеточного иммунного противоопухолевого ответа. Кроме того, нитрование Т-клеточных специфических хемокинов ингибирует миграцию Т-лимфоцитов к сайту опухолевого роста. При участии MDSC происходит снижение экспрессии L-селектина CD62L Т-лимфоцитами за счет его протеалитического расщепления MDSC-мембраносвязанной протеазой ADAM17. В результате такого события Т-лимфоциты теряют возможность задерживаться в очаге опухоли.

Кроме того, MDSC экспрессируют на своей поверхности молекулу галектина-9, являющуюся лигандом для молекулы иммунных контрольных точек – TIM-3. В свою очередь, TIM-3 экспрессируется на поверхности интерферонпродуцирующих активированных CD4+, CD8+ Т-лимфоцитов, обеспечивая их негативную регуляцию. Взаимодействие TIM-3 с его лигандом галектином-9 приводит к лизису Т-клеток и экспансии супрессоров. MDSC ингибируют цитотоксичность NK-клеток, блокируя продукцию IFN-γ и экспрессию NKG2D. Для полной потери чувствительности NK-клеток к активирующим стимулам, то есть развитию анергии (потере способности секретировать IFN-γ), достаточно кратковременной инкубации NK-клеток с MDSC. MDSC супрессируют созревание ДК и обеспечивают иммунное ускользание опухоли. При этом не ингибируют экспрессию FasL, перфорина и TRAIL. Установлено, что развитие анергии Т-лимфоцитов, NK-клеток, ингибирование функции ДК определяется прямым контактом с опухолевыми и MDSC клетками за счет мембраносвязанного TGF-β1 (Dysthe and Parihar, 2020; Gabrilovich, 2017; He et al., 2025; Hegde et al., 2021; Di Ianni et al., 2021; Möller et al., 2024).

ММХТ ЦФ способствует смене активностей MDSC с опухоль-поддерживающей на опухоль-реактивную, что в первую очередь определяется сменой поляризации инфильтрирующих опухоль макрофагов с М2 на М1 фенотип. Опухоль-реактивные свойства MDSC значительно усиливаются при комбинации ММХТ ЦФ с CpG ODN, противоопухолевыми вакцинами или цитокинами (Fehri et al., 2022; Friedman-DeLuca et al., 2024; Huang et al., 2022; Malfitano et al., 2020).

Таким образом, ММХТ ЦФ в монорежиме или в сочетании с CpG иммуномодуляторами, вакцинами или цитокинами обладает следующими терапевтическими характеристиками, направленными на разрушение опухоли: 1) ЦФ как цитостатик прямо разрушает опухолевые клетки, индуцируя апоптоз, вызванный аберрантным митозом; 2) в дополнение к прямой цитотоксичности, ММХТ ЦФ в монорежиме и в сочетании с иммуномодуляторами различных классов активирует систему клеток врожденного и адаптивного иммунитета, что вносит дополнительный мощный стимул в разрушение опухолевых клеток и эрадикацию опухоли. Основными эффектами такой обработки являются: рекрутирование в сайт опухолевого очага периферических иммунных клеток; активация профессиональных свойств иммунных клеток врожденного и адаптивного иммунитета, инфильтрирующих опухоль; элиминация из сайта опухоли супрессорных регуляторных Т-лимфоцитов (Treg); изменение проопухолевой активности MDSC на противоопухолевую, смена поляризации макрофагов с М2 на М1 фенотип.

Такая разноплановая противоопухолевая направленность делает ММХТ ЦФ в комбинации с различными иммуномодуляторами перспективным базовым подходом для лечения онкологических заболеваний.

10.1.2. Экспериментальный терапевтический подход «Каранахан» (kāraṇa [причина] + han [разрушение], санскрит)

Многолетние исследования совместного действия цитостатика циклофосфамида (ЦФ) и сложнокомпозиционного препарата двуцепочечной ДНК (dsDNAmix), выполненные в лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН, позволили разработать новый подход в лечении злокачественных опухолей «Каранахан», основанный на уничтожении туморогенного начала в виде ОСК (эрадикации ОСК) и индукции масштабного апоптоза опухолевых клеток, что подтверждается фрагментацией нуклеосомной ДНК (Alyamkina et al., 2015; Dolgova et al., 2013, 2014; Potter et al., 2016b, 2018).

Подход «Каранахан» основан на трех открытиях, совершенных в лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН. Во-первых, был обнаружен универсальный для низкодифференцированных туморогенных опухолевых клеток (ОСК) молекулярный маркер – способность захватывать фрагменты экстраклеточной двуцепочечной ДНК естественным природным механизмом (Dolgova et al., 2014, 2019; E.V. Dolgova et al., 2018a; Proskurina et al., 2022). В этой связи в лаборатории используется tetramethylrhodamine (TAMRA)-меченный ДНК-зонд для детекции ОСК (Рисунок 1). Далее по тексту низкодифференцированные клетки, захватывающие TAMRA-меченный ДНК-зонд, названы ДНК-захватывающими опухолевыми стволовыми клетками (дзОСК).

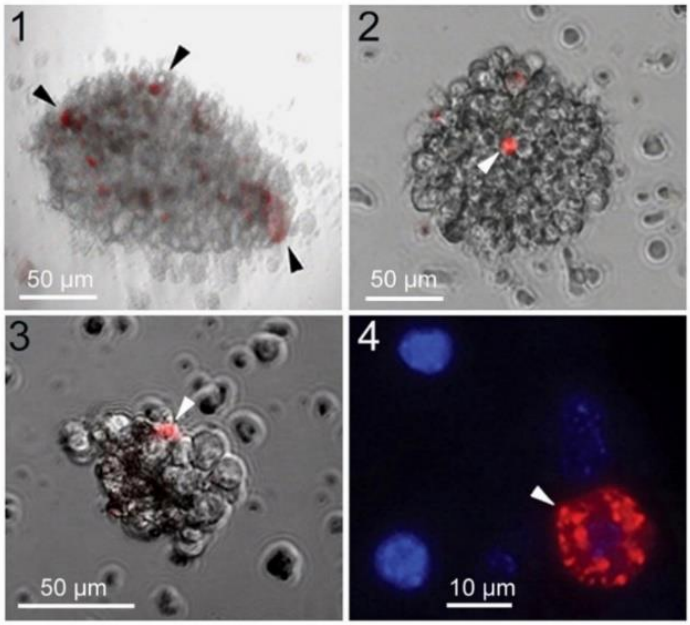


Рисунок 1. ДНК-захватывающие ОСК, интернализующие меченную экзогенную ДНК (указаны стрелками). 1 – нейросфера из культуры клеток глиобластомы человека (Dolgova et al., 2014), 2 – сферообразующая клеточная линия, полученная из индуцированной вирусом Эпштейна-Барр

лимфомы человека (Dolgova et al., 2016b, 2019), 3 – сфера лимфомы человека, 4 – клетки мышиной карциномы Кребс-2 в асцитной форме (Dolgova et al., 2016a).

Во-вторых, было показано, что доставленные во внутренние клеточные компартменты фрагменты ДНК способны вмешиваться в процесс репарации МЦС, индуцированных кросслиникрующим цитостатиком, таким образом, что ОСК или погибает, или теряет свои туморогенные свойства (Dolgova et al., 2014) (Рисунок 2). Лишенная основы бесконечного существования опухоль уничтожается защитными системами организма.

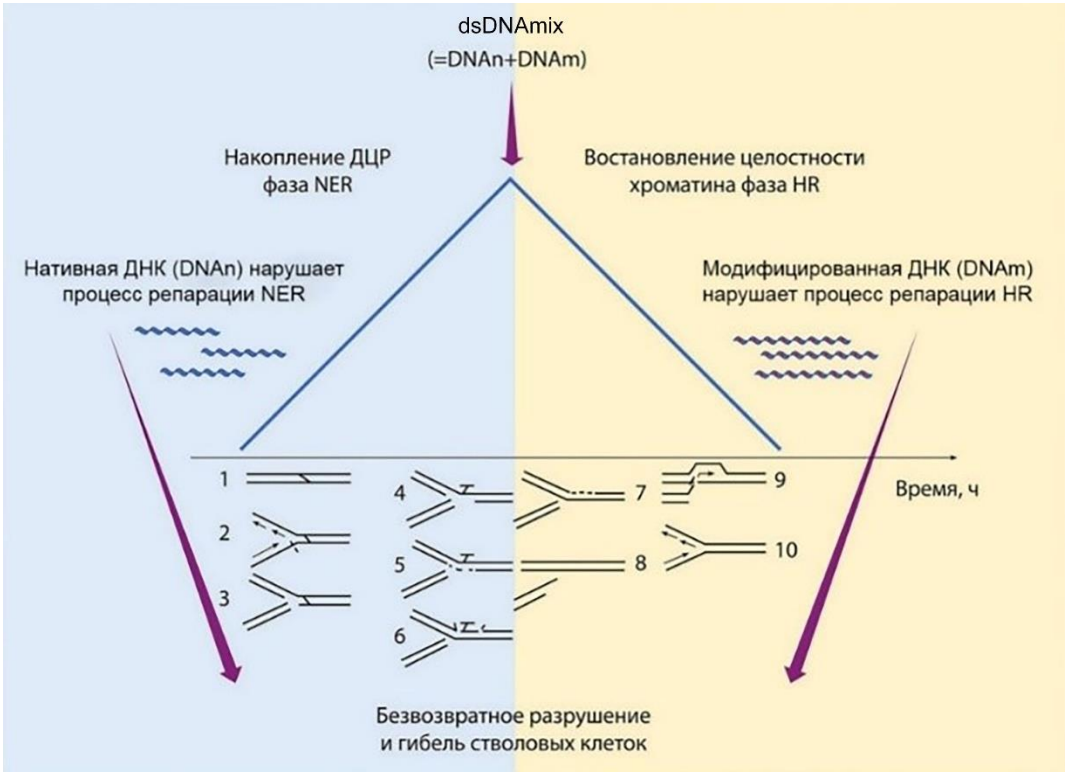


Рисунок 2. Схема участия фрагментов препарата dsDNAmix в процессе репарации межцепочечных сшивок. Препарат dsDNAmix состоит из нативной ДНК (DNAn) и модифицированной ДНК (DNAm). DNAn нарушает процесс эксцизионной репарации нуклеотидов (NER), а DNAm – процесс гомологичной рекомбинации (HR). ДЦР – двуцепочечные разрывы.

В-третьих, был обнаружен механизм синхронизации ОСК в чувствительной для обработок фазе клеточного цикла после процедуры трехкратного «запирания» клеток кросслинкирующим цитостатиком в режиме, при котором каждая следующая обработка цитостатиком начинается в момент завершения предыдущего репаративного процесса (Potter et al., 2016b). При этом: первая обработка арестует G1/S клетки; вторая обработка арестует пришедшие из G2/M в G1 клетки; третья обработка арестует оставшиеся клетки, избежавшие ареста. Далее в определенный день

после проведенной трехкратной обработки ОСК синхронно выходят в G2/M фазу и так же синхронно переходят в G1 фазу клеточного цикла. Найденное время синхронизации используется для эрадикации причинного туморогенного начала в виде ОСК (Рисунок 3).

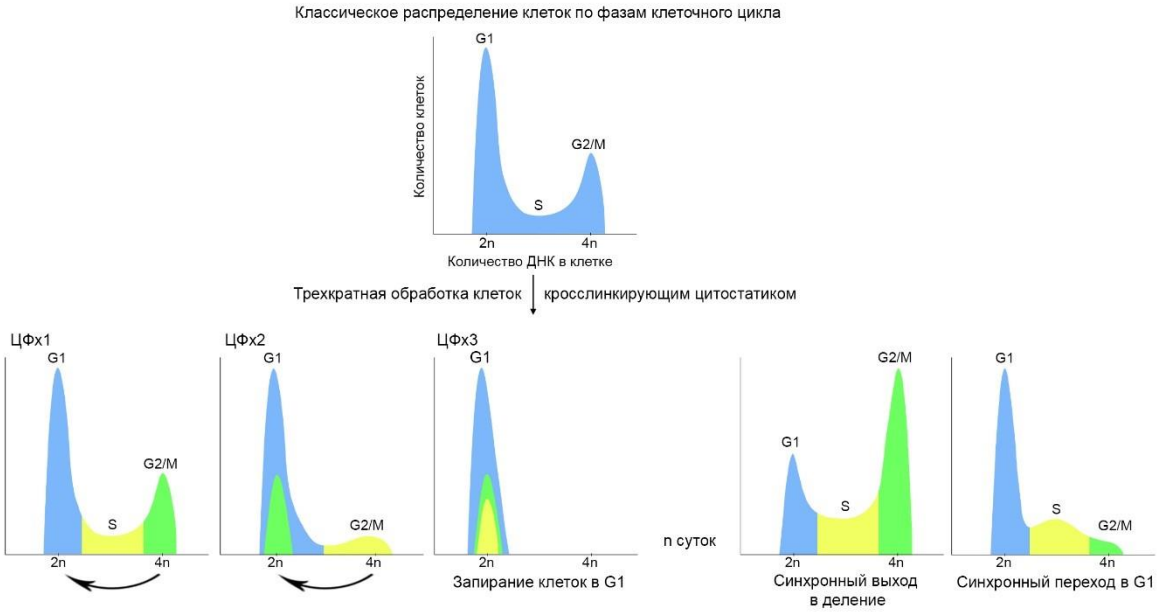


Рисунок 3. Распределение клеток по фазам клеточного цикла в ходе применения подхода «Каранахан». ЦФ-циклофосфамид.

Репарация межцепочечных сшивок в ДНК, индуцированных обработкой клеток кросслинкирующим цитостатиком (циклофосфамидом/митомицином С), делится на две фазы: эксцизионная репарация нуклеотидов (NER) и гомологичная рекомбинация (HR) (Рисунок2). Для первой фазы репарации МЦС – фазы NER – характерно появление и накопление двуцепочечных разрывов. В ходе второй фазы – фазы HR – происходит репарация двуцепочечных разрывов. Их исчезновение свидетельствует о завершении репаративного цикла. Для детекции количества двуцепочечных разрывов используется метод «ДНК-комет» в нейтральных условиях (Møller, 2018; Olive et al., 1990).

Определение синхронизации ОСК в чувствительной для обработок фазе клеточного цикла (дня финальной эрадицирующей обработки) происходит путем поиска дня, когда большинство или все клетки находятся в G2/M фазе, и чтобы за ним следовал день, когда клетки синхронно переходят в G1 фазу. Было показано, что накопление клеток в G1 фазе совпадает с временем увеличения дзОСК клеток (Potter et al., 2016b). Это связано с тем, что при переходе опухолевых клеток из G2/M фазы в G1 фазу клеточного цикла наблюдается гибель основной массы опухолевых клеток. При этом «проскочившие» три обработки кросслинкирующим цитостатиком

дзОСК в том же количестве присутствуют в анализируемой популяции, что естественно приводит к увеличению их процентного содержания. Такое поведение клеток означает, что определено время финальной эрадицирующей обработки, когда ОСК синхронизованы.

Обязательным компонентом подхода «Каранахан» является препарат dsDNAmix, который представляет собой смесь нативной и обработанной азотистым ипритом ДНК молок лосося и субстанции «Панаген» (Bogachev et al., 2018). Если дать ОСК захватить фрагменты dsDNAmix в точку смены двух фаз репаративного процесса (момент накопления максимального числа двуцепочечных разрывов), то одна составляющая препарата (нативная ДНК) будет нарушать процесс NER, а вторая (модифицированная ДНК) – процесс HR, что приведет к апоптозу массы опухолевых клеток (Alyamkina et al., 2015; Dolgova et al., 2013, 2014; Potter et al., 2016b, 2018).

Установлено, что ОСК не интернализуют дцДНК-зонд, находясь в G2/M фазе клеточного цикла (Dolgova et al., 2016a). Причина этого явления, по-видимому, лежит в изменении общеклеточных процессов, связанных с реконструкцией цитоскелета в связи с подготовкой и прохождением митоза. При этом цитостатик доставляется в клетку в любой фазе клеточного цикла, в том числе и в G2/M фазе, а МЦС, индуцируемые им, будут определяться только в G1 и далее в S фазе по появлению фунциональных двуцепочечныхх разрывов.

При определении временного режима введения кросслинкирующего цитостатика и препарата dsDNAmix согласно терапевтическому подходу «Каранахан» последнее введение цитостатика назначается в момент, когда клетки находятся в G2/M фазе. Препарат dsDNAmix вводится в соответствующей временной точке репаративного цикла, когда количество двуцепочечных разрывов максимально (переход фазы NER в фазу HR). Это время часто совпадает с временной точкой, когда клетки переходят в G1 фазу клеточного цикла.

Таким образом, терапевтический подход «Каранахан» состоит из нескольких процедурных платформ: 1) определение присутствия в опухоли низкодифференцированных ОСК по их способности захватывать TAMRA-меченый ДНК-зонд (дзОСК); 2) определение временного профиля цикла репарации МЦС, индуцированных кросслинкирующим цитостатиком; 3) определение времени накопления ОСК данной опухоли в G2/M фазе клеточного цикла после процедуры трехкратного «запирания» кросслинкирующим цитостатиком, исходя из временного профиля цикла репарации, и синхронного выхода этих клеток в чувствительную для терапии G1 фазу клеточного цикла; 4) введение в терапию обработок сложнокомпозиционным препаратом dsDNAmix (Alyamkina et al., 2010; Potter et al., 2016b) в точку демаркации фаз репаративного процесса: эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) и гомологичной рекомбинации (HR), таким образом, что одна составляющая препарата будет интерферировать процесс NER, а вторая – процесс HR, что полностью лишит ОСК возможности преодолеть терапевтический «удар» и она или погибнет, или потеряет туморогенность. Одновременно

введение в терапию обработок сложнокомпозиционным препаратом dsDNAmix приведет к масштабному лизису опухолевых клеток.

Общая схема подхода «Каранахан» с определяющими его элементами приведена на рисунке 4.

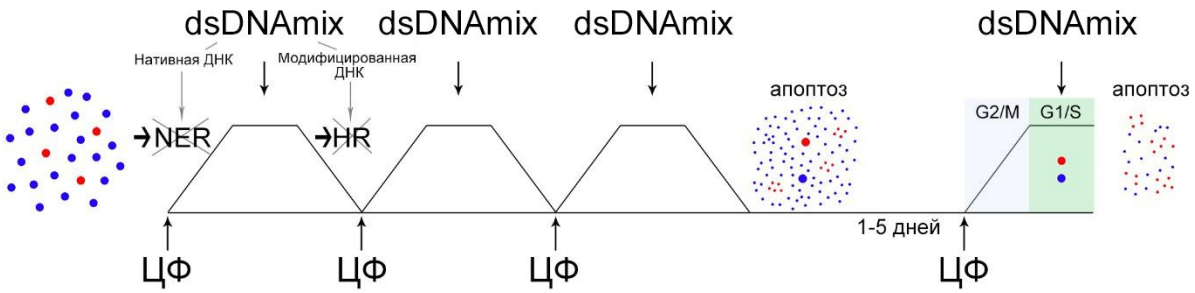


Рисунок 4. Концептуальная схема теарпевтического режима «Каранахан». На первом этапе опухолевые клетки подвергают трехкратному воздействию циклофосфамида (ЦФ) и сложнокомпозиционного препарата dsDNAmix, которые вводят в строгом соответствии с циклом репарации МЦС. В результате этой процедуры большинство ОСК элиминируется на фоне крупномасштабного апоптоза опухолевых клеток. В то же время остаточные стволовые и коммитированные клетки опухоли синхронизируются в G2/M фазе клеточного цикла. На втором этапе четвертое введение ЦФ и сложнокомпозиционного препарата dsDNAmix (так же связанное с процессом репарации) выполняется в момент синхронизации этих клеток в G2/M фазе клеточного цикла и их синхронного перехода в фазу G1. В результате все остаточные опухолевые клетки, как стволовые, так и коммитированные, полностью элиминируются. На рисунке крупными синими точками схематически обозначены коммитированные опухолевые клетки, красными – стволовые опухолевые клетки. Мелкие точки этих же цветов обозначают апоптотические тельца разрушенных в результате апоптоза опухолевых клеток. NER – эксцизионная репарация нуклеотидов, HR – гомологичная рекомбинация.

Терапевтический подход «Каранахан» успешно опробован на нескольких экспериментальных мышиных и человеческих опухолях и в 14 пилотных клинических случаях (E.V. Dolgova et al., 2018b; Kisaretova et al., 2020; Potter et al., 2016b, 2018; Proskurina et al., 2026; Долгова и др., 2019; Поттер и др., 2018).

10.1.3. ММХТ ЦФ как составной элемент подхода «Каранахан»

Рассматривая концепцию объединения трех подходов в единую универсальную платформу лечения злокачественных новообразований, необходимо определить место обработок препаратами dsDNAmix и ЦФ в парадигме иммунного ответа организма.

Анализируя предмет подхода «Каранахан» в разрезе проведенного анализа регуляторного действия ЦФ и CpG ODN, может создаться впечатление, что подход, включающий инъекции ЦФ и препарата dsDNAmix – это случайно подобранное удачное сочетание двух препаратов, при котором происходит активация противоопухолевого иммунитета, дающее столь удивительные результаты по лечению неизлечимой скоротечной карциномы Кребс-2, глиобластомы U-87, В-лимфомы и других экспериментальных опухолей (E.V. Dolgova et al., 2018b; Kisaretova et al., 2020; Potter et al., 2018, 2016b; Долгова и др., 2019; Поттер и др., 2018). Активация иммунного ответа при использовании такой терапии – это неоспоримый, доказанный в работах лаборатории индуцированных клеточных процессов, факт (Alyamkina et al., 2010; E.V. Dolgova et al., 2018b; Potter et al., 2016b, 2018). Тем не менее у подхода «Каранахан» главным принципиальным событием, предопределяющим вылечивание мышей с имплантированной опухолью любого происхождения, является именно эрадикация ОСК и индукция тотального апоптоза опухолевых клеток, а не противоопухолевый иммунный ответ. Чтобы обосновать высказанное утверждение, приведем несколько принципиальных экспериментально обоснованных заключений, подтверждающих указанную суть событий.

Только культура опухолевых клеток, имеющая в своем составе опухолевую стволовую клетку, способную захватывать TAMRA-меченный ДНК-зонд (дзОСК), дает устойчивый трансплантат. Культура опухолевых клеток, лишенная ОСК (сортировка, эрадикация ОСК совместным действием митомицина С и препарата dsDNAmix), не перевивается сингенным или иммунодефицитным мышам (Dolgova et al., 2014; Долгова и др., 2019). В проведенных экспериментах принципиально отсутствует какое-либо воздействие клеток иммунной системы, поскольку обработки цитостатиком проводились до имплантации графта в системе *ex vivo*. Сортировка клеток проводилась из клеточной культуры, где также принципиально отсутствует какое-либо воздействие клеток иммунной системы.

Только схема, направленная именно на эрадикацию ОСК, примененная в экспериментах *in vivo*, с использованием кросслинкирующего цитостатика ЦФ позволяет вылечить экспериментальных животных от опухоли Кребс-2 и лишает туморогенного начала культуру глиобластомы человека U-87 (Dolgova et al., 2014; Долгова и др., 2019). Многократно показано, что одноразовые или метрономные, не несущие биологического смысла, инъекции ЦФ и препарата dsDNAmix не способны вылечить мышей от опухоли Кребс-2 и лишить туморогенного начала культуру глиобластомы человека U-87. Только привязка обработок к репаративному циклу и финальная исчерпывающая эрадикация оставшихся от инициирующей терапии, синхронизированных в чувствительной фазе клеточного цикла, ОСК позволяет вылечить мышей от неиммуногенных экспериментальных опухолей. Те же самые обработки, несомненно активирующие иммунные реакции (Alyamkina et al., 2010), без привязки к биологически

осмысленным временным индикаторам всегда сопровождаются рецидивом заболевания и гибелью мышей (Potter et al., 2016b).

В подходе «Каранахан», как оказалось, соблюдены все основные найденные эмпирически для ММХТ ЦФ + CpG индикаторные параметры. Это доза ЦФ: первые 2 суток мышь получает 300 мг/кг, на 5-9 сутки еще 100 мг/кг при подходе «Каранахан» (Potter et al., 2016b); либо 140-200 мг/кг 1-7-14-21 сутки (каждые 7 суток) (Manrique et al., 2016) или 1-6-12-18-24 сутки (каждые 6 суток) (Chen et al., 2014; Doloff and Waxman, 2012; Jordan and Waxman, 2016; Manrique et al., 2016; Wu and Waxman, 2014) при ММХТ ЦФ; режим введения ЦФ: три инъекции в течение первых 48 часов и последующая инъекция на 5-9 сутки в зависимости от вида опухоли при подходе «Каранахан»; либо 1-7-14-21 сутки (каждые 7 суток) или 1-6-12-18-24 сутки (каждые 6 суток) при ММХТ ЦФ; введение активатора ДК: препарата dsDNAmix при подходе «Каранахан» (активность которого аналогична препаратам CpG, используемым в цитируемых работах в близких дозах), либо CpG при ММХТ ЦФ. Это означает, что при применении подхода «Каранахан» произойдут несколько принципиальных событий, уникальных или аналогичных проведению ММХТ ЦФ: будут эрадицированы ОСК; будет индуцирован тотальный апоптоз опухолевых клеток; будет разрушено супрессивное воздействие Treg и MDSC; будут активированы иммунные клетки, инфильтрирующие опухоль; в опухолевый очаг будут рекрутированы иммунные клетки с периферии. Такие эффекты будут связаны с действием цитостатика и препарата dsDNAmix.

10.1.4. In situ вакцинация

В противоопухолевой иммунотерапии сформировался принципиально новый подход, базирующийся не на системном введении препарата, направленном на активацию определенного звена иммунитета, а предоставляющий собой такой тип воздействия, при котором одновременно в небольшой области опухоли активируется вся совокупность иммунных клеток и развивается всеохватывающий противоопухолевый иммунитет, сопровождающийся разрушением первичной и дистальных опухолей и выздоровлением организма. Такой тип локальной иммунотерапии получил название *in situ* вакцинации.

При применении данного подхода терапевтические агенты доставляются непосредственно в очаг опухоли, при этом опухолевые клетки гибнут и в опухоли *in vivo* высвобождаются ассоциированные с опухолью антигены. Таким образом, опухоли пациентов преобразуются в источник опухолевых антигенов, которые поглощаются антигенпрезентирующими клетками, такими как дендритные клетки. Более того, *in situ* вакцины приводят к активации клеток врожденного иммунитета, таких как дендритные клетки, макрофаги и нейтрофилы, восстановлению активности Т-лимоцитов, а также к смене поляризации опухолевого микроокружения с опухоль-поддерживающего статуса на опухоль-реактивный

статус, вызывая системный иммунный ответ и формирование иммунной памяти (Giram et al., 2025; Shi et al., 2025).

В настоящее время рассматриваются многочисленные технологические платформы, использующие различные методические подходы для *in situ* активации противоопухолевого иммунитета. Это использование онколитических вирусов, манипуляции с инфильтрирующими опухоль миелоидными клетками и лимфоцитами, блокада рецептор-лиганд взаимодействия (ингибиторы контрольных точек иммунного ответа внутри опухоли, TNF сигналинг), абляция локальной иррадиацией, локальная радиочастотная, ультразвуковая и криоабляция, инъекции трансформированных клеток, цитокиновая активация, тканевая электоропорация, а также различные их комбинации (van den Bijgaart et al., 2021; Gong et al., 2024; Li et al., 2020; Lurje et al., 2021).

Локальная иммунотерапия имеет ряд принципиальных преимуществ перед обычной иммунотерапией: 1) доза вводимого в опухолевый очаг препарата существенно ниже в сравнении с его системным введением, что снижает токсичность терапии; 2) в этой связи можно одновременно использовать несколько технологических платформ без опасения развития неконтролируемого токсического эффекта (например, последствия цитокинового шторма); 3) создается высокая локальная концентрация препарата, что существенно повышает силу иммунного ответа. Тем не менее основной смысл любой из перечисленных технологических платформ – это активация АПК, первичное получение всей совокупности опухоль-ассоциированных антигенов и разрушение супрессорного влияния ОАС (Huppert and Daud, 2022; Li et al., 2020; Mao et al., 2020; Marabelle et al., 2017).

Технически подход представляет собой введение в очаг опухолевого роста факторов, активирующих АПК, и факторов, так или иначе запускающих необратимую встречную волну активации АПК и одновременно активирующих клетки врожденного иммунного ответа. Активированные иммунные клетки и сеть образующихся клеточных и гуморальных связей при таком воздействии определяют неизбежность лизиса клеток опухоли в первичном очаге и появления в ограниченном пространстве всей совокупности опухоль-ассоциированных антигенов. Эти антигены вследствие прямого клеточного контакта ДК и разрушающихся клеток опухоли непосредственно попадают во внутренние компартменты ДК. Следствием такого сценария является появление всей полноты антигенных детерминант и предельно возможного репертуара праймированных, активированных к пролиферации и клональной экспансии эффекторных CD8+ Т-лимфоцитов. Размножившиеся в селезенке CD8+ Т-лимфоциты представляют собой адаптивное звено иммунного полноценного противоопухолевого ответа, охватывающего весь организм.

В научной литературе существуют примеры такого рода терапевтических подходов, продемонстрировавших эффективность при лечении перевитых или индуцированных экспериментальных опухолей.

Как следует из анализа литературных источников, для активации ДК *in vitro* и *in vivo* используются CpG олигонуклеотиды или TNF-α (Das et al., 2024; Li et al., 2020; Oh et al., 2011; Psarras et al., 2021; Sagiv-Barfi et al., 2018; Xu et al., 2022). Для воздействия на другие звенья иммунного ответа используют моноклональные антитела или другие специфические лиганды. Антитела против иммунных контрольных точек PD-1, расположенных на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов, превентивно предотвращают их контакт с соответствующими лигандами, расположенными на поверхности АПК, ДК, макрофагов и клеток многих опухолей. Разрыв PD-1/PD-L1 сигнального пути сохраняет цитотоксическую активность Т-лимфоцитов. TAM2 макрофаги обладают проопухолевыми свойствами и их удаление из очага опухолевого роста или реполяризация в опухоль-реактивный M1 или опухоль-нейтральный M0 фенотип является условием активации противоопухолевой активности других иммунных клеток ОАС. Такой тип *in situ* вакцинации и развитие противоопухолевого иммунного ответа могут быть обусловлены инъекцией в опухоль групп-специфического активирующего макрофаги фактора – GcMAF. Гликолипиды αGalCer или Glucoronosylceremide также используются в противоопухолевой экспериментальной терапии. Эти молекулы являются аналогами эндогенного гликолипида isoglobotrihexosylceramide, который представляется в качестве эндоантигена в комплексе с CD1d (фактор, относящийся к группе MHCI) АПК. Такой комплекс взаимодействует с рецептором на NK-клетках, с Т-клеточным рецептором NKT-клеток и активирует их. NKT-клетки представляют собой популяцию клеток, являющуюся одной из доминирующих в системе врожденного противоопухолевого иммунного ответа (Delfanti et al., 2022; Gao et al., 2021). Большое внимание уделяется антителам или генно-инженерным лигандам к рецепторам, относящимся к суперсемейству TNFR (Croft et al., 2024; Fischer et al., 2020; Siegmund and Wajant, 2023), и в частности к OX40 рецептору (Alves Costa Silva et al., 2020; Chang et al., 2025; Mascarelli et al., 2021; Sagiv-Barfi et al., 2018; Thapa et al., 2024). В различных видах терапии онкологии, основанных на взаимодействии с OX40R, относящимся к указанному выше семейству TNFR, применяются не только антитела или генно-инженерные белковые конструкции, но и другие OX40 агонисты, такие как РНК-аптамеры (Mahmoudian et al., 2024; Nozari and Berezovski, 2017) или химические компаунды (Tsuji et al., 2023). Эти молекулы также активируют CD4+ Т-лимфоциты, индуцируя их пролиферацию и секрецию ими IFN-γ, что приводит к развитию адаптивного иммунного ответа.

Одной из наиболее ярких демонстраций возможностей использования *in situ* вакцинации для эрадикации экспериментальных опухолей является подход, описанный в работе (Sagiv-Barfi

et al., 2018), где при использовании платформы «рецептор-лиганд с одновременной активацией АПК» на примере синергичного действия CpG и антител к OX40R были успешно вылечены несколько иммуногенных перевиваемых и индуцированных экспериментальных опухолей.

Малоизученным с позиции индукции противоопухолевой активности клеток ОАС является GcMAF, который способен поляризовать макрофаги в клетки M0/1 фенотипа. Этот факт предполагает возможность при определенных условиях изменять фенотип TAM2 клеток на противоопухолевые или опухоль-нейтральные фагоциты.

Именно эти две системы активации противоопухолевого иммунного ответа (CpG+антитела к OX40R и групп-специфический активатор макрофагов GcMAF) в режиме *in situ* обработки были охарактеризованы в настоящем комплексном исследовании. В этой связи в настоящем разделе дана краткая характеристика обоим подходам и факторам, определяющим активацию противоопухолевого иммунного ответа.

Система OX40R/OX40L

Существование опухолеспецифичных Т-лимфоцитов, а также их способность активироваться у онкологических больных свидетельствует о том, что иммунный ответ может быть использован в качестве имманентного инструмента борьбы со злокачественными новообразованиями. Однако основной проблемой такого подхода является супрессия иммунных клеток развитой опухолью, приводящая к иммунологической толерантности к опухоли. И, таким образом, разрушение систем сдерживания иммунных реакций опухолью является ключевым звеном противоопухолевой иммунотерапии.

Активация Т-клеточного звена иммунной системы требует распознавания антигена Т-клеточным рецептором в сочетании с костимуляцией, обеспечиваемой АПК. Эти начальные взаимодействия важны для успешного праймирования Т-лимфоцитов, однако микроокружение опухоли, в котором находятся эти праймированные Т-лимфоциты, в конечном счете определяет их способность вызывать клинически значимый противоопухолевый иммунный ответ и формировать иммунологическую память. Активированные Т-лимфоциты в опухолевом микроокружении взаимодействуют своими негативными регуляторами CTLA-4 и PD-1 с лигандами, экспрессируемыми либо опухолевыми клетками, либо клетками, ассоциированными с опухолью, что приводит к подавлению Т-клеточного ответа. Для успешной иммунотерапии опухолей требуется достаточное количество опухолеспецифичных Т-клеток, которые избегают супрессивное воздействие опухоли и ОАС и выживают в течение длительного периода времени (Itahashi et al., 2022; Maimela et al., 2019).

Представители суперсемейства TNF: OX40R (CD134, TNFRSF4) и его лиганд OX40L (CD252, TNFSF4) управляют различными иммунными функциями Т-лимфоцитов. Взаимодействие OX40R и OX40L способно активировать сигнальный путь NF-κB, а также

усиливать сигнальные пути, активируемые TCR, например PI3K/PKB и NFAT. Эти сигнальные пути приводят к эффектам, связанным с поддержанием жизнеспособности и усилением пролиферации, а также с высвобождением цитокинов (Willoughby et al., 2017). Такой костимулирующий сигнал повышает выживаемость Т-клеток, эффективность Т-клеточного ответа и Т-клеточную память (Nishimuta et al., 2026).

OX40R представляет собой трансмембранный гликопротеин I-го типа массой 50 кДа, содержащий 277 аминокислот (цитоплазматический хвост из 49 аминокислот и внеклеточную область из 186 аминокислот). Показано, что для экспрессии OX40R на Т-лимфоцитах требуется их активация через TCR. OX40R не экспрессируется на наивных Т-клетках. Сильный активирующий сигнал через TCR может самостоятельно индуцировать экспрессию OX40R, однако для оптимальной экспрессии OX40R на поверхности Т-клеток требуется дополнительная костимуляция или дополнительный активирующий сигнал через рецепторы цитокинов (Iriki et al., 2023; Thapa et al., 2024). Исследования показали, что OX40R экспрессируется на активированных CD4+, CD8+ Т-лимфоцитах (Lu, 2020). Другие типы клеток, например NKT-клетки, нейтрофилы и NK-клетки, также экспрессируют OX40R (Fu et al., 2021; Yan et al., 2021). OX40R конститутивно экспрессируется на мышиных FOXP3+CD4+ регуляторных Т-лимфоцитах. Индукция OX40R происходит в течение 24 часов и достигает максимума через 48-72 часа после начальной стимуляции TCR. Продолжительность экспрессии OX40R зависит от эффективности передачи сигналов TCR и костимуляции, но обычно длится 3-4 дня (Redmond et al., 2009b, 2009a).

OX40L представляет собой трансмембранный белок II-го типа, содержащий 183 аминокислоты (цитоплазматический хвост из 23 аминокислот и внеклеточный домен из 133 аминокислот). Он представлен на поверхности клетки в виде тримера, что позволяет ему связываться с тремя молекулами OX40R. OX40L экспрессируется на активированных АПК, включая ДК, В-лимфоциты и макрофаги. Передача сигналов через CD40, а также воспалительные стимулы, которые передают сигналы через TLR (TLR2, TLR4, TLR9), индуцируют экспрессию OX40L на АПК. Индуцируемая экспрессия OX40L на АПК гарантирует, что активированные OX40R+ Т-клетки получают сигнал через OX40R только локально, когда они находятся в воспалительной среде. OX40L также обнаружен в NK-клетках, тучных клетках, активированных Т-лимфоцитах, гладкомышечных клетках дыхательных путей человека и эндотелиальных клетках сосудов (Lé and Torres, 2022; Marfil-Cantón et al., 2024; Song et al., 2024).

Была определена структура экстраклеточных доменов OX40R и OX40L. OX40L представляет собой гомотримерный белок, сборка гомотримера стабилизируется гидрофобными остатками. OX40R, напротив, представляет собой мономерный белок, стабилизированный многочисленными дисульфидными связями. Три молекулы OX40R связываются с

гомотримерной формой OX40L, образуя комплекс со стехиометрией 3:3 (Рисунок 5) (Nishimuta et al., 2026).

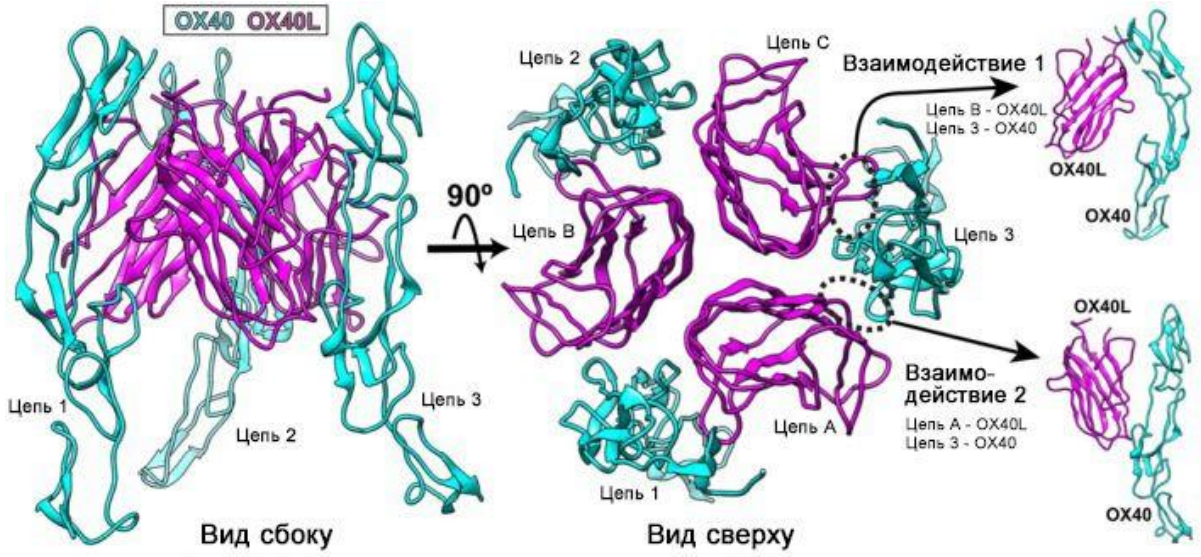


Рисунок 5. Структура OX40R в комплексе с OX40L. OX40R и OX40L окрашены в голубой и пурпурный цвета, соответственно. Одна молекула OX40R контактирует с двумя протомерами гомотримерной формы OX40L, образуя две различных области взаимодействия. Рисунок представлен в (Nishimuta et al., 2026).

Кристаллическая структура OX40R показывает, что рецептор имеет относительно традиционную многодоменную структуру TNFR, состоящую из внеклеточного домена связывания лиганда, образованного из 4 повторов цистеинбогатых доменов (CRD) (Рисунок 6 А). Домены CRD1 и CRD2 OX40R относительно консервативны по сравнению с другими членами семейства рецепторов фактора некроза опухоли и образуют жесткую структуру, аналогичную структурам других рецепторов фактора некроза опухоли, таких как TNFR1. В то же время между доменами CRD3 и CRD4 наблюдается большая свобода вращения, которая не наблюдается в TNFR1, что подчеркивает структурное разнообразие в этом семействе рецепторов (Рисунок 6Б). И мышиный, и человеческий OX40L существенно отличаются от других лигандов TNFSF. OX40L имеет лишь 15 % идентичности последовательности с другими членами семейства TNF. В отличие от других членов TNFSF, OX40L вступает в контакт с рецептором по меньшей мере в двух областях (две аминокислоты F180 и N166), а не только в одной "горячей точке" (Рисунок 6В).

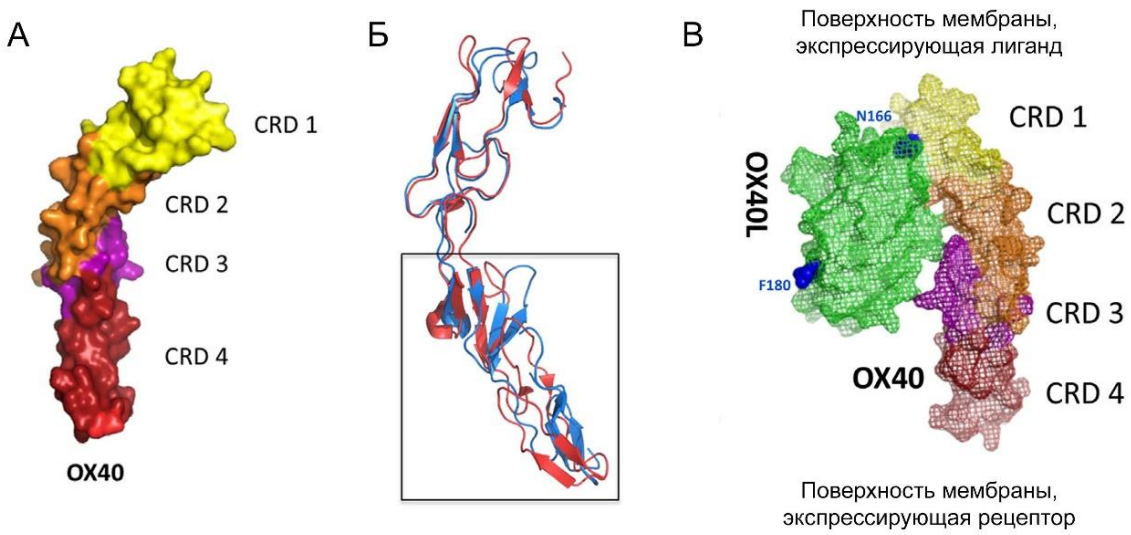


Рисунок 6. Структурное сравнение OX40R и OX40L с другими членами семейства TNF. А) hOX40R в виде молекулярной поверхности, где CRD1, CRD2, CRD3 и CRD4 окрашены в желтый, оранжевый, пурпурный и красный цвета, соответственно. Б) Совмещение структур hOX40R (красный) и TNFR1 (синий), демонстрирующее сходство в расположении доменов CRD1 и CRD2, а также гибкость доменов CRD3 и CRD4 (CRD3 и CRD4 выделены рамками). В) Взаимодействие hOX40R-OX40L. OX40L выделен зеленым. Аминокислотные остатки лиганда, общие для мыши и человека (N166 и F180), представлены синими сферами. Мономер ориентирован таким образом, что мембраны клеток, экспрессирующих лиганд и рецептор, находятся сверху и снизу, соответственно. Рисунок представлен в (Willoughby et al., 2017).

Взаимодействие OX40R-OX40L способно активировать сигнальный путь NF-κB, а также усиливать сигнальные пути, расположенные ниже TCR, например PI3K/PKB и NFAT (Рисунок 7). Цитоплазматический хвост OX40R содержит мотив QEE, характерный для многих членов семейства TNFR, который позволяет связываться с факторами, ассоциированными с TNFR (TRAFs) (Croft et al., 2009).

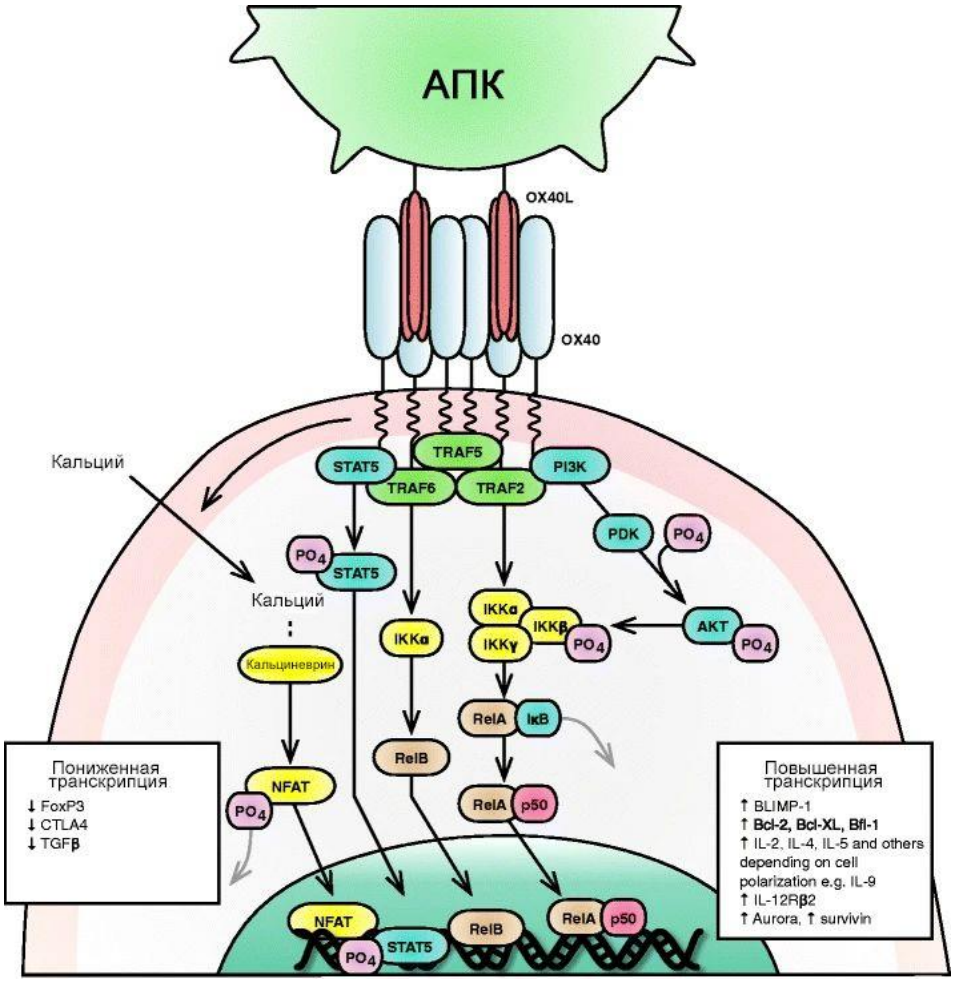


Рисунок 7. Сигнальные пути, активированные взаимодействием OX40R-OX40L. Рисунок представлен в (G. J. Webb et al., 2016).

Было показано, что TRAF 2 и 5 способны активировать сигнальный путь NF-κB, тем самым увеличивая экспрессию ряда антиапоптотических белков, включая Bcl-2, Bcl-xL и Bfl-1, что приводит к подавлению апоптоза и повышению выживаемости клеток (Willoughby et al., 2017). В ходе канонического пути активации сигнального пути NF-κB формируется сигнальный комплекс, включающий факторы TRAF2, TRAF6, TRAF5, и комплекс IKK, состоящий из IKKa, IKKβ, IKKy. IKKα и IKKβ фосфорилируют белки IκB, что приводит к их убиквитинированию и деградации. Затем RelA вместе с p50 (гетеродимер NF-κB) высвобождаются и проникают в ядро (Croft et al., 2009). В процессе неканонического пути активации сигнального пути NF-κB происходит активация убиквитинлигазы TRAF6, которая активирует NF-κB-индуцирующую киназу (NIK). Киназы NIK и IKKα фосфорилируют p100, что приводит к его частичному протеолизу. Образующийся белок p52 образует гетеродимер с RelB, и комплекс RelB-p52 проникает в ядро (Oh and Ghosh, 2013; Thu and Richmond, 2010; Walsh et al., 2015; Xiao et al., 2012).

Взаимодействие OX40R и OX40L может усиливать вызванный взаимодействием антигена и TCR приток кальция. Кальций связывается с кальмодулином, который, в свою очередь, активирует кальмодулин-зависимую фосфатазу кальциневрин. Белки NFAT дефосфорилируются под действием кальциневрина, что приводит к их ядерной транслокации (Croft et al., 2009; Macian, 2005). Этот путь участвует в выработке таких цитокинов, как IL-2, IL-4, IL-5 и IFN-γ (Mahmood and Yang, 2012; Willoughby et al., 2017).

Активация OX40R и последующая передача сигналов также усиливают передачу сигналов от TCR главным образом за счет воздействия на путь PI3K/PKB. Взаимодействие OX40R и OX40L рекрутирует TRAF2 и TRAF5, этот процесс активирует фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K) и впоследствии индуцирует фосфорилирование протеинкиназы B (AKT) PDK-зависимым образом, что, в свою очередь, усиливает передачу сигналов через комплекс IKK. Кроме того, синергия между передачей сигналов от TCR и OX40R увеличивает экспрессию сурвивина и киназы Aurora B за счет устойчивой активации протеинкиназы B (PKB). Эти два белка функционируют совместно, стимулируя активность циклинзависимых киназ, обеспечивая переход от фазы G1 к фазе S в клеточном цикле и поддержание митоза в Т-клетках (Croft et al., 2009; Mahmood and Yang, 2012; Willoughby et al., 2017; Yuan et al., 2026).

В работе (G. J. Webb et al., 2016) упоминается о том, что связываение OX40R с OX40L способствует фосфорилированию STAT5, позволяя ему проникнуть в ядро. Однако данный факт является спорным, так как в работах (Baeyens et al., 2015; Meylan and Siegel, 2017) сообщается о том, что связывание рецептора с лигандом не приводит к увеличению количества фосфорилированного STAT5.

Взаимодействие OX40R-OX40L также влияет на транскрипционную активность различных нижестоящих мишеней, в том числе гена forkhead box P3 (FOXP3). Экспрессия FOXP3 в CD4+ Т-клетках приводит к формированию фенотипа регуляторных Т-лимфоцитов (Treg). Доказано, что передача сигналов через OX40R подавляет экспрессию FOXP3, предотвращает индукцию новых FOXP3+ регуляторных Т-клеток из CD4+ Т-клеток и ослабляет иммуносупрессивную функцию существующих FOXP3+ CD4+ регуляторных Т-клеток (Sadrolashrafi et al., 2024).

Таким образом, взаимодействие OX40R и OX40L усиливает эффекторные свойства Т-лимфоцитов. Их взаимодействие способствует выживаемости Т-лимфоцитов, усиливает пролиферативные реакции Т-лимфоцитов, стимулируют развитие фенотипов эффекторных CD4+, CD8+ Т-лимфоцитов и блокирует развитие регуляторных Т-лимфоцитов, увеличивает экспансию эффекторов, стимулирует развитие Т-клеток памяти. Т-клетки, активированные с помощью OX40R, становятся устойчивыми к последующей регуляции регуляторными Т-лимфоцитами (Lu, 2020). Лигирование OX40R/OX40L приводит к увеличению продукции

эффекторных цитокинов и пролонгации активации Т-лимфоцитов. Одним из механизмов длительной активации эффекторных Т-лимфоцитов является экспрессия как OX40L, так и OX40R на Т-лимфоцитах. Происходит длительная стабилизация возможности взаимодействия рецептора и лиганда, одновременно присутствующих на большом количестве Т-лимфоцитов, без участия АПК. То есть Т-клетки могут стимулировать другие Т-клетки, поддерживая таким образом активацию Т-клеточной популяции (Fu et al., 2021).

Мощные иммунологические эффекты, опосредованные взаимодействием OX40R/OX40L, делают эту систему привлекательной мишенью для улучшения иммунотерапии опухолей, связанной с увеличением количества и выживаемости опухолеспецифичных Т-лимфоцитов. В исследованиях показано, что введение агонистических антител против OX40R (αOX40) не требует созревания АПК, необходимого для развития иммунного ответа. Это наблюдение предполагает независимую терапевтическую эффективность при применении агонистов OX40R. Было продемонстрировано, что однократная доза агонистического антитела к OX40R разрушает иммунологическую толерантность. Исследования продемонстрировали, что агонисты OX40R повышают противоопухолевый иммунитет в доклинических моделях с использованием иммуногенных опухолей. При этом слабоиммуногенные опухоли не реагируют на обработку агонистами OX40R (B. J. Chen et al., 2022; Croft et al., 2024; Myers et al., 2020; Yan et al., 2021).

Стратегии, использующие лечение агонистами OX40R в сочетании с другими антителами-агонистами, усиливают противоопухолевый иммунитет. Так добавление IL-12 к обработанным αOX40 CD4+ Т-клеткам приводило к большей секреции IFN-γ. Добавление IL-12 и антител против 4-1BB в схему лечения с использованием αOX40 приводило к значительно более высокой цитотоксической активности Т-клеток в отношении опухолевых клеток и лучшей выживаемости обработанных мышей по сравнению с контролем (Redmond, 2023). Сочетание антитела-агониста OX40R, блокирующего антитела CTLA-4 и внутриопухолевых инъекций CpG олигонуклеотидов индуцировало регрессию опухолей системной лимфомы и предотвратило повторное развитие заболевания (Pieper et al., 2021).

В настоящем исследовании будет использована *in situ* вакцинация, описанная в работе (Sagiv-Barfi et al., 2018). В данном исследовании была продемонстрирована высокая эффективность одного из вариантов *in situ* вакцинации – комбинациии неметилированного CG-обогащенного олигодезоксинуклеотида (CpG) – лиганда Toll-подобного рецептора 9 (TLR9) – и антитела против OX40R (αOX40). Оказалось, что CpG, вводимые в опухоль, активируют антигенпрезентирующие ДК и одновременно индуцируют экспрессию OX40R на CD4+ Т-лимфоцитах в микроокружении опухоли. Известно, что OX40R экспрессируется как на активированных эффекторных Т-лимфоцитах, так и на регуляторных Т-лимфоцитах. При этом передача сигналов на OX40R рецептор способствует активации эффекторных Т-лимфоцитов и

ингибирует функцию регуляторных Т-лимфоцитов. Добавление агонистического антитела против OX40R обеспечивает синергический стимул, вызывающий противоопухолевый иммунный ответ, в результате которого резорбируются отдаленные участки уже сформировавшихся опухолей. Принцип индукции и амплификации иммунного ответа указанным маневром заключается в следующем. Антигены опухоли, всегда присутствующие в опухолевом очаге в результате постоянной гибели опухолевых клеток, будут представляться активированными CpG ДК. Одновременно будет индуцирована экспрессия OX40R на эффекторных Т-лимфоцитах. Инъекции агонистического антитела против OX40R приведет к активации этих клеток, их взаимодействию с представленным активированными ДК антигеном и развитию иммунного ответа.

В своей работе Sagiv-Barfi (Sagiv-Barfi et al., 2018) и коллеги использовали следующий режим обработок: комбинацию αOX40 (4 мкг) и олигодезоксинуклеотида CpG (50 мкг) вводили в один опухолевый сайт три раза с промежутком в 48 часов. Именно этот режим мы полностью воспроизведем в настоящем исследовании.

Таким образом, сочетание стратегий, которые активируют опухолеспецифичные Т-клетки вместе с сигнализацией OX40, может генерировать и поддерживать терапевтический противоопухолевый иммунный ответ.

GcMAF и его специфическая мишень

Специфический активатор макрофагов GcMAF – компонент плазмы крови, образуется в результате сайт-специфического селективного дегликозилирования DBP под действием ферментов β-галактозидазы и сиалидазы, локализованных на клеточных мембранах активированных В- и Т-лимфоцитов, соответственно (Рисунок 8) (Bouillon et al., 2020; Dolgova et al., 2021; Levites et al., 2020; Nabeshima et al., 2020; Saburi et al., 2017).

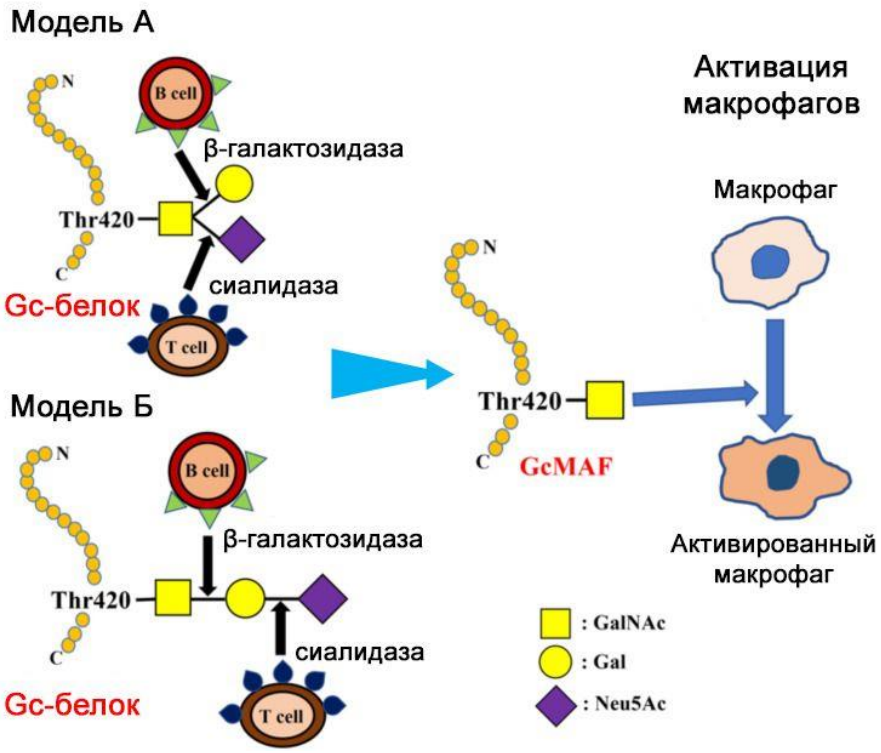


Рисунок 8. Структура белка Gc (DBP) и его преобразование в GcMAF. (Модель А) Yamamoto и др. предложили структуру белка DBP/Gc1F и его преобразование в GcMAF (Yamamoto and Kumashiro, 1993). В этой модели GalNAc ковалентно связан с Thr420 белка Gc1F, а галактоза и сиаловая кислота связаны с GalNAc по Y-образной схеме. Следовательно, удаление галактозы и сиаловой кислоты обнажает GalNAc и приводит к образованию активированного GcMAF. (Модель Б) Ravnsborg и др. предложили линейную модель, основанную на результатах масс-спектрометрии (Ravnsborg et al., 2010). В этой модели три части сахара, присоединенные к Thr420, расположены линейно, причем GalNAc ковалентно связан с треонином, а галактоза и сиаловая кислота присоединены к GalNAc последовательно. Рисунок представлен в (Nabeshima et al., 2020)

DBP-это полифункциональный гликопротеин, относящийся к семейству белков крови (Group-specific component, Gc-белки размером 51–58 кДа). DBP синтезируется гепатоцитами и попадает в кровоток в форме зрелого мономера, несущего три функциональных домена. Домен, связывающий витамин D3 и жирные кислоты, расположен между аминокислотными остатками 35-49; актин-связывающий домен находится между аминокислотными остатками 350-403. Два сайта связывания с клеточной мембраной нейтрофилов расположены на N- и C-концах молекулы гликопротеина (Li et al., 2024; Mull et al., 2021). DBP присутствует в плазме крови человека в большом количестве (300-600 мг/л) и выступает в качестве основного переносчика витамина D3 и его производных. К другим функциям DBP относятся: а) связывание и выведение актина, высвобождающегося при некрозе клеток, а также выведение жирных кислот и бактериальных

эндотоксинов; б) активация хемотаксиса нейтрофилов; в) активация Т-лимфоцитов через механизм макропиноцитоза; г) участие в метаболизме костной ткани. DBP обнаруживается в различных жидкостях: сыворотке крови, моче, грудном молоке, асцитной жидкости, ликворе, слюне, эякуляте; а также в органах человека: мозге, сердце, легких, селезенке, почках, плаценте, семенниках, матке (Al-Shammri et al., 2023; Delrue and Speeckaert, 2023; Vandikas et al., 2022).

Важнейшей функцией DBP является его способность активировать макрофаги, которую Gc-белок приобретает в результате сайт-специфического селективного дегликозилирования. Гликозилированный DBP содержит один трисахарид, ковалентно связанный с треонином в 420-й позиции и состоящий из N-ацетилгалактозамина (GalNAc) с двумя разветвленными остатками сахаров галактозы и сиаловой кислоты (Рисунок 8). DBP конвертируется в GcMAF под действием ферментов β-галактозидазы и сиалидазы, локализованных на клеточных мембранах активированных B- и T-лимфоцитов, соответственно. В результате образуется активный белок GcMAF, содержащий остаточный сахар N-ацетилгалактозамин с освободившимися от галактозы и сиаловой кислоты сайтами связывания (Nabeshima et al., 2020). Следует отметить, что такое селективное дегликозилирование DBP происходит естественным образом при развитии воспалительного ответа. Считается, что именно GalNAc в составе GcMAF обеспечивает активацию макрофагов. Активация макрофагов GcMAF выражается, прежде всего, в его способности усиливать их фагоцитарную функцию и продукцию реактивных форм кислорода. В результате активации на макрофагах повышается экспрессия специфических рецепторов, участвующих в распознавании опухоль-ассоциированных антигенов, а также в реализации прямой противоопухолевой активности через индукцию апоптоза/некроза опухолевых клеток (Dolgova et al., 2022; Kirikovich et al., 2024; Ostanin et al., 2019).

Макрофаги являются одной из основных популяций клеток, формирующих опухолевую строму (Cao et al., 2024). В опухолевом очаге в ходе прогрессии опухоли под действием секретируемых опухолью гуморальных факторов и в результате межклеточных контактов происходит поляризация моноцитарных предшественников в макрофаги M2/противовоспалительного фенотипа. Макрофаги M2 фенотипа совместно с MDSC ингибируют противоопухолевую активность эффекторных иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль (Kang et al., 2022). Под действием различных стимулов макрофаги способны переходить из M2 фенотипа в M1 фенотип. Это свойство макрофагов является базовым при активации противоопухолевых свойств фагоцитов, инфильтрирующих опухоль (Strizova et al., 2023; J. Zhang et al., 2022). Установлено, что GcMAF способен поляризовать M0 макрофаги в M1 опухоль-реактивный фенотип (Kirikovich et al., 2021). Такая экспериментально показанная способность активатора макрофагов ставит его в один ряд с известными факторами поляризации фагоцитов: M-CSF и GM-CSF (Hamilton et al., 2014). Именно это свойство GcMAF явилось

основанием поиска условий реполяризации М2 макрофагов ОАС в опухоль-реактивный М1 (опухоль-нейтральный М0) фенотип в сочетании с подходом «Каранахан». Предполагалось, что такое сочетание значительно повысит терапевтическую эффективность разрабатываемого подхода.

В лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН разработан оригинальный метод выделения и характеристики специфической активности активатора макрофагов GcMAF. Оригинальный препарат (GcMAF) оказывает активирующее действие на перитонеальные макрофаги (ПМФ) мыши ($p<0,05$), а также активирует профессиональные свойства дендритных клеток ($p<0,05$) и способствует М1 поляризации макрофагов человека исходно М0 фенотипа ($p<0,01$) в системе *in vitro*. Проведена оценка воздействия GcMAF на продукцию цитокинов клетками цельной крови здоровых доноров. Активатор стимулирует клетки цельной крови к продукции следующей палитры цитокинов: провоспалительных (TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-17, IL-18), противовоспалительных цитокинов (TGF-β, IL-4, IL-10), факторов роста (GM-CSF, G-CSF, VEGF) и хемокинов (IL-8, MCP) (Dolgova et al., 2022). Именно оригинальный препарат (GcMAF) отечественного происхождения был использован во всех экспериментах настоящего исследования.

10.2. Возможность объединения принципов трех подходов в одну универсальную противоопухолевую терапию

10.2.1. Общие элементы терапевтического подхода «Каранахан», ММХТ ЦФ и in situ вакцинации

Идея настоящего раздела состоит в том, чтобы определить, можно ли, используя одновременно одни и те же или принципиально близкие процедуры, применяемые в трех подходах, «завязать» всеохватывающий противоопухолевый иммунитет, разрушить иммуносупрессорную активность опухоль-ассоциированной стромы, индуцировать тотальный апоптоз опухолевых клеток и одновременно эрадицировать ОСК опухоли. Такой подход позволит усилить техники недостающими звеньями, а именно: в подход *in situ* вакцинации на платформе рецептор-лиганд/АПК, или в любой другой способ активации противоопухолевого иммунитета, например реполяризацию М2 макрофагов ОАС, внести элемент, позволяющий её использование в случае неиммуногенных или слабоиммуногенных опухолей; для подхода «Каранахан», включающего в качестве составной части ММХТ ЦФ, привязанного к репаративному циклу опухолевых клеток, внести элемент активации всеобъемлющего противоопухолевого иммунитета активацией вектора рецептор-лиганд/АПК или активировать другие противоопухолевые векторы иммунитета, например индуцировать реполяризацию М2 макрофагов ОАС.

Рассматривая проведенный в предыдущих разделах анализ, можно сказать, что при сравнении принципов и мишеней воздействия трёх подходов по существу речь идет о четырёх

независимых принципах воздействия на злокачественное новообразование. Во-первых, CpG в сочетании с антителами к молекулам иммунных контрольных точек или с антителами к факторам группы TNF активирует цитолитические механизмы инфильтрирующих опухоль иммунных клеток, активирует профессиональные свойства ДК, способствует разрушению опухолевых клеток, появлению в тесной близости к АПК всей совокупности опухолевых антигенов и их поглощению ДК «на месте», развитию всеобъемлющего адаптивного иммунитета. Во-вторых, ММХТ с использованием цитостатика ЦФ разрушает супрессивный вектор опухоли (Treg, MDSC), активирует инфильтрирующие опухоль иммунные клетки, рекрутирует периферические не супрессированные иммунные клетки в сайт опухолевого очага. ММХТ с использованием цитостатика ЦФ и CpG олигонуклеотидов усиливает все эффекты монотерапии ЦФ. В-третьих, GcMAF индуцирует реполяризацию М2 проопухолевых макрофагов в опухоль-реактивный М1 или опухоль-нейтральный М0 фенотип. В-четвертых, терапевтический подход «Карнахан» приводит к эрадикации ОСК и индукции масштабного апоптоза опухолевых клеток. Следует отметить, что ЦФ в случае подхода «Каранахан» в результате первых трех инъекций в течение 48-72 часов запирает клеточный цикл всех опухолевых клеток и запускает их апоптоз. При этом добавление в процедуру сложнокомпозиционного препарата dsDNAmix усиливает процесс активации апоптоза опухолевых клеток, запускает апоптоз ОСК, синхронизирует остаточные ОСК в G2/M(G1) фазе клеточного цикла, активирует профессиональные свойства ДК, осуществляет полную эрадикацию ОСК из опухолевого очага. Введение ЦФ и сложнокомпозиционного препарата dsDNAmix на 5-9 сутки после первой инъекции ЦФ окончательно эрадицирует ОСК опухоли. ЦФ, примененный на 5-9 сутки, как точка финальной эрадицирующей терапии одновременно выполняет роль хронометрического/метрономного фактора, снимающего супрессию иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль, рекрутирующего периферические иммунные клетки в сайт опухолевого очага и активирующего всю совокупность иммунных клеток в опухоли.

Объединение подходов должно быть основано на принципе дополнения противоопухолевого действия, вызываемого применением упомянутых терапий. Необходимо одновременно эрадицировать ОСК, индуцировать тотальный апоптоз опухолевых клеток, снять иммунологическую супрессию и активировать всеобъемлющий противоопухолевый иммунитет. Как было сказано ранее, терапевтический подход «Каранахан» обладает всеми чертами ММХТ с использованием цитостатика ЦФ и CpG олигонуклеотидов. Это означает, что подход «Каранахан» может полностью заместить совокупность эффектов ММХТ ЦФ, включающих разрушение супрессивного вектора опухоли (Treg, MDSC), активацию инфильтрирующих опухоль иммунных клеток, включая антигенпрезентирующие ДК, рекрутирование периферических иммунных клеток в сайт опухолевого очага. Принципиальное и исключительное

действие подхода «Каранахан» заключается в том, что он позволяет эрадицировать ОСК, что делает остаточную опухоль максимально чувствительной к действию активированного иммунитета.

При проведении терапии согласно подходу «Каранахан» М2 макрофаги ОАС лишаются гуморального щита, продуцируемого опухолью, и в этот момент времени становятся доступной мишенью для реполяризации и активации ***врожденных*** противоопухолевых реакций с применением специфического активатора макрофагов GcMAF. Такое введение в терапию активатора будет способствовать усилению эффекта разрушения толерогенности ОАС совместно с действием ЦФ.

Добавление инъекций антител к молекулам иммунных контрольных точек или антител к факторам группы TNF (Sagiv-Barfi et al., 2018) в терапию согласно подходу «Каранахан» позволит внести в терапию вектор активации всеобъемлющего противоопухолевого ***адаптивного*** иммунитета, проходящий через систему рецептор-лиганд. В данном случае функцию CpG будет выполнять сложнокомпозиционный препарат dsDNAmix, эффекты действия которого полностью повторяют все эффекты действия CpG.

10.2.2. Почему именно подход «Каранахан» является объединяющим для двух других перспективных противоопухолевых подходов?

При совмещении подхода «Каранахан» с *in situ* вакцинацией с использованием системы OX40 объединяющим элементом будет использование сложнокомпозиционного препарата dsDNAmix вместо CpG. Оба препарата, каждый в своей эффективной дозе, стимулируют схожую по силе активацию профессиональных свойств антигенпрезентирующих ДК (Ostanin et al., 2020), что является первой составляющей *in situ* вакцинации. В то же время сложнокомпозиционный препарат dsDNAmix в рамках подхода «Каранахан» будет индуцировать тотальный апоптоз опухолевых клеток и запускать процессы, определяющие эрадикацию ОСК. Вторая составляющая *in situ* вакцинации, а именно инъекции антител к OX40R, будет дополнительно активировать Т-клеточный ответ и дополнять терапевтический эффект подхода «Каранахан» развитием ***адаптивного*** иммунитета. GcMAF вакцинация будет активировать звено макрофагального ***врожденного*** иммунитета и в комбинации с хронометрическим введением ЦФ способствовать реполяризации клеток ОАС, включая TAM2.

При совмещении подхода «Каранахан» с ММХТ с использованием ЦФ объединяющими элементами будут: близкие дозы ЦФ; близкий по продолжительности отрезок времени между двумя первыми инъекциями ЦФ при ММХТ и близко сгруппированными, привязанными к репаративному циклу опухолевых клеток, тремя инъекциями цитостатика ЦФ и финальной четвертой инъекцией ЦФ, эрадицирующей ОСК, характерными для подхода «Каранахан». Полностью завершенная терапевтическая схема согласно индикаторным параметрам подхода

«Каранахан» приведет к индукции тотального апоптоза опухолевых клеток и запустит процессы, определяющие эрадикацию ОСК. Третья инъекция ЦФ согласно индикаторам ММХТ ЦФ дополнит терапевтический эффект подхода «Каранахан» (если опухоль до этого времени полностью не лизировалась в результате терапевтической эффективности применения подхода «Каранахан») разрушением супрессорной активности сохранившейся ОАС.

То есть, если к подходу «Каранахан» добавить один элемент от платформы *in situ* вакцинации системы αOX40 или GcMAF и один элемент от процедуры ММХТ ЦФ, то можно одновременно индуцировать четыре независимых воздействия на опухоль. Суммарный терапевтический эффект такого воздействия, как предполагается, не оставит шанса для выживания первичной опухоли и отдаленных метастазов (Рисунок 9).

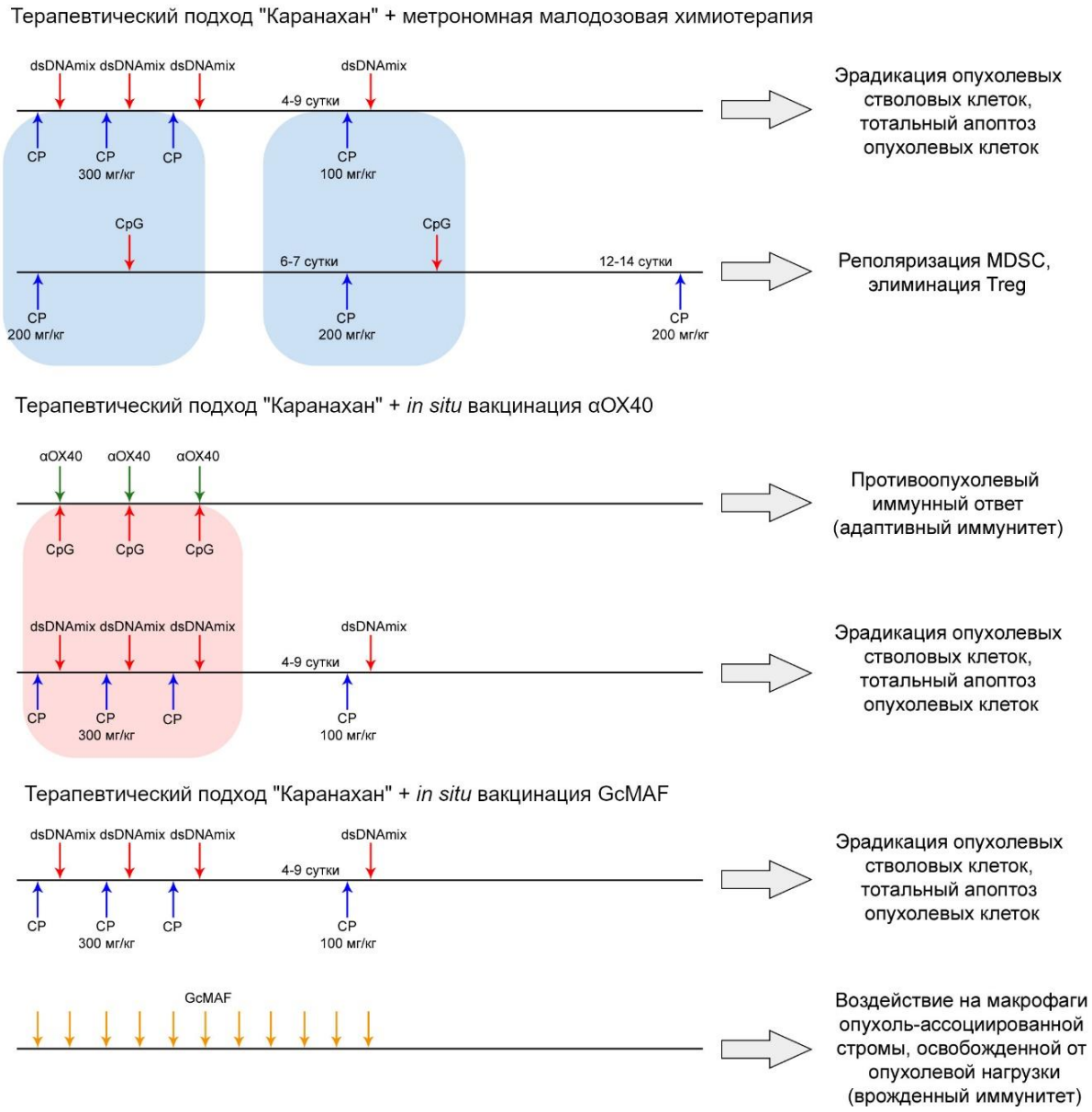


Рисунок 9. Сравнение подходов. Заштрихованные области обозначают пересекающиеся особенности подходов. ЦФ-циклофосфамид, dsDNAmix-сложнокомпозиционный препарат двуцепочечной ДНК, αOX40-антитела к OX40R, CpG- CpG олигонуклеотиды, GcMAF – групп-специфический активирующий макрофаги фактор.

Главным фактором объединения подходов будет являться фактор времени. Необходимо исключить элемент интерференции специфических механизмов действия одних вводимых контрагентов другими. Это означает, что при объединении подходов потребуется предварительная оценка времени активации ДК препаратом сложнокомпозиционного препарата dsDNAmix, времени активации системы клеток врожденного и адаптивного иммунитета антителами, GcMAF или иными различными технологическими платформами, времени

эрадикации ОСК, времени индукции тотального апоптоза и исключение возможности их негативного влияния друг на друга.

Следует отметить, что при использовании в качестве базовой терапии подхода «Каранахан» активация противоопухолевого иммунитета другими технологическим платформами может быть не менее эффективной, чем её сочетание с *in situ* вакцинацией.

Заключение по обзору литературы

Главная цель настоящего обзора литературы состояла в необходимости дать общее представление об иммуной системе, её основных составляющих и её взаимодействии с развивающейся опухолью. В рамках обзора дана характеристика стволовым опухолевым клеткам как основе и первопричине возникновения неотрансформированной ткани. Рассматриваются различные терапевтические подходы, направленные на разрушение опухолевого очага. Основным элементом обзора является теоретическая платформа, обосновывающая возможность объединения в один высокоэффективный терапевтический режим лечения пациентов с различными злокачественными новообразованиями трех современных подходов, объединенных одной идеей, а именно хронометрическими режимами воздействия на опухоль.

Именно экспериментальному поиску принципов объединения указанных подходов посвящено настоящее исследование.

Материалы и методы

1. Используемые реактивы

Для культуральных работ использовались: питательные среды Dulbecco’s Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12 (1:1)), Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) (Биолот, Санкт-Петербург, Российская Федерация); фетальная сыворотка крупного рогатого скота (FBS) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland); гентамицин (Дальхимфарм, Хабаровск, Российская Федерация); амфотерицин В (Синтез, Курган, Российская Федерация); стрептомицин, пенициллин (Биолот, Санкт-Петербург, Российская Федерация); β-меркаптоэтанол (Merck, Darmstadt, Germany). Для рутинных выделений и инъекций использовались физиологический раствор (Гротекс, Российская Федерация) и фосфатно-солевой буфер (PBS) (Медиген, Новосибирск, Российская Федерация). Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовались: dUTP-TAMRA (Biosan, Новосибирск, Российская Федерация); Taq-buffer, $MgCl_2$, dCTP, dGTP, dATP, dTTP, dNTP, Taq-полимераза (реактивы для ПЦР предоставлены Медиген, Новосибирск, Российская Федерация). Для приготовления препаратов с флуоресцентной меткой использовались: Antifade DABCO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) и DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Для анализа репаративного цикла использовались: митомицин С (MMC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); легкоплавкая агароза (Диаэм, Москва, Российская Федерация), саркозил (Serva, Heidelberg, Germany), протеиназа К (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), бромистый этидий (Медиген, Новосибирск, Российская Федерация). Для анализа клеточного цикла использовались: РНКаза А (Самсон-Мед, Санкт-Петербург, Российская Федерация) и йодид пропидия (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). В качестве активатора макрофагов использовался E. coli 0114: липополисахарид B4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Оценку активации макрофагов проводили при помощи Dynabeads M-280 (Invitrogen, Carlsbad, USA). Пермеабилизацию мембраны осуществляли за счет Тритона X-100 (VWR Life Science AMRESCO, Solon, USA). Для оценки выживаемости опухолевых клеток использовали: MTT реагент (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) и диметилсульфоксид (VWR Life Science AMRESCO, Solon, USA). Для приготовления гистологических препаратов использовались: краситель гимза, гематоксилин и эозин (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Для получения кДНК и проведения ПЦР в реальном времени использовались: реагент TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), MMLV RT kit (Евроген, Москва, Российская Федерация), БиоМастер HS-qПЦР Hi-ROX SYBR (2x) (Биолабмикс, Новосибирск, Росийская Федерация). Для индукции нетоза использовали PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). В качестве ингибиторов протеаз были

использованы PMSF, TPCK, N-ethylmaleimide (Solarbio, Beijing, China). Для мечения антител использовался Sulfo-Cyanine5 antibody labeling kit (3321-1rxn; Lumiprobe, Москва, Российская Федерация). Также в работе использовались изопропанол (Союзхимпром, Новосибирск, Российская Федерация), этиловый спирт (АО «Кемеровская фармацевтическая фабрика», Кемерово, Российская Федерация), метанол (Союзхимпром, Новосибирск, Российская Федерация), параформальдегид (AppliChem Panreac, Darmstadt, Germany) и стандартные растворы: ЭДТА, NH_4Ac, Трис-HCl, NH_4Cl, NaCl, ТЕ-буфер, ТАЕ-буфер.

2. Используемые приборы

В работе использовались следующие приборы: CO_2 инкубатор (5% CO_2, 95% влажность) (Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Germany); центрифуга Centrifuge 5810 (Eppendorf, Hamburg, Germany); ультрацентрифуга Beckman L8-70M Ultracentrifuge, ротор бакетный SW 50 Ti (Beckman Coulter, Brea, USA); диспергатор ультразвуковой УЗДН-2Т (НПП «УкрРосПрибор»); планшетный анализатор Victor X4 (PerkinElmer, Waltham, USA); бинокулярный микроскоп (МБС-9, СССР); микроскопы Zeiss Axio Imager M2, AxioObserver Z1 (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Deutschland); микроскоп Leica DM 400B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany); микроскоп OLYMPUS IX83P2ZF (Olympus Corporation, Tokyo, Japan); проточный цитофлуориметр-сортировщик клеток BD FACSAria™ III (BD, Franklin Lakes, USA); флуориметр Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA); ДНК-амплификатор T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA); ДНК-амплификатор в "реальном времени" QuantStudio5 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

3. Используемые программы

В работе были использованы следующие программы: ImageJ (NIH, Bethesda, USA); CASP (CASP, Wrocław, Poland); Vector NTI v.9 (Life Technologies, Wilmington, USA); Primer-BLAST (National Library of Medicine, USA); BD FACSDiva™ (BD, Franklin Lakes, USA); GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., Boston, USA).

4. Экспериментальные животные

В работе были использованы самцы и самки мышей C57BL/6 и CBA/Lac, самки мышей BALB/c в возрасте от 2 до 6 месяцев (вес 18-24 г), выведенные в ЦКП "Виварий конвенциональных животных" Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск, Российская Федерация). Животных содержали группами по 6-10 мышей в клетке со свободным доступом к пище и воде. Все эксперименты с животными проводились в строгом соответствии с принципами гуманности в соответствии с Директивами Совета Европейского сообщества (86/609/EEC) и были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Института цитологии и генетики СО РАН (протокол N 8 от 19 марта 2019 года). Опухолевая нагрузка не превышала рекомендуемых размеров (максимально

допустимый размер составлял 12-13 мм в диаметре); животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации шейных позвонков.

5. Опухолевые модели

Карцинома лёгкого Льюис была получена из коллекции ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Российская Федерация). Для получения солидных опухолей мышам линии C57BL/6 проводили внутримышечные инъекции в бедренные области задних лап по 2×10^6 клеток в 200 мкл физиологического раствора. Для анализов *in vitro* клетки карциномы Льюис инкубировали в питательной среде DMEM/F-12 (1:1), дополненной 20% FBS, 100 мкг/мл гентамицина и 1 мкг/мл амфотерицина B. Клеточная линия B-клеточной лимфомы A20 была предоставлена лабораторией иммуногенетики Института Молекулярной и Клеточной Биологии СО РАН (Новосибирск, Российская Федерация). Для получения солидных опухолей мышам линии BALB/c проводили внутримышечные инъекции в бедренные области задних лап по 5×10^6 клеток в 200 мкл физиологического раствора. Для анализов *in vitro* клетки B-клеточной лимфомы A20 инкубировали в питательной среде DMEM, дополненной 10% FBS, 100 ед/мл стрептомицина, 100 мг/мл пенициллина и 50 мкМ β-меркаптоэтанола. При проведении *in vitro* экспериментов опухолевые клетки инкубировали при 37°C в CO_2 инкубаторе (5% CO_2, 95% влажность). Размножение опухоли происходило *in vivo* в виде внутримышечных трансплантатов. Клеточная линия B-лимфомы человека, полученная из аспирата клеток костного мозга пациента с диагнозом множественная миелома, была получена в Научно-Исследовательском Институте Фундаментальной и Клинической Иммунологии (Новосибирск, Российская Федерация). Клетки культивировали в среде DMEM, дополненной 10% FBS и 40 мкг/мл гентамицина.

6. Терапевтические препараты

Циклофосфамид (ЦФ) был использован в форме раствора эндоксана (Baxter Oncology GmbH, Halle, Germany) в физиологическом растворе, стерилизованного через фильтр 0,22 мкм. Сложнокомпозиционный препарат двуцепочечной ДНК (препарат дцДНК, dsDNAmix) представляет собой смесь нативной и модифицированной азотистым ипритом геномной ДНК, выделенной из плаценты человека и из спермы лосося, фрагментированной до размеров 200-6000 п.н. Препарат является предметом промышленной собственности ООО «КАРАНАХАН» (Bogachev et al., 2018). Протокол получения групп-специфического активирующего макрофаги фактора – GcMAF – подробно описан в (Dolgova et al., 2022). GcMAF является объектом промышленной собственности ООО «АКТИВАТОР МАФ» (Bogachev et al., 2020). Антитела к OX40R (αOX40; Anti-OX-40 mAb, CD134, clone OX86, 559861, BD Biosciences, San Jose, USA) и CpG олигодезоксинуклеотид (5’-TsCsGsAsAsCsGsTsTsCsGsAsAsCsGsTsTsCsGsAsAsCsGsTsTsCsGsAsAsT) разводили в физиологическом растворе. Фосфоротиоатный олигодезоксинуклеотид, содержащий CpG-

мотивы, был синтезирован, как описано в (Miroshnichenko et al., 2019). ЦФ вводили внутрибрюшинно (в/б) в дозе 100 мг/кг, dsDNAmix вводили внутриопухолево (в/о) по 0,5 мг/мышь, GcMAF вводили внутриопухолево по 2 мкг/мышь, CpG вводили внутриопухолево по 50 мкг/мышь, αOX40 вводили внутриопухолево по 4мкг/мышь (в режиме монотерапии) и по 8 мкг/мышь (при объединении с подходом «Каранахан»). В некоторых экспериментах мышам трансплантировали опухоль в обе задние лапы, при этом внутриопухолевые инъекции препаратов проводили только в правую заднюю лапу (обработанная опухоль).

7. Используемые антитела и изотип-контроли

В работе использовались антитела и изотип-контроли от разных производителей. Используемые антитела и соответствующие им изотип-контроли от производителя BioLegend представлены в таблице 1 (BioLegend, San Diego, USA).

Таблица 1. Список используемых антител и изотип-контролей от производителя BioLegend.

Маркер	**Антитело**	**Кат. номер антитела**	**Изотип-контроль**	**Кат. номер изотип-контроля**
MDSC				
CD11b	APC anti-mouse/human CD11b Antibody	101212	APC Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl	400612
Ly-6G	PE anti-mouse Ly-6G Antibody	127607	PE Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl	400508
Ly-6C	FITC anti-mouse Ly-6C Antibody	128005	FITC Rat IgG2c, κ Isotype Ctrl	400705
Регуляторные Т-лимфоциты				
CD4	APC anti-mouse CD4 Antibody	100412	APC Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl	400612
CD25	FITC anti-mouse CD25 Antibody	101907	FITC Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl	400606
FOXP3	PE anti-mouse FOXP3 Antibody	126403	PE Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl	400608
CD8+Perf+ цитотоксические Т-лимфоциты				
CD3	FITC anti-mouse CD3 Antibody	100204	FITC Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl	400606

CD8b	PE anti-mouse CD8b Antibody	126607	PE Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl	400608
Perforin	APC anti-mouse Perforin Antibody	154303	APC Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl	400511
Хелперные Т-лимфоциты				
CD3	FITC anti-mouse CD3 Antibody	100204	FITC Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl	400606
CD4	APC anti-mouse CD4 Antibody	100412	APC Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl	400612
NK-клетки				
CD335 (NKp46)	PE anti-mouse CD335 (NKp46) Antibody	137603	PE Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl	400508
CD3	FITC anti-mouse CD3 Antibody	100204	FITC Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl	400606
CD11b	APC anti-mouse/human CD11b Antibody	101212	APC Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl	400612
Дендритные клетки				
CD80	FITC anti-mouse CD80 Antibody	104705	FITC Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl Antibody	400905
CD83	APC anti-mouse CD83 Antibody	121509	APC Rat IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody	400411

Используемые антитела и соответствующие им изотип-контроли от производителя Elabscience представлены в таблице 2 (Elabscience, Wuhan, China).

Таблица 2. Список используемых антител и изотип-контролей от производителя Elabscience.

Маркер	**Антитело**	**Кат. номер антитела**	**Изотип-контроль**	**Кат. номер изотип-контроля**
MDSC				
CD11b	APC-меченое антитело к CD11b	E-AB-F1081E	APC-меченое антитело для изотипич. контроля	E-AB-F09842E

	[M1/70] (человек, мышь)		IgG2b, каппа [LTF-2] (крыса)	
Ly-6G	PE-меченое антитело к Ly6G [1A8] (мышь)	E-AB-F1108D	PE-меченое антитело для изотипич. контроля IgG2a, каппа [2A3] (крыса)	E-AB-F09832D
Ly-6C	FITC-меченое антитело к Ly6C [Monts 1] (мышь)	E-AB-F1121C	FITC-меченое антитело для изотипич. контроля IgG2a, каппа [2A3] (крыса)	E-AB-F09832C

Дополнительно были использованы антитела к поверхностным рецепторам FcR и OX40R: антитело к FcR – Fluor® Violet 450 anti-mouse CD16/32 Antibody (E-AB-F0997Q; Elabscience, Houston, USA); антитело к OX40R – меченное флуорофором Sulfo-Cyanine5 anti-mouse антитело к TNFRSF4 (PAB519Mu01; Cloud-Clone Corp., Wuhan, China) (п.30).

8. Олигонуклеотидные последовательности праймеров

ПЦР-праймеры для плазмиды pBS были сконструированы при помощи Primer-BLAST. ПЦР-праймеры, специфичные к кодирующим областям генов мышиных провоспалительных и противовоспалительных факторов/цитокинов, были сконструированы с использованием программного обеспечения Vector NTI v.9. Все праймеры синтезированы фирмой ООО “БИОССЕТ” (Биоссет, Новосибирск, Российская Федерация). Последовательности используемых в исследовании праймеров представлены в таблице 3 (for – прямой праймер, rev – обратный праймер).

Таблица 3. Олигонуклеотидные последовательности праймеров, использованных в исследовании (for – прямой праймер; rev – обратный праймер).

Название праймера	**Олигонуклеотидная последовательность**
M13-for	5’ – GTAAAACGACGGCCAG – 3’
M13-rev	5’ – CAGGAAACAGCTATGAC – 3’
IL-1β-for	5’ – TCCAGGATGAGGACATGAGCAC – 3’
IL-1β-rev	5’ – GAACGTCACACACCAGCAGGTTA – 3’

TNF-α-for	5’ – AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA – 3’
TNF-α-rev	5’ – GGCACCACTAGTTGGTTGTCTTTG – 3’
IL-10-for	5’ – GACCAGCTGGACAACATACTGCTAA – 3’
IL-10-rev	5’ – GATAAGGCTTGGCAACCCAAGTAA – 3’
IL-12a-for	5’ – TGTCTTAGCCAGTCCCGAAACC – 3’
IL-12a-rev	5’ – TCTTCATGATCGATGTCTTCAGCAG – 3’
TGF-β1-for	5’ – GTGTGGAGCAACATGTGGAACTCTA – 3’
TGF-β1-rev	5’ – TTGGTTCAGCCACTGCCGTA – 3’
NOS2-for	5’ – TCACCTTCGAGGGCAGCCGA – 3’
NOS2-rev	5’ – TCCGTGGCAAAGCGAGCCAG – 3’
Arg1-for	5’ – GATTATCGGAGCGCCTTTCT – 3’
Arg1-rev	5’ – CCACACTGACTCTTCCATTCTT – 3’
IDO1-for	5’ – AGGATCCTTGAAGACCACCA – 3’
IDO1-rev	5’ – CCAATAGAGAGACGAGGAAG – 3’
GAPDH-for	5’ – AAATGGTGAAGGTCGGTGTG – 3’
GAPDH-rev	5’ – TGAAGGGGTCGTTGATGG– 3’

9. Выделение опухолевых клеток, мононуклеаров крови, клеток селезенки, перитонеальных макрофагов

Для выделения опухолевых клеток мышей умерщвляли, солидную опухоль выделяли, измельчали и гомогенизировали, клетки ресуспендировали в PBS и фильтровали через 40 мкм Nylon Cell Strainer (Falcon, Corning Life Sciences, Tewksbury, USA). Клетки селезенки выделяли аналогичным образом с дополнительной процедурой лизиса эритроцитов буфером с 130 мМ NH_4Cl. Кровь выделяли при декапитации мышей после цервикальной дислокации шейных позвонков, немедленно добавляли ЭДТА до 7 мМ и лизировали эритроциты буфером с 130 мМ NH_4Cl. Перитонеальные макрофаги (ПМФ) вымывали PBS из перитонеальной полости. Концентрацию выделенных клеток считали при помощи камеры Горяева.

10. Мечение ДНК флуоресцентным красителем TAMRA

Для создания ДНК-зонда, меченного флуорохромом, производилось мечение AluI повтора красителем tetramethylrhodamine (TAMRA). Мечение происходило при помощи полимеразной цепной реакции в реакционной смеси, содержащей Taq-buffer, 2 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ dCTP, 0,2 мМ dGTP, 0,2 мМ dATP, 0,16 мМ dTTP, 0,01 мМ dUTP-TAMRA, по 1 мкМ праймеров M13, 10 нг/мкл

матрицы, 0,1 ед./мкл Taq-полимеразы. Матрица представляла собой ДНК AluI повтора, клонированного в pBS по сайту EcoRV; при наработке с M13 праймеров получался фрагмент длиной 500 п.о. ПЦР проводили по следующему режиму: 1 цикл (×1): 95˚C – 3 минуты; 2 цикл (×33): 95˚C – 30 сек; 56˚C – 30 сек; 72˚C – 40 сек; 3 цикл (×1): 72˚C – 5 минут; хранение при 10˚C. Для очистки продукта ПЦР от невключившихся dUTP-TAMRA к смеси после проведения ПЦР добавляли ¼ объема 10M NH_4Ac и равный объем изопропанола. Инкубировали смесь при комнатной температуре в течение 10 минут, после чего осаждали центрифугированием в течение 15 минут при 15000 g . Промывали осадок 80% этиловым спиртом и растворяли в mQ H_2O.

11. Определение содержания дзОСК в опухоли

Для определения присутствия в опухоли стволовых опухолевых клеток к 5×10^5 свежевыделенных клеток в PBS добавляли Alu-TAMRA ДНК (0,1 мкг) и инкубировали 1 час в тёмном месте при комнатной температуре (Potter et al., 2018). Затем осаждали клетки при 400 g и 4°C в течение 5 минут, промывали PBS и наносили образец на предметное стекло с помощью цитоспина. Клетки покрывали каплей Antifade DABCO с добавлением DAPI (0,5 мкг/мл) и накрывали покровным стеклом. Микроскопический анализ проводился в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН с использованием Zeiss Axio Imager M2. Результаты анализировали в программе ImageJ: считали процент клеток, захвативших меченную TAMRA-ДНК (дзОСК), среди всех клеток на препарате.

12. Анализ цикла репарации в опухолевых клетках

Для оценки продолжительности репаративного цикла анализировалась динамика изменения количества двуцепочечных разрывов в опухолевых клетках после обработки клеток кросслинкирующим цитостатиком при помощи метода «ДНК-комет» в нейтральных условиях (Møller, 2018; Olive et al., 1990). 8×10^5 опухолевых клеток инкубировали в 1 мл среды DMEM, дополненной 1 мкг/мл ММС и 100 мкг/мл гентамицина, в течение часа при 37°C в CO_2 инкубаторе. После этого среду меняли на стандартную питательную среду. Каждые 6 ч отбирали 15×10^3 клеток и фиксировали в блоках легкоплавкой агарозы. Для фиксации клетки ресуспендировали в среде RPMI и добавляли легкоплавкую агарозу до 1%, затем заливали получившуюся суспензию в карманы объемом 40 мкл и охлаждали до 4°C. До проведения анализа блоки хранили в 0,5 М ЭДТА при 4°C. Нулевая точка представляла собой клетки без обработки ММС. Перед проведением электрофореза блоки споласкивали в ТЕ-буфере, инкубировали с лизирующим буфером (50 мМ ЭДТА, 1% саркозил, 1 мг/мл протеиназы К) в течение 20 минут при 50°C; окрашивали в течение 10 минут в буфере ТАЕ, содержащим бромистый этидий (0,5 мкг/мл). Блоки фиксировали на агарозной подложке и проводили электрофорез в нейтральных условиях (ТАЕ-буфер, содержащий бромистый этидий) с напряжением 36В (длина камеры 36 см; 1 В/см) в течение 30 минут. После этого блоки

высушивали в термостате при 37°С в течение суток. Микроскопический анализ проводился в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН с использованием Zeiss Axio Imager M2. Динамику появления и исчезновения двуцепочечных разрывов оценивали по параметру «момент хвоста» в программах CASP и ImageJ. Tail moment («момент хвоста») = Tail length (длина хвоста кометы) × %DNA in tail (процент ДНК, мигрировавшей из головы в хвост)/100 (Choucroun et al., 2001; Филиппов, 2014).

13. Определение времени синхронизации опухолевых клеток после трехкратной обработки цитостатиком в режиме, блокирующем выход клеток из репаративного процесса

Время терминальной обработки согласно подходу «Каранахан» (время синхронизации опухолевых клеток) определяется в эксперименте двумя путями: путем ежедневного анализа клеточного цикла опухолевых клеток, а также путем ежедневного анализа количества дзОСК в культуре опухолевых клеток после трехкратной обработки или экспериментальных животных, или первичной культуры опухолевых клеток кросслинкирующим цитостатком.

13.1. Анализ клеточного цикла опухолевых клеток

Для определения времени синхронизации опухолевых клеток путем анализа клеточного цикла: в случае с карциномой Льюис мышам с опухолью размером около 0,5-1 $см^3$ вводили ЦФ трижды с интервалом 28 ч; в случае с В-клеточной лимфомой А20 культуру опухолевых клеток *in vitro* подвергали трехкратной обработке кросслинкирующим цитостатиком ММС с интервалом 54 ч. Идентичность времени образования межцепочечных сшивок для ММС *in vitro* и ЦФ *in vivo* была экспериментально продемонстрирована ранее (Kisaretova et al., 2020). После окончания трехкратной обработки в случае с карциномой Льюис из мышей выделяли опухоль и переводили её в первичную культуру. Затем опухолевые клетки культивировали в питательной среде и каждый день в одно и то же время отбирали образец клеток и фиксировали их в 50% метаноле. В качестве нулевой точки были использованы: в случае с карциномой Льюис – опухолевые клетки из мышей, обработанных физиологическим раствором; в случае с В-клеточной лимфомой А20 – опухолевые клетки до воздействия ММС. Фиксированные клетки осаждали центрифугированием в избытке PBS, после чего инкубировали в PBS с добавлением РНКазы А (400 мкг/мл) и йодида пропидия в течение 1 часа при 37°С. Интенсивность флуоресценции, которую вызывает йодид пропидия, пропорциональна содержанию ДНК в клетках, что позволяет различать фазы клеточного цикла. Продвижение опухолевых клеток по клеточному циклу оценивали при помощи проточной цитометрии, которая проводилась в ЦКП проточной цитофлуориметрии ИЦиГ СО РАН на приборе BD FACSAria™ III и программном обеспечении BD FACSDiva™.

13.2. Анализ динамики процентного содержания дзОСК в культуре опухолевых клеток после трехкратной обработки ММС

Для определения времени синхронизации опухолевых клеток путем ежедневного анализа количества дзОСК из мыши выделяли опухоль, когда она достигла 1 $см^3$ в объёме. В течение суток свежевыделенные клетки инкубировали в питательной среде. Далее определяли процентное содержание дзОСК в культуре опухолевых клеток. Затем клетки разделяли на две части: (1) контрольные клетки, не подвергавшиеся обработкам; (2) клетки, обработанные трижды ММС с интервалом 28 ч. После обработок опухолевые клетки переводили в питательную среду без ММС и каждый день в одно и то же время отбирали образец клеток и определяли процентное содержание дзОСК.

14. Лечение экспериментальных животных

Мышам были трансплантированы опухолевые клетки и по достижении опухоли 64-343 $мм^3$ начинали инъекции терапевтических препаратов. Для оценки эффективности подхода «Каранахан» в режиме монотерапии: экспериментальным мышам с карциномой Льюис вводили ЦФ трижды с интервалом 28 часов, четвертая инъекция осуществлялась на 4 сутки от начала терапии, препарат dsDNAmix вводили через 18 часов после каждого ЦФ; экспериментальным мышам с В-клеточной лимфомой А20 вводили ЦФ трижды с интервалом 54 часа, четвертая инъекция осуществлялась на 7 сутки от начала терапии, препарат dsDNAmix вводили через 48 часов после каждого ЦФ. Для оценки эффективности препарата GcMAF в режиме монотерапии мышам ежедневно вводили препарат GcMAF, чередуя по дням внутрибрюшинные и внутриопухолевые инъекции. Для пробного объединения подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации препаратом GcMAF мышам проводили инъекции согласно подходу «Каранахан», дополненные введением препарата GcMAF сразу после каждой инъекции препарата dsDNAmix. Для оценки эффективности *in situ* вакцинации αOX40+CpG в режиме монотерапии мышам вводили CpG и αOX40 вместе три раза с интервалом в 48 часов в соответствии с опубликованной терапевтической схемой для *in situ* вакцинации (Sagiv-Barfi et al., 2018). Для пробного объединения подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации αOX40+CpG мышам проводили инъекции согласно подходу «Каранахан», дополненные введением αOX40 либо сразу, либо спустя 5 часов после каждой инъекции препарата dsDNAmix. Группы мышей, несущих опухоль (контрольные группы), получали аналогичные инъекции физиологического раствора. В ходе экспериментов были измерены размер опухоли, время возникновения рецидива и продолжительность жизни мыши. Размеры опухоли измеряли с помощью штангенциркуля, а объём опухоли рассчитывали как произведение трех измерений (в × д × ш). Одним из параметров оценки эффективности терапии был индекс торможения роста опухоли (ТРО). Он высчитывался в последний день, когда все мыши в эксперименте были живы, по формуле: $ТРО = (V_{контроль} –$

$V_{эксперимент})/V_{контроль}$ ×100%, где $V_{контроль}$ – это средний объём опухоли в контрольной группе, а $V_{эксперимент}$ – это средний объём опухоли в экспериментальной группе (Липенгольц и др., 2019). В одном из экспериментов с опухолью карциномы Льюис у мышей выделяли легкие и фиксировали их в 4% параформальдегиде. После фиксации метастазы в легких подсчитывали при помощи бинокулярного микроскопа МБС-9.

15. Активация перитонеальных макрофагов

ПМФ по 5 × 10^5 клеток/лунку, выделенные из мышей линии CBA/Lac или C57BL/6, культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS и 40 мкг/мл гентамицина, в течение 2-5 часов. Затем среду меняли на RPMI-1640 с добавлением 10% FBS либо в отсутствие (контроль), либо в присутствии следующих активаторов: E. coli 0114: липополисахарид B4 (LPS; 10 мкг/мл) в качестве положительного контроля, либо синтезированные витамин D-связывающий белок (DBP; 5 мкг/мл) и групп-специфический активирующий макрофаги фактор (GcMAF; 5 мкг/мл) (Kirikovich et al., 2023). Клетки инкубировали в CO_2 инкубаторе в течение 3 часов.

16. Оценка влияния кондиционной среды В-лимфомы на активность перитонеальных макрофагов

В среду с активированными (п.15) ПМФ добавляли 1V кондиционной среды от В-лимфомы. ПМФ инкубировали в CO_2 инкубаторе в течение 14 часов. Анализ фагоцитарной активности проводили, как написано в п. 18.

17. Воздействие на активированные препаратом GcMAF мышиные перитонеальные макрофаги лизатами опухоли Льюис

Лизаты опухоли Льюис получали путем гомогенизирования 0,5 г опухолевой ткани в 1 мл лизирующего буфера (50 мМ Трис-HCl (pH=8), 1 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl) с добавлением ингибиторов протеаз (1 мМ PMSF, 0,75 мМ TPCK, 1 мМ N-ethylmaleimide). Опухоль была выделена из контрольных мышей (не подвергшихся обработкам) и из экспериментальных мышей на 9-е сутки после начала терапии согласно подходу «Каранахан». После гомогенизации опухолевую ткань обрабатывали ультразвуком при 22 Гц в течение 1 минуты на приборе диспергатор ультразвуковой УЗДН-2Т. Затем полученный лизат центрифугировали при 1700 g в течение 15 минут при 4ºC. Надосадок отбирали и осветляли ультрацентрифугированием при 485000 g в течение 1 часа при 4ºC. Надосадок отбирали и хранили при -70ºC.

Для оценки взаимодействия опухолевых лизатов и активированных препаратом GcMAF ПМФ сначала воздействовали 5 часов препаратом GcMAF (5 мкг/мл) на прикрепившиеся за 12 часов ПМФ ($5×10^5$ клеток/лунку) в 24-х луночном планшете. Затем клетки промывали, помещали в 450 мкл среды RPMI-1640 с добавлением 10% FBS и 40 мкг/мл гентамицина и добавляли на 16 часов лизаты опухоли Льюис (50 мкл/лунку). В схемах с предобработкой ПМФ лизатами опухоли к прикрепившимся за 12 часов ПМФ в первую очередь добавляли лизаты опухолей (50

мкл/лунку) на 5 часов, затем ПМФ отмывали три раза PBS и добавляли GcMAF (5 мкг/мл) в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS и 40 мкг/мл гентамицина, на 18 часов.

Для оценки взаимодействия опухолевых лизатов и многократно и длительно активированных ПМФ их обрабатывали препаратом GcMAF (5 мкг/мл) в течение 3 суток с ежедневной заменой препарата, отмывали PBS и инкубировали в течение 24 часов в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS. Затем активированные ПМФ инкубировали в течение 10 часов с 50 мкл лизата опухоли в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS и 40 мкг/мл гентамицина. В случае 6-ти кратной обработки препаратом GcMAF (5 мкг/мл), его добавляли совместно с лизатом опухоли. После этого ПМФ отмывали PBS и инкубировали 4 часа в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS и 40 мкг/мл гентамицина. Затем к ПМФ в течение 2 суток снова добавляли препарат GcMAF (5 мкг/мл; для 5-ти и 6-ти кратной обработки) или инкубировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS и 40 мкг/мл гентамицина (для 3-кратной обработки).

18. Анализ активации фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мышей

Фагоцитарную функцию ПМФ оценивали согласно методике, представленной в работе (Ishikawa et al., 2014). ПМФ рассаживали в культуральном планшете и культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, в течение 18 ч для прикрепления. В каждую лунку добавляли магнитные шарики Dynabeads M-280 (60 мкг/лунку), инкубировали в течение 30 мин и трижды отмывали PBS. ПМФ фотографировали в проходящем свете с использованием инвертированного микроскопа AxioObserver Z1 и подсчитывали количество интернализованных гранул (IBN). Фагоцитарную активность ПМФ оценивали по формуле: IBN = количество интернализованных шариков/количество ПМФ. Для статистического анализа IBN учитывали данные 4-х независимых экспериментов, в каждом эксперименте оценивали 300–500 клеток. Учет клеток был проведен из нескольких полей, расположенных в разных частях лунки планшета.

Также фагоцитирующая активность ПМФ оценивалась с помощью МТТ-теста по эффективности захватывания субстрата МТТ (п.21). За 100% активность брали активность ПМФ, выделенных из интактной (здоровой) мыши.

19. Лечение карциномы лёгкого Льюис, используя подход «Каранахан» в сочетании с in situ вакцинацией активатором макрофагов GcMAF

Мышам линии C57BL/6 были трансплантированы опухолевые клетки карциномы Льюис и по достижении опухоли 216–512 мм^3 начинали инъекции препаратов. Для оценки эффективности подхода «Каранахан» в сочетании с *in situ* вакцинацией GcMAF экспериментальным мышам вводили ЦФ трижды с интервалом 28 часов, четвертая инъекция осуществлялась на 4 сутки от начала терапии, препарат dsDNAmix вводили через 18 часов после каждого ЦФ. Препарат GcMAF вводили за три часа до каждой обработки ЦФ; после финальной обработки препаратом dsDNAmix вводился препарат GcMAF в течение трех дней 3 раза в день

(115, 119, 124, 138, 143, 148, 162, 167, 172 часа) и в следующие два дня по одному разу в день (191 и 215 час). Суммарно мыши получили 15 инъекций GcMAF по 2 мкг. Контрольная группа получала аналогичные инъекции физиологического раствора. В ходе эксперимента были измерены размер опухоли, время возникновения рецидива и продолжительность жизни мыши. Размеры опухоли измеряли с помощью штангенциркуля, а объём опухоли рассчитывали как произведение трёх измерений (в × д × ш). Одним из параметров оценки эффективности терапии был индекс торможения роста опухоли (ТРО).

20. Анализ изменения численности популяций иммунных клеток в опухоли, селезёнке, среди мононуклеаров крови и перитонеальных макрофагов

Для оценки развития иммунного ответа на 15, 17 и 22 сутки или на 16 сутки после начала обработок выделяли опухоль, селезёнку, мононуклеары крови и ПМФ. Для анализа популяций регуляторных Т-лимфоцитов и киллерных Т-лимфоцитов клетки фиксировали в 2% параформальдегиде и пермеабилизировали 0,1% Тритоном X-100. Для блокирования неспецифического связывания ко всем клеткам добавляли PBS, содержащий 10% FBS, и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Исследуемые клетки (2×10^5) инкубировали в темноте в течение 30-60 минут при комнатной температуре с антителами и изотип-контролями (по 0,25 мкг; п.7, таблица 1). Проточная цитометрия проводилась в ЦКП проточной цитофлуориметрии ИЦиГ СО РАН на приборе BD FACSAria™ III и при помощи программного обеспечения BD FACSDiva™.

21. MTT-тест

Образцы иммунных клеток мышей (мононуклеары крови, спленоциты и перитонеальные макрофаги) по 5×10^5 клеток инкубировали с 10^6 клеток опухоли Льюис. За 100% выживаемость брали выживаемость отдельно культивируемых в среде клеток опухоли Льюис. Совместную инкубацию клеток проводили в течение 24 ч. Затем к клеткам добавляли свежеприготовленный раствор MTT (0,5 мг/мл) и инкубировали в течение 2-3 ч (Stockert et al., 2012). После инкубации планшет с клетками центрифугировали при 400 g в течение 5 минут, супернатант удаляли, образовавшиеся кристаллы растворяли в 500 мкл диметилсульфоксида. Отбирали аликвоты по 100 мкл в 96-луночный планшет, т.е. по 4 точки для каждого образца, и измеряли оптическую плотность при 550 нм с помощью планшетного анализатора Victor X4, вычитая фон при 616 нм.

22. Приготовление мазков опухоли

Из мышей выделяли опухоль, кусок опухоли несколько раз отпечатывали на предметном стекле. Мазки опухоли фиксировались 7-10 минут метанолом, окрашивание проводилось красителем Гимза в разведении 1/10 деионизированной H_2O в течении 30 минут. Анализ проводился на микроскопе Leica DM 400B.

23. Получение кДНК

Суммарную РНК из опухолей и ПМФ выделяли с использованием реагента TRIzol в соответствии с инструкциями производителя. Количество РНК определяли на флуориметре Qubit 4. Реакцию обратной транскрипции проводили на матрице поли-А мРНК с использованием амплификатора T100 Thermal Cycler и набора MMLV RT kit по протоколу производителя.

24. ПЦР анализ

Полимеразную цепную реакцию проводили в реакционной смеси, содержащей Taq-buffer, 2 мМ $MgCl_2$, 0,2мМ dNTP, по 0,2 мкМ праймеров, 0,02 нг/мкл матрицы, 0,1 ед./мкл Taq-полимеразы. ПЦР проводили по следующему режиму: 1 цикл (×1): 95˚С – 3 минуты; 2 цикл (×33): 95˚С – 30 сек; 56˚С (Arg1, IDO1, GAPDH)/ 59˚С (IL-1β, TNF-α, IL-12a, IL-10, TGF-β1, GAPDH)/ 64˚С (NOS2, GAPDH) – 30 сек; 72˚С – 40 сек; 3 цикл (×1): 72˚С – 5 минут; Хранение при 10˚С. Далее наработанные фрагменты детектировали путем электрофореза в агарозном геле.

25. ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени проводили в 96-луночных планшетах с помощью реагентов БиоМастер HS-qПЦР Hi-ROX SYBR (2x) по протоколу производителя на приборе QuantStudio5. Анализ каждого образца был проведен в трёх повторах. Относительный уровень экспрессии определяли методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. В качестве группы контроля использовали мышей с развитой опухолью, не подверженных обработкам (или интактные ПМФ), уровень экспрессии целевого гена в которых принимался за 1. Ген *GAPDH* был выбран в качестве референсного гена. ПЦР в реальном времени проводили по следующему режиму: 95°С в течение 10 минут; 40 циклов: 95°С в течение 30 сек, 56°С (Arg1, IDO1, GAPDH)/ 59°С (IL-1β, TNF-α, IL-12a, IL-10, TGF-β1, GAPDH)/ 64˚С (NOS2, GAPDH) в течение 30 сек, 72°С в течение 30 сек; заключительная стадия плавления при медленном нагреве от 6 до 95°С.

26. Патоморфологический анализ органов мышей

При появлении признаков приближающейся гибели (появление горба, резкая потеря веса, уменьшение локомоторной активности) мышей выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации шейных позвонков. Из экспериментальных и контрольных мышей выделяли органы (печень, селезёнка, тонкий и толстый кишечник, лёгкие) и опухоль из бедренной области, обработанной препаратами, и фиксировали их в 4% нейтральном параформальдегиде. Куски органов обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли ксилолом, заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной до 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Просмотр препаратов и микрофотосъемка проводились на световом микроскопе AxioImager ZI.

27. Анализ изменения численности популяций MDSC среди мононуклеаров крови мышей, получавших лечение согласно подходу «Каранахан»

Мышам линии BALB/c были трансплантированы опухолевые клетки В-клеточной лимфомы А20 и по достижении опухоли 64 мм^3 начинали инъекции терапевтических препаратов согласно подходу «Каранхан»: ЦФ трижды с интервалом 54 часа, четвертая инъекция осуществлялась на 7 сутки от начала терапии, препарат dsDNAmix вводили через 48 часов после каждого ЦФ. Контрольная группа получала аналогичные инъекции физиологического раствора. Мононуклеары крови выделяли спустя 5 часов после каждой обработки согласно подходу «Каранахан» (одна обработка=ЦФ+dsDNAmix), для каждой временной точки n=4. Для блокирования неспецифического связывания ко всем клеткам добавляли PBS, содержащий 10% FBS, и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Исследуемые клетки (2×10^5) инкубировали в темноте в течение 30-60 минут при комнатной температуре с антителами и изотип-контролями (по 0,25 мкг). Были использованы антитела к CD11b, Ly-6C, Ly-6G и соответствующие изотип-контроли (п.7, таблица 2). Проточная цитометрия проводилась в ЦКП проточной цитофлуориметрии ИЦиГ СО РАН на приборе BD FACSAria III и программном обеспечении BD FACSDiva™.

28. Оценка количества клеток-супрессоров миелоидного происхождения с фенотипом CD11b+Ly-6G+, активированных к нетозу, после применения подхода «Каранахан»

Мышам линии BALB/c были трансплантированы опухолевые клетки В-клеточной лимфомы А20 и по достижении опухоли 64 мм^3 начинали инъекции терапевтических препаратов согласно подходу «Каранхан». Контрольная группа получала аналогичные инъекции физиологического раствора. Мононуклеары крови выделяли спустя 5 часов после первой и четвертой обработок согласно подходу «Каранахан». В это же время мононуклеары крови выделяли из контрольных мышей (мыши с развитой опухолью). Исследуемые клетки ($2,5\times10^5$) инкубировали с антителами (0,5 мкг/лунку) в 24-луночном планшете (1,864 см^2 площадь роста) в 500 мкл среды DMEM. Были использованы антитела к CD11b и Ly-6G (п.7, таблица 1). Для индукции нетоза в каждую лунку добавляли PMA (32 нМ). Мононуклеары крови инкубировали с антителами и PMA в течение 3 часов при 37°C в CO_2 инкубаторе. Затем к клеткам аккуратно, предотвращая ресуспендирование и перемешивание клеток, добавляли DAPI (1,44 мкМ). Мононуклеары крови инкубировали с DAPI в течение 15 мин при 37°C в CO_2 инкубаторе. Анализ количества клеток, активированных к нетозу, проводили при помощи конфокальной микроскопии на OLYMPUS IX83P2ZF в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН. Оценивался процент CD11b+DAPI+Ly-6G+ клеток среди всех CD11b+ клеток при помощи программы Image J.

29. Оценка количества клеток миелоидного происхождения, несущих на своей поверхности FcR и OX40R, после терапии согласно подходу «Каранахан»

Мышам линии BALB/c были трансплантированы опухолевые клетки В-клеточной лимфомы A20 и по достижении опухоли 1,4 $см^3$ начинали инъекции терапевтических препаратов согласно подходу «Каранхан». Контрольная группа получала аналогичные инъекции физиологического раствора. На 6 сутки после начала терапии выделяли мононуклеары крови. В это же время мононуклеары крови выделяли из контрольных (мыши с развитой опухолью) и интактных мышей (здоровые мыши). Для блокирования неспецифического связывания ко всем клеткам добавляли PBS, содержащий 10% FBS, и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Исследуемые клетки (2×10^5) инкубировали в темноте в течение 30-60 мин при комнатной температуре с антителами (0,25 мкг). Были использованы антитела к CD11b, Ly-6G, Ly-6C (п.7, таблица 1), FcR, OX40R (п.7, п.30). Проточная цитометрия проводилась в ЦКП проточной цитофлуориметрии ИЦиГ СО РАН на приборе BD FACSAria III и программном обеспечении BD FACSDiva™.

30. Мечение антител αOX40

Мечение поликлональных anti-mouse антител к TNFRSF4 (п.7) осуществлялось при помощи Sulfo-Cyanine5 antibody labeling kit согласно инструкции производителя.

31. Лечение В-клеточной лимфомы A20, используя совмещенный терапевтический режим, объединяющий подход «Каранахан» и in situ вакцинацию CpG/αOX40

Мышам линии BALB/c были трансплантированы опухолевые клетки В-клеточной лимфомы A20 и по достижении опухоли 64 $мм^3$ начинали инъекции препаратов. Для оценки эффективности подхода «Каранахан» в сочетании с *in situ* вакцинацией αOX40 экспериментальным мышам вводили ЦФ трижды с интервалом 54 часа, четвертая инъекция осуществлялась на 7 сутки от начала терапии, препарат dsDNAmix вводили через 48 часов после каждого ЦФ. Препарат αOX40 вводили через 167 часов и 335 часов после первой инъекции ЦФ. Контрольная группа получала аналогичные инъекции физиологического раствора. В ходе эксперимента были измерены размер опухоли, время возникновения рецидива и продолжительность жизни мыши. Размеры опухоли измеряли с помощью штангенциркуля, а объём опухоли рассчитывали, как произведение трёх измерений (в × д × ш). Одним из параметров оценки эффективности терапии был индекс торможения роста опухоли (ТРО).

32. Оценка аддитивности/синергии комбинации подхода «Каранахан» и in situ вакцинации

Синергию оценивали по модели Блисса (Bliss independence). Эффекты каждой монотерапии (E_A, E_B) и комбинированной терапии (E_{AB}) оценивали на основе площади под кривой роста опухолей (AUC). Ожидаемый комбинированный эффект рассчитывали по формуле: $E_{AB}=E_A+E_B–E_A\times E_B$. Индекс комбинации (CI) рассчитывали как отношение ожидаемого

комбинированного эффекта к наблюдаемому эффекту комбинации. CI < 1 => синергия; CI = 1 => аддитивность; CI > 1 => антагонизм (Duarte and Vale, 2022).

33. Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.1. Достоверность различий оценивалась с помощью U-критерия Манна-Уитни; Множественного t-теста, Метод Бенджамини-Иекутиели; Log-rank-теста (тест Мантеля-Кокса); Критерия Краскела-Уоллиса; χ^2-теста. Выявленные различия считались статистически значимыми при: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$. Статистическая оценка результатов ПЦР в реальном времени была проведена на основе экспериментальных и инструментальных повторений.

Результаты

Экспериментальный дизайн исследования

Исследование состоит из двух частей (Приложение 1).

В первой части для анализа аддитивного/синергичного противоопухолевого действия подхода «Каранахан» и активности врожденного иммунитета была выбрана *in situ* вакцинация активатором макрофагов GcMAF. В качестве экспериментальной модели использовалась слабоиммуногенная карцинома легких Льюис, перевиваемая мышам линии C57BL/6 (Рисунок 10).

Во второй части для анализа аддитивного/синергичного противоопухолевого действия подхода «Каранахан» и активности адаптивного иммунитета была выбрана *in situ* вакцинация антителами к OX40R. В данном случае использовалась иммуногенная В-клеточная лимфома A20, перевиваемая мышам линии BALB/c (Рисунок 10).



Рисунок 10. Шкала иммуногенности. Приведены индексы ind_{Last} для двух типов опухолей. Опухоль В-клеточной лимфомы A20 определяется как высокоиммуногенная, опухоль карциномы лёгкого Льюис как обладающая минимальной иммуногенностью (Ruzanova et al., 2021).

Были выделены четыре основных направления исследования:

1) оценка основных параметров подхода «Каранахан» для выбранной экспериментальной модели;

2) характеристика противоопухолевого действия подхода «Каранахан» на выбранной экспериментальной модели;

3) характеристика противоопухолевого действия *in situ* вакцинации на выбранной экспериментальной модели;

4) оценка аддитивного/синергичного противоопухолевого действия при объединении подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации выбранными факторами.

Базовые экспериментальные данные дополняют многочисленные контрольные эксперименты, раскрывающие и верифицирующие полученные в базовых экспериментах выводы.

Динамика роста опухолевого трансплантата в зависимости от пола экспериментального животного

Так как в работе использовались животные обоих полов, была проанализирована скорость роста опухолевого графта в зависимости от пола животного. Оказалось, что внутримышечный опухолевый графт растет с одинаковой скоростью у самцов и у самок, достоверной разницы в динамике роста опухоли обнаружено не было (Рисунок 11).

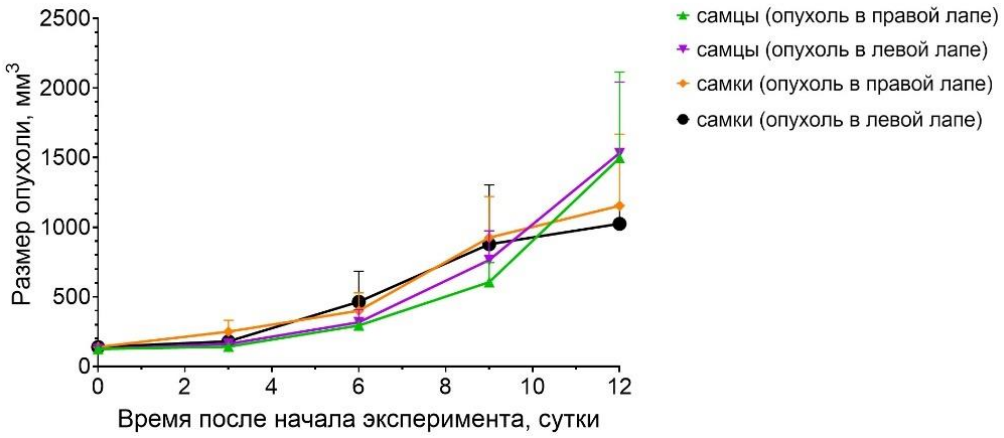


Рисунок 11. Сравнение динамики роста карциномы лёгкого Льюис у самцов и у самок. Статистически значимых различий между группами не обнаружено: $p > 0{,}9999$ (Критерий Краскела-Уоллиса); $p > 0{,}05$ (Множественный t-тест, Метод Бенджамини-Иекутиели).

По этой причине допускается использование мышей разных полов в различных экспериментах (в рамках одного эксперимента пол был одинаковым). Более того, в каждом эксперименте была введена контрольная группа, относительно которой оценивалась эффективность той или иной терапии.

Часть 1. Синергичное противоопухолевое действие подхода «Каранахан» и активности врожденного противоопухолевого иммунитета, индуцированного *in situ* вакцинацией GcMAF

1. Определение основных параметров подхода «Каранахан» на модели слабоиммуногенной карциномы лёгких Льюис, перевиваемой мышам линии C57BL/6

1.1. Интернализация TAMRA-меченого ДНК-зонда клетками карциномы Льюис

На рисунке 12А приведен цитологический анализ, демонстрирующий присутствие дзОСК в опухоли карциномы Льюис. Процентное содержание дзОСК в опухоли карциномы Льюис составило 8%.

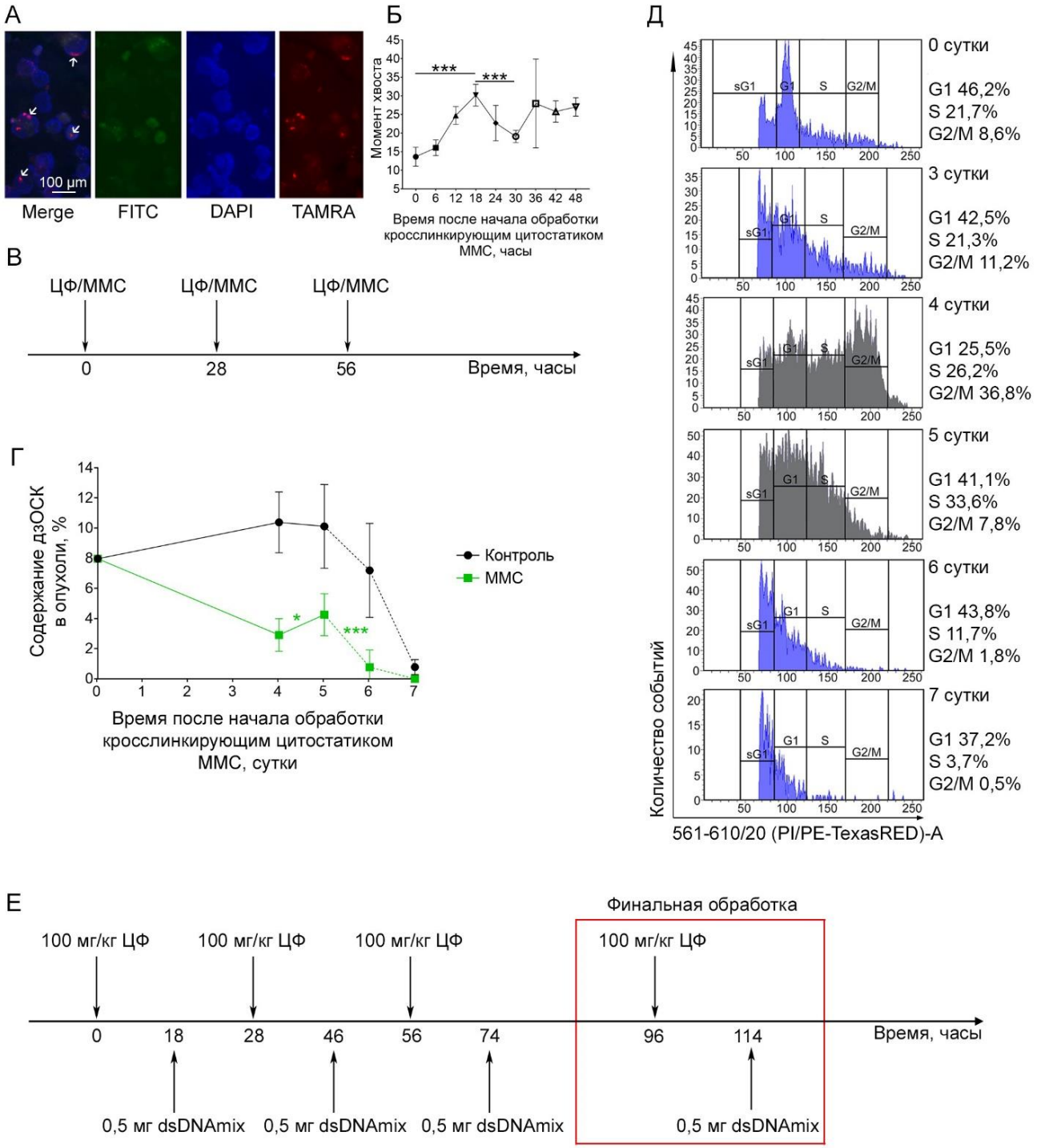


Рисунок 12. Характеристика базовых параметров терапевтического режима «Каранахан» для карциномы лёгкого Льюис. А) дзОСК. Приведены изображения в каналах FITC, DAPI, TAMRA и объединенное изображение (Merge). Стрелками указан специфический TAMRA-сигнал. Отрезок соответствует 100 мкм. Б) Анализ репаративного цикла клеток. Динамика количества двуцепочечных разрывов в опухолевых клетках после инкубирования с митомицином С (ММС), оцененная методом «ДНК-комет». *** – различия статистически значимы, $p < 0,001$ (U-критерий Манна-Уитни). В) Терапевтическая схема трехкратной обработки, разработанная на основе параметров репаративного цикла. Для культуры клеток применяется митомицин С (ММС), для

обработки животных применяется циклофосфамид (ЦФ). Г) Динамика дзОСК в контроле и после трехкратной обработки клеток ММС. Отличия между временными точками в группе ММС статистически значимы: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ (U-критерий Манна-Уитни). Д) Определение дня синхронизации опухолевых клеток после трехкратной обработки мышей с развитой опухолью циклофосфамидом (ЦФ). Анализ клеточного цикла проводили при помощи окрашивания клеток йодидом пропидия. Интенсивность флуоресценции, которую вызывает йодид пропидия, пропорциональна содержанию ДНК в клетках, что позволяет различать фазы клеточного цикла. Ось X представляет относительное содержание ДНК, определяемое флуоресценцией йодида пропидия; ось Y представляет количество клеток с соответствующим содержанием ДНК. Рядом с графиками указано процентное содержание клеток в соответствующих фазах клеточного цикла. График, демонстрирующий момент синхронизации в G2/M, а также график синхронного перехода клеток в G1 фазу отмечены серым цветом. 0 сутки – клетки карциномы Льюис, выделенные из мышей, обработанных физиологическим раствором. Е) Схема терапии согласно режиму «Каранахан» для карциномы лёгкого Льюис на мышах линии C57BL/6, включающая инъекции 100 мг/кг ЦФ (в/б) и 0,5 мг/мышь препарата dsDNAmix (в/о).

1.2. Анализ временных параметров репаративного цикла клеток карциномы Льюис методом «ДНК-комет» после обработки ММС

Для анализа продолжительности репаративного цикла после обработки клеток карциномы Льюис *in vitro* кросслинкирующим цитостатиком ММС оценивалась динамика количества двуцепочечных разрывов в клетках методом «ДНК-комет» (comet assay).

Было установлено, что продолжительность репаративного цикла клеток карциномы Льюис после обработки кросслинкирующим цитостатиком ММС составляет 30 часов (Рисунок 12Б). Максимальное число двуцепочечных разрывов (переход от фазы NER к фазе HR) наблюдалось через 18 часов после воздействия ММС. При составлении временной схемы подхода «Каранахан» это время использовалось для введения препарата dsDNAmix.

По результатам анализа была составлена схема трех обработок кросслинкирующим цитостатиком карциномы Льюис (Рисунок 12В). Время обработок ЦФ было выбрано со смещением на 2 часа в сторону начала терапии (28 ч), что предотвращало выход из ареста клеток, заканчивающих репарацию первыми.

1.3. Определение времени синхронизации клеток карциномы Льюис

Время терминальной обработки согласно подходу «Каранахан», приводящей к полной эрадикации ОСК, определяется в эксперименте после трёх обработок кросслинкирующим цитостатиком (ММС или ЦФ). Было использовано два подхода для его определения: 1) ежедневный анализ количества дзОСК; 2) ежедневный анализ клеточного цикла.

1.3.1. Анализ содержания дзОСК после трехкратной обработки культуры опухолевых клеток ММС

Анализ динамики содержания дзОСК среди опухолевых клеток показал, что процентное содержание дзОСК падает на 4 сутки и затем возрастает на 5 сутки, после чего на 6 сутки наблюдается снижение содержания дзОСК практически до нуля как в экспериментальных образцах, так и в контроле (клетки без обработок), что, по-видимому, связано с нежизнеспособностью клеток карциномы Льюис в культуре (Рисунок 12Г, кривые содержания дзОСК после 5 суток приведены пунктиром).

1.3.2. Анализ клеточного цикла опухолевых клеток после трехкратной обработки мышей ЦФ

Было установлено, что накопление клеток в G2/M фазе наблюдается на 4 сутки (Рисунок 12Д). На 5 сутки детектировался конечный апоптоз синхронизированных ранее в G2/M клеток и переход ОСК и остатков коммитированных клеток в G1 фазу.

При переходе опухолевых клеток из G2/M фазы в G1 фазу клеточного цикла наблюдается гибель основной массы опухолевых клеток (в основном коммитированных опухолевых клеток). При этом увеличивается процентное содержание дзОСК относительно всей популяции опухолевых клеток, что говорит о том, что ОСК осуществили переход из G2/M в G1 фазу клеточного цикла и синхронизировались в G1 фазе.

Полученные результаты двух независимых анализов определили время финальной обработки цитостатиком на 4 сутки или спустя 96 ч после первой обработки. Именно в этот момент времени наблюдалось минимальное содержание дзОСК и синхронное накопление клеток в G2/M фазе. Введение препарата dsDNAmix устанавливается в момент перехода фазы NER в фазу HR. Для опухоли Льюис он соответствовал 18 ч от каждого введения цитостатика. Таким образом, последняя инъекция препарата dsDNAmix приходится на 5 сутки от начала терапии (спустя 18 часов после введения цитостатика) и приводит к финальной эрадикации ОСК.

В результате проведенного анализа была определена схема обработки ЦФ и препаратом dsDNAmix для карциномы лёгкого Льюис (Рисунок 12Е).

Терапевтическая схема подхода «Каранахан» для карциномы лёгкого Льюис включала в себя три инъекции цитостатика ЦФ с интервалом 28 часов между инъекциями, четвертая финальная обработка цитостатиком ЦФ проводилась на 4 сутки или спустя 96 часов после первой обработки. Препарат dsDNAmix вводили спустя 18 часов после каждой обработки цитостатиком ЦФ.

2. Характеристика противоопухолевого действия подхода «Каранахан» на модели карциномы лёгкого Льюис

Разработанная терапевтическая схема обработки опухоли была применена в нескольких экспериментах, выполненных в различные сезоны и в два следующих один за другим года в двух

вариантах – с прививкой трансплантата в одну или две лапы. По достижении опухоли 64-125 мм^3 в объёме мышей обрабатывали согласно выбранной терапевтической схеме (Рисунок 12Е). Эксперименты были проведены в мае 2019 и 2020 г: эксперимент №1 и эксперимент №2, соответственно (один графт, правая задняя лапа, она же и обрабатывалась, Рисунок 13); и в марте и ноябре 2019 г: эксперимент №3 и эксперимент №4, соответственно (два графта, две задние лапы, обрабатывалась правая задняя лапа, Рисунок 14). Карцинома Льюис – это слабоиммуногенная опухоль, характеризующаяся высокой метастатической активностью (Mayo, 1972), она метастазирует в легкие в 100% случаев. По этой причине по окончании эксперимента №3 был проведен подсчет метастазов в лёгких мышей (см. приложение 5). В среднюю продолжительность жизни были включены полностью вылечившиеся животные, которые погибли в результате естественной смерти. Для того чтобы определить среднюю выживаемость в группе, продолжительность жизни этих мышей была принята за 100 суток. Животные, которые были выведены из эксперимента, не учитывались в подсчете средней продолжительности жизни. Динамика роста опухолей индивидуально по мышам представлена в приложениях 4, 5.

2.1. Один очаг опухоли

2.1.1. Эксперимент №1. Май 2019г

Опухоли полностью исчезли у 90% животных к 11 дню терапии. Рецидивы развивались последовательно и к 53-м суткам встречались у 80% животных (Рисунок 13А, Б, Д). К 100-му дню после начала терапии 10% мышей были живы (Рисунок 13В). Средняя продолжительность жизни составила 14 и 56 суток в контрольной и экспериментальной группах, соответственно (Рисунок 13Г). Индекс торможения роста опухоли, вычисленный на 11 сутки эксперимента, составил 99,6%.

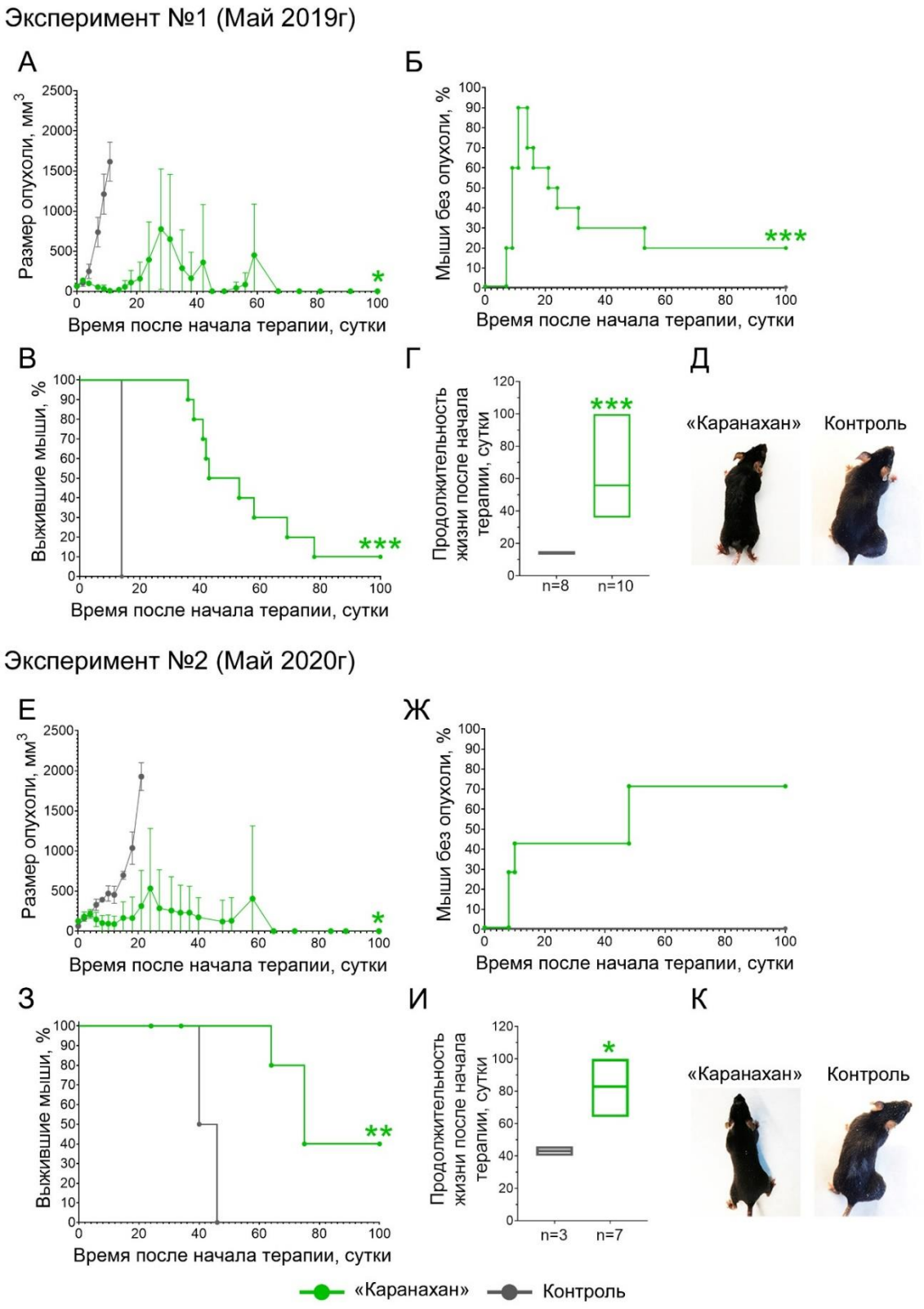


Рисунок 13. Оценка эффективности подхода «Каранахан» на модели карциномы Льюис с прививкой графта внутримышечно в одну заднюю лапу: эксперимент №1 (А-Д) и эксперимент №2 (Е-К). Мышей обрабатывали ЦФ (в/б) по 100 мг/кг и препаратом dsDNAmix (в/о) по 0,5 мг/мышь согласно выбранной терапевтической схеме. Эксперимент №1: группа «Каранахан» – 10 мышей, контрольная группа – 8 мышей. Эксперимент №2: группа «Каранахан» – 7 мышей,

контрольная группа – 3 мыши. А и Е) Сравнение динамики роста опухолей в экспериментальной и контрольной группах, приведены средние значения ± стандартное отклонение. * – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,05$ (Множественный t-тест, Метод Бенджамини-Иекутиели). Б и Ж) Динамика изменения количества мышей без опухоли. *** – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,001$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). В и З) Выживаемость мышей. Отличия от контрольной группы статистически значимы: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). Г и И) Средняя продолжительность жизни в экспериментальной и контрольной группах. График – Floating bars (от минимального до максимального значения), линия на среднем значении. Отличия от контрольной группы статистически значимы: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ (U-критерий Манна-Уитни). Д и К) Внешний вид животных (Д – 11 сутки после начала терапии; К – 21 сутки после начала терапии).

2.1.2. Эксперимент №2. Май 2020г

После терапии согласно подходу «Каранахан» наблюдалось снижение размеров опухолей, с 8 суток у некоторых мышей наблюдалась полная элиминация опухоли. Начиная с 15 суток у мышей, у которых не было полного исчезновения опухоли, начинался рост опухоли (Рисунок 13Е, Ж, К). В этом эксперименте у 71% мышей не было зарегистрировано признаков роста опухоли (Рисунок 13Ж). В общей сложности 43% животных погибли из-за развившегося симптомокомплекса, характерного для системной воспалительной реакции (СВР) (у этих мышей не было зарегистрировано признаков роста опухоли). К 100-му дню эксперимента в живых осталось 40% мышей, у всех живых животных не было признаков роста опухоли. Средняя продолжительность жизни составила 43 и 83 суток в контрольной и экспериментальной группах, соответственно (Рисунок 13З, И). В контрольной группе одна мышь, в экспериментальной группе две мыши были выведены из эксперимента, этот факт был учтен в анализе выживаемости. Индекс торможения роста опухоли, вычисленный на 21 сутки эксперимента, составил 83,8%.

2.2. Два очага опухоли

Для оценки возможного влияния обработанного опухолевого очага на необработанный, мышам привили клетки карциномы Льюис внутримышечно в две задних лапы.

2.2.1. Эксперимент №3. Март 2019г

После терапии согласно подходу «Каранахан» наблюдалось снижение размеров опухоли, у 13% животных опухоль в сайте обработки полностью резорбировалась, при этом патоморфологический анализ не выявил наличие метастазов в лёгких (Рисунок 14Б; см. приложение 5). У 4 из 8 мышей, начиная с 21 суток, наблюдалось развитие рецидива опухоли (Рисунок 14А, Б, Д). В общей сложности 38% мышей до 18-ых суток погибли от развившегося

симптомокомплекса, характерного для СВР (Рисунок 14В). У погибших мышей не обнаружилось развитие метастазов в лёгких. Выявленное количество метастазов у остальных мышей экспериментальной группы было в 11 раз меньше, чем у контрольных мышей (см. приложение 5). Средняя продолжительность жизни составила 8 и 24 суток в контрольной и экспериментальной группах, соответственно (Рисунок 14Г). Индекс торможения опухоли, вычисленный на 9 сутки эксперимента, составил 86% для обработанной опухоли и 88% для необработанной опухоли.

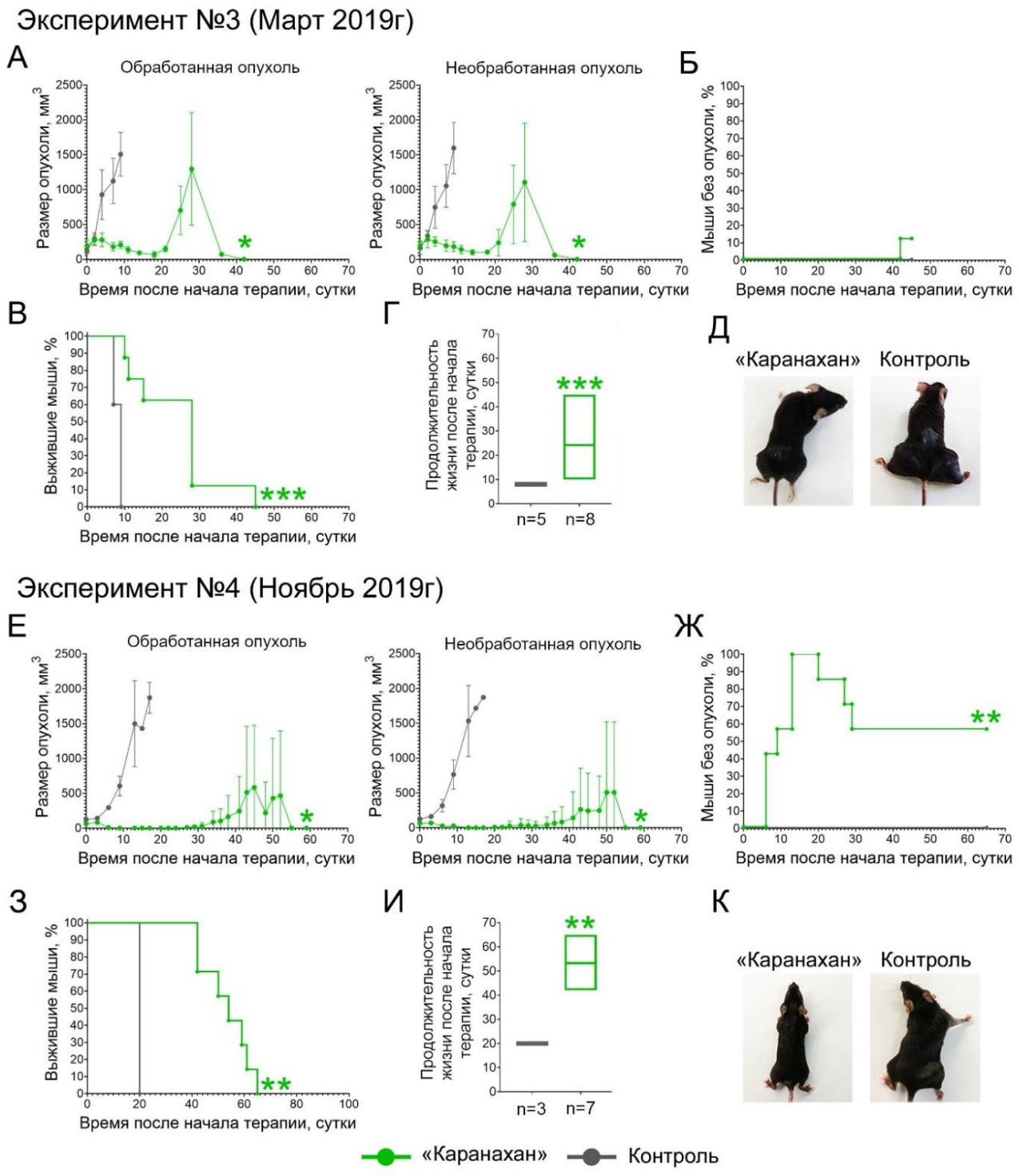


Рисунок 14. Оценка эффективности подхода «Каранахан» на модели карциномы Льюис на мышах с прививкой графта внутримышечно в обе задние лапы: эксперимент №3 (А-Д) и эксперимент №4 (Е-К). Мышей обрабатывали ЦФ (в/б) по 100 мг/кг и препаратом dsDNAmix (в/о) по 0,5 мг/мышь согласно выбранной терапевтической схеме. Инъекции препаратом dsDNAmix производились только в один графт (обозначен, как обработанная опухоль). Эксперимент №3: группа «Каранахан» – 8 мышей, контрольная группа – 5 мышей. Эксперимент №4: группа «Каранахан» – 7 мышей, контрольная группа – 3 мыши. А и Е) Сравнение динамики

роста опухолей в экспериментальной и контрольной группах, приведены средние значения ± стандартное отклонение. * – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,05$ (Множественный t-тест, Метод Бенджамини-Иекутиели). Б и Ж) Динамика изменения количества мышей без опухоли. ** – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,01$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). В и З) Выживаемость мышей. Отличия от контрольной группы статистически значимы: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). Г и И) Средняя продолжительность жизни в экспериментальной и контрольной группах. График – Floating bars (от минимального до максимального значения), линия на среднем значении. Отличия от контрольной группы статистически значимы: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (U-критерий Манна-Уитни). Д и К) Внешний вид животных (Д – 9 суток после начала терапии; К – 13 суток после начала терапии).

2.2.2. Эксперимент №4. Ноябрь 2019г

После проведенной терапии полная резорбция опухоли наблюдалась через 13–20 суток после начала терапии. К концу эксперимента опухоли были полностью резорбированы в обеих бедренных областях у 57% животных. У остальных мышей наблюдалось бессистемное спонтанное развитие рецидива опухоли, начиная с 20 суток, вне зависимости от обработки опухоли (Рисунок 14Е, Ж, К). Средняя продолжительность жизни животных составила 20 и 53 суток в контрольной и экспериментальной группах, соответственно (Рисунок 143, И). Индекс торможения опухоли, вычисленный на 17 сутки эксперимента, составил 100% для обеих опухолей.

Таким образом, в четырех независимых экспериментах, выполненных на протяжении двух последовательных лет, подход «Каранахан» показал высокую эффективность в лечении неизлечимой скоротечной экспериментальной мышиной карциномы лёгких Льюис. В наиболее показательных экспериментах удалось достичь полной длительной ремиссии (полностью вылечить) 70% (в случае с одной опухолью) и 60% (в случае с двумя опухолями) экспериментальных животных.

Полученные результаты дают основание предполагать, что существуют изменения в эффективности подхода «Каранахан», связанные с эффектом сезона и года.

3. Объединение подхода «Каранахан» и in situ вакцинации GcMAF в одну терапевтическую платформу. Оценка синергичного противоопухолевого действия

Известно, что препарат GcMAF активирует перитонеальные макрофаги (ПМФ) и профессиональные свойства дендритных клеток, а также способствует М1 поляризации макрофагов исходно М0 фенотипа в системе *in vitro*. Одним из главных показателей М1 состояния фагоцитов является их фагоцитарная активность.

В ходе эксперимента №5 (Май 2019 г.) на модели карциномы лёгкого Льюис было проведено лечение мышей согласно подходу «Каранахан» в монорежиме, согласно подходу «Каранахан» совместно с инъекциями препарата GcMAF (пробное объединение, при котором мышам проводили инъекции препарата GcMAF сразу после каждой инъекции препарата dsDNAmix – группа «Каранахан»+GcMAF (x4)), а также было проведено лечение мышей препаратом GcMAF в монорежиме (ежедневные инъекции) (Рисунок15Б). Было установлено, что специфический активатор макрофагов GcMAF, охарактеризованный только по фагоцитарной активности, используемый в монорежиме, не в состоянии индуцировать опухоль-реактивное/опухоль-нейтральное состояние клеток опухоль-ассоциированной стромы (ОАС), что выражалось в отсутствии торможения роста экспериментальной опухоли (Рисунок 15Б). Оказалось, что активность макрофагов блокируется факторами, секретируемыми опухолевыми клетками, на что указывает эксперимент по обработке активированных GcMAF перитонеальных макрофагов мыши кондиционной средой от культуры клеток В-лимфомы. Активированные GcMAF макрофаги в результате действия факторов кондиционной среды теряли свою фагоцитарную активность (Рисунок 15А). Подробное описание клеточной линии В-лимфомы представлено в исследовании (Dolgova et al., 2019).

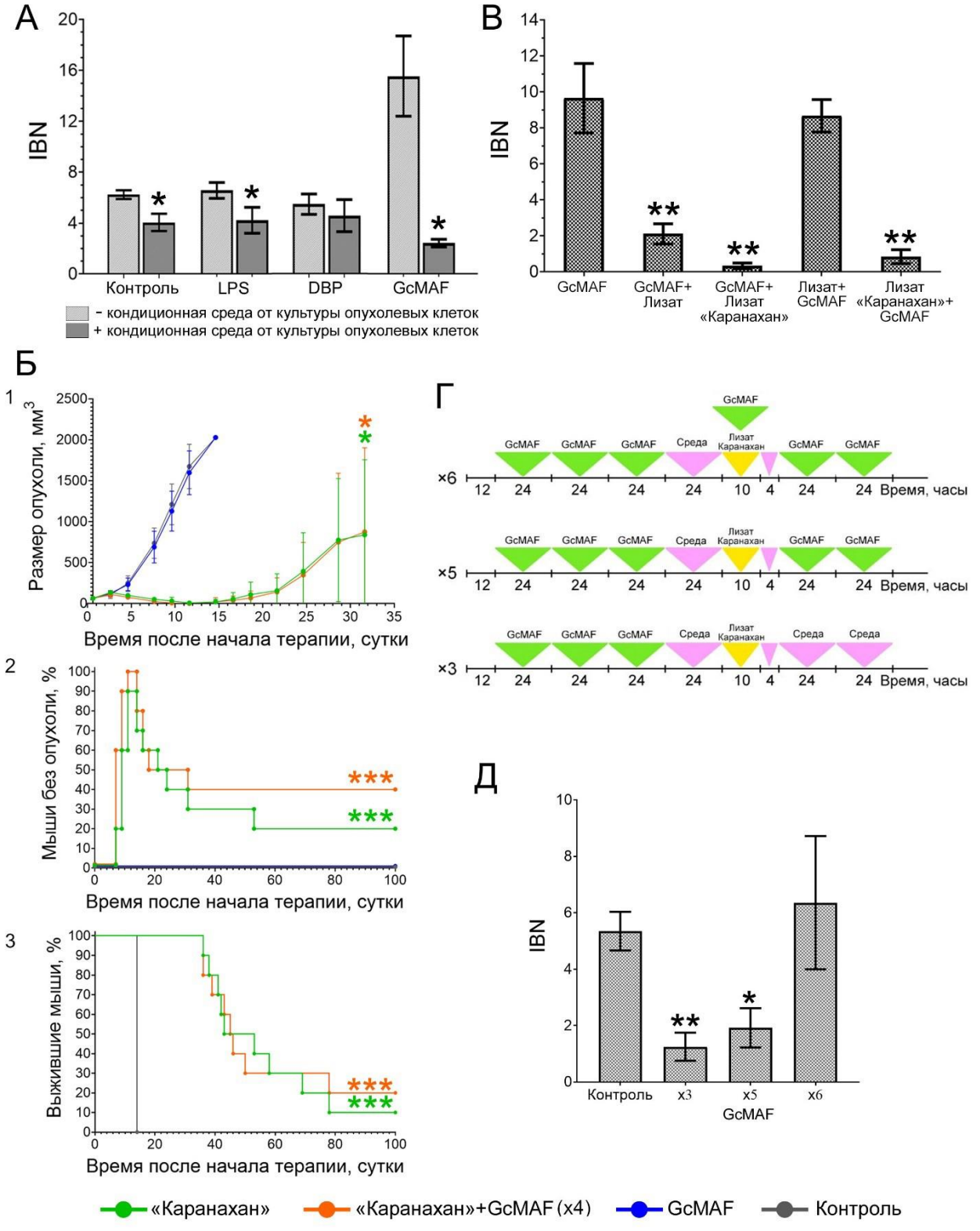


Рисунок 15. Анализ противоопухолевых свойств препарата GcMAF. А) Влияние кондиционной среды от культуры опухолевых клеток В-лимфомы на способность GcMAF активировать перитонеальные макрофаги (ПМФ) мышей линии CBA/Lac. DBP – витамин D-связывающий белок, GcMAF – групп-специфический активирующий макрофаги фактор, LPS – липополисахарид. Приведены средние значения ± стандартное отклонение (n=4). * – отличия

относительно соответствующего контроля статистически значимы, $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни). Б) Эксперимент №5. Результаты терапии мышей с карциномой Льюис согласно подходу «Каранахан» и согласно подходу «Каранахан» совместно с препаратом GcMAF. Контрольная группа – 8 мышей, группа «Каранахан» – 10 мышей, группа «GcMAF» – 7 мышей, группа «Каранахан»+GcMAF (x4) – 10 мышей. 1 – Сравнение динамики роста опухолей в экспериментальных и контрольной группах, приведены средние значения ± стандартное отклонение. * – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,05$ (Множественный t-тест, Метод Бенджамини-Иекутиели). 2 – Динамика изменения количества мышей без опухоли. *** – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,001$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). 3 – Выживаемость мышей. *** – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,001$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). Цвет * обозначает экспериментальную группу, которая отличается от контроля. В) Утрата специфической фагоцитарной активности ПМФ мыши вследствие обработки лизатом опухоли. Макрофаги обрабатывали препаратом GcMAF, препаратом GcMAF и лизатом опухоли карциномы Льюис, препаратом GcMAF и лизатом опухоли карциномы Льюис, полученном от мышей на 9 сутки после проведения терапии согласно подходу «Каранахан», или в первую очередь обрабатывали соответствующими лизатами опухолей, а затем активировали препаратом GcMAF. Приведены значения индексов активации ПМФ (средние значения ± стандартное отклонение; n=4-5). ** – отличия относительно GcMAF статистически значимы, $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни). Г) Поисковые схемы обработки ПМФ. Д) Фагоцитарная активность ПМФ без дополнительных обработок (контроль), обработанных препаратом GcMAF ×3, ×5 или ×6 раз с интервалом 24 ч и лизатом опухоли карциномы Льюис, полученном от мышей на 9 сутки после проведения терапии согласно подходу «Каранахан». Приведены значения индексов активации ПМФ (средние значения ± стандартное отклонение; n=4-5). Отличия относительно контроля статистически значимы: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни).

3.1. Основная идея объединения подхода «Каранахан» и in situ вакцинации препаратом GcMAF, активирующим макрофагальное звено врожденного иммунитета

Было сделано предположение, что противоопухолевое действие GcMAF возможно индуцировать только в случае глубокой редукции гуморальной и цитотактильной активности развитой опухоли. В связи с полученными данными возникла гипотеза объединения двух подходов: подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации GcMAF. Предполагалось, что циторедуцирующее действие на опухоль подхода «Каранахан» позволит проявиться противоопухолевым свойствам препарата GcMAF, используемом в режиме *in situ* вакцинации. Подход «Каранахан» будет индуцировать масштабный апоптоз опухолевых клеток и

эрадицировать ОСК. Одновременно *in situ* вакцинация GcMAF будет активировать освобожденные от гуморального опухолевого давления макрофаги, что приведет к активации противоопухолевого иммунного ответа, связанного с активностью реполяризованных в М1 фенотип макрофагов или с блокированием активности опухоль-ассоциированных макрофагов М2 фенотипа (ТАМ2 клеток) (М0 фенотип). Будет получен аддитивный/синергичный противоопухолевый эффект действия двух подходов.

3.2. Поиск и характеристика условий проявления противоопухолевых свойств препарата GcMAF

В первоначальном эксперименте №5 в рамках нового представления об активирующих свойствах GcMAF, проявляющихся в сочетании с действием подхода «Каранахан», было установлено, что в подходе «Каранахан» присутствуют условия, позволяющие проявляться противоопухолевым свойствам GcMAF на модельной опухоли карциномы Льюис, на которой ранее ни при каких условиях не удавалось получить противоопухолевый эффект при использовании GcMAF в монорежиме. В пилотном режиме объединения подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации препаратом GcMAF («Каранахан»+GcMAF (x4)), используя четырехкратные внутриопухолевые инъекции GcMAF (инъекции препарата GcMAF проводились сразу после инъекций препарата dsDNAmix) на фоне обработок подхода «Каранахан», удалось увидеть позитивные изменения в терапии слабоиммуногенной карциномы Льюис, растущей в солидной форме (Рисунок 15Б).

Был осуществлен поиск временного отрезка подхода «Каранахан», где могли бы проявляться выраженные противоопухолевые свойства GcMAF. Были выделены и проанализированы лизаты опухоли Льюис после проведенных обработок согласно подходу «Каранахан». Были выбраны лизаты, полученные на 9 сутки терапии, когда опухоль подвергалась значительной редукции. Оказалось, что обработка ПМФ лизатом опухоли после воздействия согласно подходу «Каранахан» приводит к глубокой и необратимой анергии ПМФ мыши. Единичные обработки GcMAF до или после инкубации с лизатом опухоли не в состоянии преодолеть индуцированную анергию макрофагов (Рисунок 15В).

Поскольку в первоначальном *in vivo* эксперименте №5 было показано, что GcMAF в состоянии восстановить функциональную активность макрофагов в сочетании с подходом «Каранахан», был применен режим массированной обработки макрофагов препаратом GcMAF в различных временных режимах на фоне действия подхода «Каранахан». Был обнаружен режим, при котором удалось сочесть противоопухолевые свойства подхода «Каранахан» (лизаты из резорбирующейся опухоли, 9 сутки терапии) и при этом сохранить жизнеспособность и активировать фагоцитарную (противоопухолевую) активность ПМФ (Рисунок 15Г). Было обнаружено, что массированная (6-кратная) обработка макрофагов в режиме, когда действие

лизата было спроецировано на подготовленные обработкой GcMAF макрофаги, позволяет избежать индукции анергии фагоцитов и восстановить фагоцитарную (противоопухолевую) активность макрофагов (Рисунок 15Д).

Таким образом, появилось понимание того, что необходимы многократные обработки GcMAF в течение проведения противоопухолевого лечения согласно подходу «Каранахан». Такой подход был применен в экспериментах *in vivo*.

3.3. Анализ противоопухолевой эффективности подхода «Каранахан» в сочетании с in situ вакцинацией препаратом GcMAF на модели карциномы лёгкого Льюис

3.3.1. Характеристика противоопухолевого действия подхода «Каранахан» в сочетании с in situ вакцинацией препаратом GcMAF на модели карциномы лёгкого Льюис (Эксперимент №6)

Мыши с привитой опухолью Льюис были обработаны согласно найденной терапевтической схеме подхода «Каранахан» (Рисунок 12Е, Рисунок 16А). Мышей из группы комбинированной терапии дополнительно обработали препаратом GcMAF. Режим обработки препаратом GcMAF на фоне применения подхода «Каранахан» был найден эмпирическим путем в соответсвии с пониманием того, что необходимы многократные обработки GcMAF в течение проведения противоопухолевого лечения согласно подходу «Каранахан» (Рисунок 16Б).

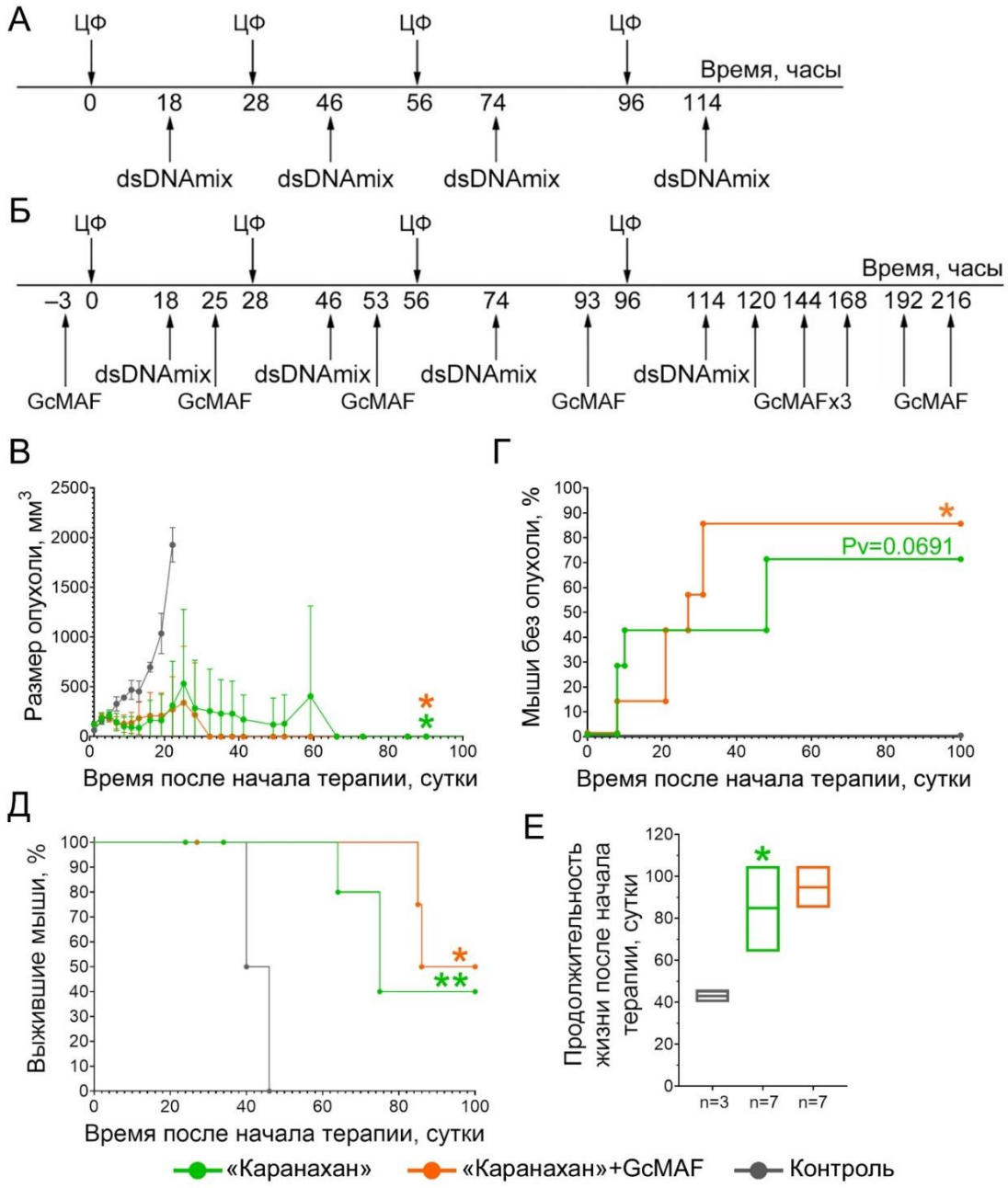


Рисунок 16. Сравнение противоопухолевой эффективности подхода «Каранахан» и подхода «Каранахан», объединенного с внутриопухолевыми инъекциями GcMAF на модели слабоиммуногенной опухоли карциномы Льюис. Эксперимент №6. Контрольная группа – 3 мыши, группа «Каранахан» – 7 мышей, группа «Каранахан»+GcMAF – 7 мышей. А) Терапевтическая схема лечения карциномы Льюис согласно подходу «Каранахан». ЦФ вводится в дозе 100 мг/кг (в/б), препарат dsDNAmix вводится по 0,5 мг/мышь (в/о). Б) Терапевтическая схема лечения карциномы Льюис согласно подходу «Каранахан», объединенная с внутриопухолевыми инъекциями препарата GcMAF. Обработки 2 мкг GcMAF (в/о) проводили на 3 часа раньше ЦФ, после финальной обработки препаратом dsDNAmix проводилась массированная обработка опухолевого сайта препаратом GcMAF. В) Сравнение динамики роста

опухолей в экспериментальных и контрольной группах, приведены средние значения ± стандартное отклонение. * – отличия от контрольной группы статистическии значимы, $p < 0,05$ (Множественный t-тест, Метод Бенджамини-Иекутиели). Г) Динамика изменения количества мышей без опухоли. * – отличия от контрольной группы статистическии значимы, $p < 0,05$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). Д) Выживаемость мышей. Отличия от контрольной группы статистическии значимы: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). Е) Средняя продолжительность жизни в экспериментальных и контрольной группах. График – Floating bars (от минимального до максимального значения), линия на среднем значении. * – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни). Цвет * обозначает экспериментальную группу, которая отличается от контроля.

В ходе эксперимента №6 (Май 2020 г.) в обеих экспериментальных группах появлялись рецидивы, которые потом резорбировались с гнойными выделениями (предположительно нейтрофильное воспаление, вызванное аттракцией нейтрофилов в очаг опухолевого роста). Отмечено, что с 15 по 27 сутки у отдельных мышей наблюдалось обильное выделение гноя из обработанной лапы. При этом в группе «Каранахан»+GcMAF после выделения гноя наблюдалось полное исчезновение опухоли, в то время как в группе «Каранахан» после выделения гноя наблюдалось развитие опухоли, повлекшей за собой гибель животных (Рисунок 16В, Г). В среднем скорость развития графта не отличалась между группами «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF, однако была в 2 раза ниже скорости развития графта в контрольной группе (Рисунок 16В). Также было показано, что до 80 суток в группе «Каранахан» дожили две мыши, а в группе «Каранахан»+GcMAF – четыре мыши. К 100 суткам эксперимента выжило и полностью вылечилось от неизлечимой карциномы Льюис 50% животных в группе «Каранахан»+GcMAF и 40% животных в группе «Каранахан». Средняя продолжительность жизни животных составила 43 суток в контрольной группе, 85 суток в группе «Каранахан», 95 суток в группе «Каранахан»+GcMAF (Рисунок 16Д, Е). В контрольной группе одна мышь, в группе «Каранахан» две мыши, в группе «Каранахан»+GcMAF две мыши были выведены из эксперимента из-за обильного гноеобразования, этот факт был учтен в анализе выживаемости. Индекс торможения опухоли, вычисленный на 21 сутки эксперимента, составил 84% для группы «Каранахан» и 86% для группы «Каранахан»+GcMAF. Было показано, что комбинация подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации препаратом GcMAF показала синергию с индексом CI=0,35.

3.3.2. Оценка развития иммунного ответа, индуцированного проведенным лечением согласно подходу «Каранахан» и подходу «Каранахан» в сочетании с in situ вакцинацией препаратом GcMAF, у мышей с карциномой лёгкого Льюис

Мыши с привитой опухолью Льюис были обработаны по схеме, указанной на рисунке 16Б, показавшей свою эффективность в проведенном биологическом тесте. По достижению начала эффективного некротического разложения ткани опухолевого очага, что проявлялось обильными гнойными выделениями, экспериментальные животные отбирались для проведения многофакторного анализа.

На 15, 17 и 22 сутки после начала терапии согласно подходу «Каранахан» и «Каранахан» в синергизме с GcMAF, используя наборы специфических антител, проводили анализ клеток ОАС, популяций иммунных клеток селезенки, мононуклеаров крови и ПМФ. На 15 и 22 сутки из обеих групп отбирались мыши с остаточными детектируемыми опухолями. На 17 сутки из обеих экспериментальных групп отбирались мыши с полностью редуцированными опухолями, поэтому анализ ОАС в этой точке не проводился. На 31 сутки был проведен анализ активности ПМФ. В примененном подходе главной задачей было определение направления иммунного ответа.

Пилотное исследование. Эксперимент №7.

На первом этапе было проведено поисковое (пилотное) исследование (первичная иммунограмма, эксперимент №7), направленное на оценку усиления активированных подходом «Каранахан» иммунных реакций добавлением в обработки препарата GcMAF, которые, как предполагается, являются причиной значимого положительного влияния GcMAF на выживаемость экспериментальных мышей (см. приложение 6). Одновременно анализировались 6 клеточных популяций по 11 специфическим маркерам (все маркеры перечислены в разделе материалы и методы). Эксперимент №7 был проведен в ноябре 2020 г. В связи с технической сложностью исследования (в случае первичной иммунограммы) в каждой временной точке в анализ было взято по одному животному из каждой группы.

Анализ данных, полученных в исследовании, был проведен по следующей логической схеме. Было проведено сравнение: 1) между популяциями клеток в группах (отличие леченных мышей от нелеченных, леченных с использованием различных подходов); 2) одной и той же популяции в разных временных точках в одной группе и в сравнении между группами (изменение активности анализируемой популяции клеток на временном интервале); 3) одной и той же популяции клеток в разных анализируемых анатомических структурах (опухоль vs селезенка; опухоль vs ПМФ) в одной группе и в сравнении между группами; 4) в отдельных экспериментах была оценена цитолитическая противоопухолевая (против клеток карциномы Льюис) активность мононуклеаров крови, спленоцитов, ПМФ; 5) был проведен анализ состояния клеточных

популяций в зависимости от наличия или отсутствия остаточной опухолевой ткани. В этой части анализа было выявлено, что остаточная опухоль не влияет на динамику изменений в анализируемых популяциях. Главным фактором видимых изменений являлось время после проведения терапии.

Подтверждающее исследование со статистической выборкой. Эксперимент №8.

Эксперимент №8 так же, как эксперимент №9, был выполнен в рамках оценки развития иммунного ответа, индуцированного проведенным лечением согласно подходу «Каранахан» и подходу «Каранахан» в сочетании с *in situ* вакцинацией препаратом GcMAF, у мышей с карциномой лёгкого Льюис для подтверждения динамики изменений клеточных популяций иммунной системы, которые были выявлены в ходе пилотного исследования (эксперимент №7). Однако подробные результаты этого эксперимента в рамках диссертационного исследования не приводятся, они в подробностях расписаны в работе (Ruzanova et al., 2022).

Подтверждающее исследование со статистической выборкой. Эксперимент №9.

На втором этапе было проведено аналогичное исследование, в котором преследовалась цель подтвердить полученные в поисковом (пилотном) варианте результаты (первичная иммунограмма) и оценить статистическую значимость обнаруженных изменений анализируемых клеточных популяций. Эксперимент №9 был проведен в мае 2021 г. Как было выявлено в первичной иммунограмме, основные изменения в анализируемых популяциях клеток наблюдались на 15-17 сутки от начала эксперимента. В этой связи для анализа была выбрана временная точка – 16 сутки от начала эксперимента. Также именно в это время (15-17 сутки) наблюдались первые очаги некротического лизиса опухоли с гнойными выделениями (эксперимент №6), что свидетельствовало об активно протекающих катаболических процессах в опухоли. Для статистической достоверности были сформированы группы из трех мышей: контрольные мыши (мыши с развитой опухолью), мыши, обработанные согласно подходу «Каранахан» и обработанные согласно подходу «Каранахан» с введением в обработку препарата GcMAF. В выбранный день у мышей выделялись соответствующие ткани и органы, и популяции клеток анализировались аналогичным образом, как это описано для пилотного исследования. Полученные результаты приведены на рисунке 17. В описании клеточных популяций приводятся данные, характеризующие изменения, произошедшие в группе мышей «Каранахан»+GcMAF в сравнении с группой «Каранахан».

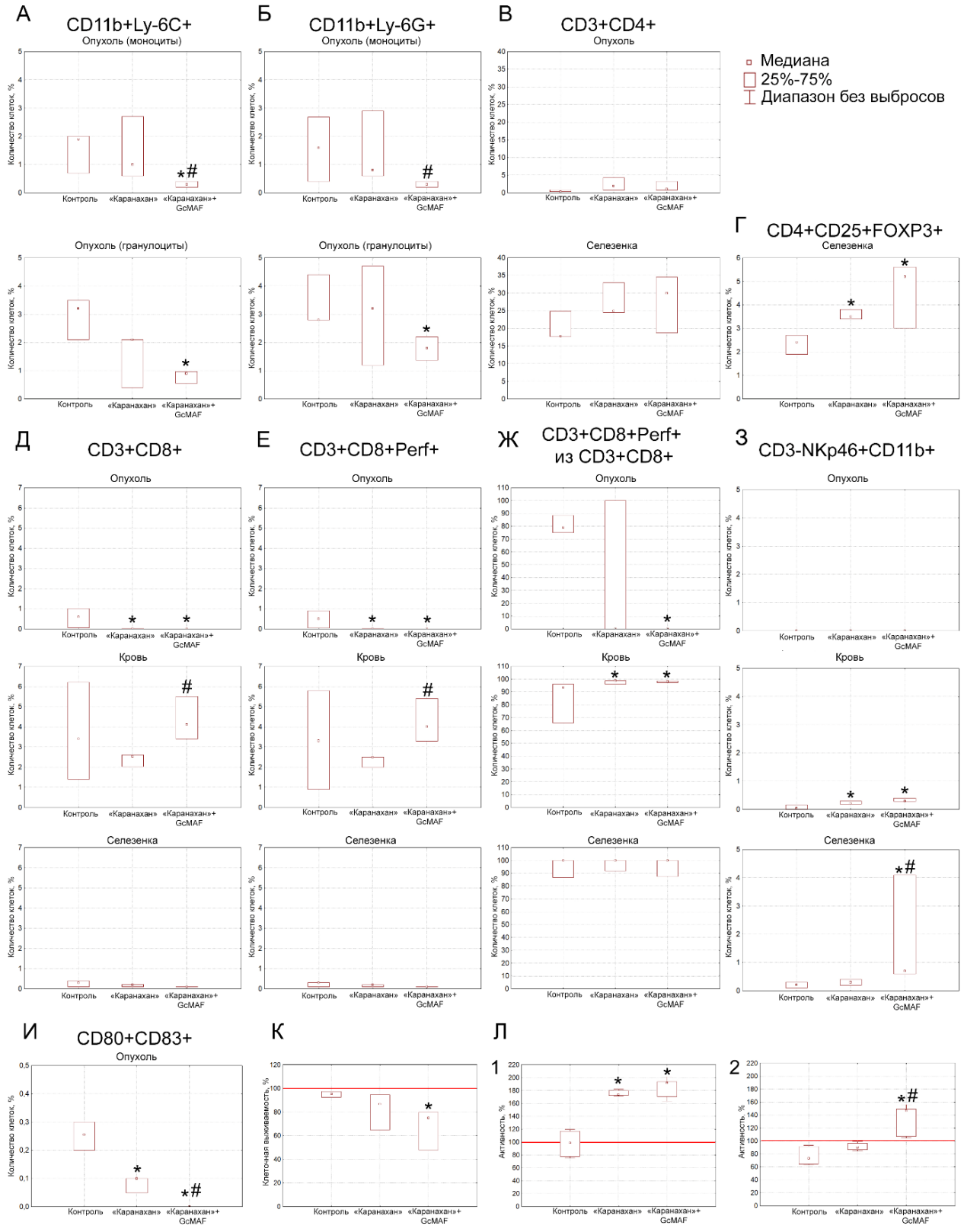


Рисунок 17. Оценка действия GcMAF на первичную индукцию иммунного ответа проведенным лечением согласно подходу «Каранахан» у мышей с карциномой Льюис (для каждого измерения n=3). А) CD11b+Ly-6C+ клетки. Б) CD11b+Ly-6G+ клетки. В) CD3+CD4+ клетки. Г) CD4+CD25+FOXP3+ клетки. Д) CD3+CD8+ клетки. Е) CD3+CD8+Perf+ киллерные Т-

лимфоциты. Ж) CD3+CD8+Perf+ клетки среди CD3+CD8+ клеток. З) CD3–NKp46+CD11b+ клетки. И) CD80+CD83+ клетки. * – отличия между экспериментальной и контрольной группами статистически значимы, p < 0,05 (U-критерий Манна-Уитни). # –отличия между экспериментальными группами «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF статистически значимы, p < 0,05 (U-критерий Манна-Уитни). К) Цитолитическая активность ПМФ против клеток карциномы Льюис. Л) Фагоцитарная активность ПМФ по способности захватывать МТТ субстрат в первые сутки (1) и на следующий день (2) после выделения. Оценка активности ПМФ интактного животного принята за 100%. * – отличия между экспериментальной и контрольной группами статистически значимы, p < 0,05 (U-критерий Манна-Уитни). # – отличия между экспериментальными группами «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF статистически значимы, p < 0,05 (U-критерий Манна-Уитни).

Хелперные Т-лимфоциты. Картина распределения клеток не отличалась от таковой первичной иммунограммы, оцененной для 17 суток от начала эксперимента (Рисунок 17В). Этот тип клеток отвечает за вторичную активацию и созревание эффекторных клеток. Значительное увеличение этой популяции в опухоли в группе с введением в терапию GcMAF может свидетельствовать об активации опухоль-ассоциированных макрофагов (ТАМ), которые, получив антиген, индуцируют развитие и амплификацию хелперных Т-лимфоцитов.

Регуляторные Т-лимфоциты. Данные повторного эксперимента совпадали с результатами первичной иммунограммы (Рисунок 17Г). Количество клеток этого типа появлялось в незначительном количестве в селезенке в обеих экспериментальных группах. Факт появления регуляторных Т-лимфоцитов в селезенке свидетельствует о включении механизмов обратной связи, блокирующих чрезмерную эскалацию активированных иммунных реакций в обеих экспериментальных группах.

CD8+Perf+ цитотоксические Т-лимфоциты. Данные повторного эксперимента для образцов мононуклеаров крови совпадали с результатами первичной иммунограммы, где показано, что GcMAF стимулировал рост числа цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови (Рисунок 17Д, Е). Кроме того, результаты свидетельствуют, что в обработанных группах в мононуклеарной фракции практически все CD3+CD8+ клетки являлись цитотоксическими Т-лимфоцитами (Рисунок 17Ж).

Натуральные киллеры. В повторном эксперименте также наблюдалось увеличение естественных/натуральных киллеров (NK-клеток) в мононуклеарной фракции крови по сравнению с контролем (Рисунок 173). Тем не менее существенное возрастание NK-клеток наблюдалось в селезенке. В первичном анализе аналогичный взлет числа NK-клеток был показан

на 15 сутки эксперимента в мононуклеарной фракции крови. Можно полагать, что в течение одних суток (оценка проводилась на 16 сутки) NK-клетки из крови мигрировали в селезенку.

Дендритные клетки. Дополнительно была проведена оценка популяции дендритных клеток (ДК) (Рисунок 17И). Количество профессиональных антигенпрезентирующих клеток (АПК) снизилось в обеих экспериментальных группах. Полученный результат противоположен результатам эксперимента №8 (данные не приводятся). Это явление коррелировало с низким количеством клеток в популяции супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) в обработанных группах. При этом, если количество клеток с маркерами CD11b+Ly-6C+ и CD11b+Ly-6G+ было высоким (как это показано для экспериментальных групп в настоящем исследовании (первичная иммунограмма) и в эксперименте №8 (данные не приводятся)), то количество дендритных клеток достоверно увеличивалось, что могло свидетельствовать об активации АПК этими клетками. Это может в очередной раз говорить о том, что популяции клеток CD11b+Ly-6C+ и CD11b+Ly-6G+ ОАС в группах «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF не являлись супрессорами, а представляли собой или реполяризованные MDSC, или атрактированные макрофаги/нейтрофилы.

MDSC. Наблюдались существенные отличия от первичной иммунограммы. Для обеих проанализированных популяций (моноцитарная фракция и гранулоцитарная фракция) детектировалась существенная статистически значимая редукция популяций клеток с маркерами CD11b+Ly-6C+ и CD11b+Ly-6G+, характерными для MDSC, в группе «Каранахан»+GcMAF (Рисунок 17А, Б). Предполагается, что такое отличие определилось сезонностью проведения экспериментов (пилотный эксперимент №7 – ноябрь 2020 г., эксперимент №9 – май 2021 г.) и было связано с тем, что не была активирована миграция периферических лимфоцитов (моноцитов) в сайт опухоли. Этот результат интересен тем, что, по-видимому, в данном случае наблюдался истинный ответ MDSC на терапию. И снижение численности этой популяции клеток, как предполагается, являлась одной из причин увеличения продолжительности жизни мышей в группе «Каранахан»+GcMAF в витальных тестах и общей позитивной тенденции синергичной противоопухолевой терапии.

Оценка цитолитической активности перитонеальных макрофагов. Была проведена оценка цитолитической активности ПМФ при совместном культивировании клеток опухоли Льюис и ПМФ, выделенных из мышей, прошедших лечение согласно подходу «Каранахан» и лечение согласно подходу «Каранахан»+GcMAF, с использованием МТТ-теста. Установлено, что при совместном культивировании с опухолевыми клетками перитонеальных макрофагов, выделенных из интактной мыши и контрольных мышей (мыши с развитой опухолью), количество живых клеток соответствовало суммарному количеству живых клеток в отдельных образцах ПМФ и клеток опухоли. При аналогичном анализе с ПМФ экспериментальной группы

«Каранахан»+GcMAF детектировалось достоверное снижение количества жизнеспособных клеток. ПМФ являются терминально дифференцированными клетками и увеличение их количества простым делением невозможно. Опухолевые клетки могут за счет пролиферативной активности увеличивать количество жизнеспособных клеток в образце. Полученные результаты предполагали лизис опухолевых клеток карциномы Льюис перитонеальными макрофагами, активированными обработкой по схеме «Каранахан»+GcMAF (Рисунок 17К). Этот вывод также подтвердил цитологический анализ, где детектировалось снижение количества плавающих опухолевых клеток.

Фагоцитирующая активность перитонеальных макрофагов. Фагоцитирующая активность ПМФ оценивалась по эффективности захватывания субстрата МТТ. Выделенные макрофаги инкубировали в среде, содержащей МТТ, и проводили анализ в тот же день и на следующий день после выделения (Рисунок 17Л1, 2). Из полученных результатов следовало, что в первые сутки у макрофагов из групп «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF фагоцитрующая активность клеток по способности захватывать МТТ субстрат значительно и достоверно выше, чем в контроле. Аналогичный анализ, проведенный на следующие сутки, свидетельствовал, что макрофаги из группы «Каранахан»+GcMAF сохраняли фагоцитирующую активность и жизнеспособность на прежнем уровне, тогда как клетки, выделенные из группы «Каранахан», теряли такую способность.

Таким образом, все основные выявленные в пилотном исследовании закономерности повторились в групповом анализе для всех проанализированных клеточных популяций, за исключением MDSC. При этом четко прослеживалось аддитивное воздействие GcMAF к обработке согласно подходу «Каранахан». Как уже говорилось, мы полагаем, что в случае миелоидных супрессоров отменился эффект атракции периферических нейтрофилов, что позволило четко показать редуцирующее воздействие GcMAF на популяцию опухоль-ассоциированных MDSC (см. следующий раздел).

3.4. Анализ событий, произошедших в популяции клеток ОАС в результате применения подхода «Каранахан» в монорежиме и в комбинации с GcMAF

3.4.1. Ретроспективный сравнительный анализ CD11b+Ly-6G+/Ly-6C+ популяций миелоидных клеток, инфильтрирующих опухоль, в нескольких последовательных экспериментах (лечение мышей с экспериментальной карциномой Льюис согласно подходу «Каранахан» в монорежиме и в комбинации с GcMAF)

Для анализа событий, происходящих в опухоли экспериментальных животных, обработанных согласно подходу «Каранахан» в монорежиме и в комбинации с GcMAF, были взяты результаты четырех серий экспериментов, выполненных: №6 – в мае 2020 г., №7 – в ноябре 2020 г., №8 – в феврале 2021 г., №9 – в мае 2021 г. Был проведен ретроспективный сравнительный

анализ изменений, произошедших с популяцией миелоидных клеток, несущих маркеры CD11b+Ly-6C+/Ly-6G+. В анализ были взяты изменения, детектируемые на 15-16 сутки от начала экспериментов**.** Это было связано со следующим. В эксперименте №6, начиная с 15 суток от начала обработок, у мышей в группах «Каранахан» в монорежиме и в сочетании с GcMAF наблюдалось активное гноеобразование с резким выбросом гноя при надавливании. В группе «Каранахан»+GcMAF это явление было существенно более ярко выражено и детектировалось у большего количества мышей. В эксперименте №7 выраженного гноеотделения обнаружено не было, тем не менее в опухоли присутствовало большое количество лейкоцитов (Рисунок 18А, Б). В эксперименте №6 анализ популяций иммунных клеток не проводился. Оценивалось состояние опухолевого очага и продолжительность жизни животных. Оказалось, что режим терапии «Каранахан»+GcMAF более эффективен, чем режим «Каранахан». Выжило и полностью вылечилось от неизлечимой карциномы Льюис в первом случае 50% животных, во втором случае 40% животных (Рисунок 16Д, Е).

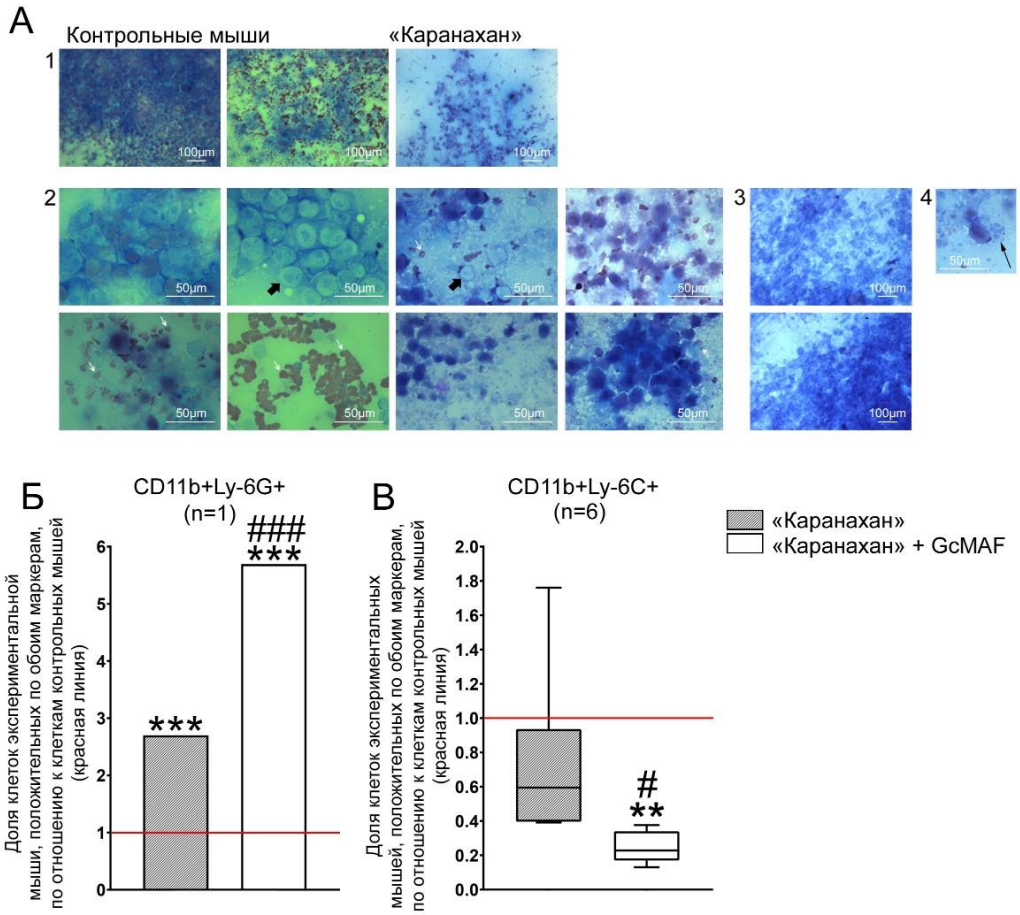


Рисунок 18. Анализ популяций иммунных клеток, выделенных из опухолей контрольных мышей и мышей, обработанных согласно подходу «Каранахан» в монорежиме и в комбинации с групп-специфическим активатором макрофагов (GcMAF). А) Цитологический анализ мазков опухолей. Мазки опухолей были приготовлены из остаточных обнаруживаемых опухолей, отобранных из

групп контрольных мышей и мышей, получавших лечение согласно подходу «Каранахан»: (контрольная группа) в мазке обнаружены скопления опухолевых клеток и случайные скопления эритроцитов, других клеточных элементов обнаружено не было; (экспериментальная группа) имеется небольшое количество живых опухолевых клеток, в поле зрения присутствует большое количество эритроцитов и нейтрофилов, на мазке видно много слизи. 1 – масштабный отрезок = 100 мкм; 2 – масштабный отрезок = 50 мкм, опухолевые клетки обозначены толстой черной стрелкой, эритроциты обозначены белой стрелкой; 3 – скопления нейтрофилов, масштабный отрезок = 100 мкм; 4 – нейтрофил обозначен тонкой черной стрелкой, масштабный отрезок = 50 мкм. В группе синергичного лечения согласно подходу «Каранахан» в сочетании с GcMAF наблюдается истощение опухолевых клеток и наличие эритроцитов, другие клеточные элементы крови не обнаруживаются. Б) Оценка иммунного ответа, индуцированного лечением согласно подходу «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF у мышей с карциномой Льюис. Содержание популяций клеток с фенотипом CD11b+Ly-6G+ в опухолях, выделенных от мышей экспериментальных групп на 15-е сутки после начала терапии, относительно опухолей, выделенных от контрольных мышей (обозначено красной линией). *** – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,001$ (χ^2-тест). ### – отличия между экспериментальными группами «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF статистически значимы, $p < 0,001$ (χ^2-тест). Оценочный эксперимент (n=1). В) Оценка иммунного ответа, индуцированного лечением согласно подходу «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF у мышей с карциномой Льюис (статистически значимая выборка экспериментальных животных, n=6). Содержание клеточных популяций CD11b+Ly-6C+ в опухолях, выделенных от мышей экспериментальных групп на 15-е или 16-е сутки после начала терапии, относительно контрольных мышей (обозначено красной линией). График – Box and whisker plot; представлена медиана, нижний и верхний квантили, минимальное и максимальное значение выборки. ** – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,01$ (Критерий Краскела-Уоллиса). # – отличия между экспериментальными группами «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF статистически значимы, $p < 0,05$ (Критерий Краскела-Уоллиса). Оценка проводилась на основе результатов измерений двух независимых экспериментов.

В эксперименте №7 оценивались только изменения в популяциях иммунных клеток (первичная иммунограмма) в опухоли. Проведенный анализ клеток опухоли по критерию бокового светорассеяния выявил две обособленные мажорные популяции, характеризующиеся как популяции моноцитарных и гранулоцитарных клеток. Обе популяции несли маркеры, характерные и для макрофагов, и для нейтрофилов – CD11b+Ly-6C+/Ly-6G+. Присутствие CD11b+Ly-6G+ в моноцитарной фракции, выделяемой по критерию бокового светорассеяния,

объяснялось незрелым фенотипом миелоидных предшественников нейтрофилов, у которых отсутствуют литические гранулы. Присутствие CD11b+Ly-6C+ в гранулоцитарной фракции, выделяемой по критерию бокового светорассеяния, могло быть объяснено тем, что в данном случае выделялись терминально дифференцированные макрофаги или дендритные клетки, содержащие гранулы, также экспрессирующие на цитоплазматической мембране CD11b+Ly-6C+ поверхностные маркеры. Фенотипичесий анализ показал, что в опухоли в гранулоцитарной фракции резко увеличивалось количество CD11b+Ly-6G+ гранулоцитов (2,7-кратное для группы «Каранахан» и 5,7-кратное для группы «Каранахан»+GcMAF увеличение по сравнению с контролем) (Рисунок 18Б). Этот факт мог означать, что в очаг опухоли рекрутировались периферические фагоциты. При этом количество моноцитов с маркерами CD11b+Ly-6C+ (макрофаги) снижалось (данные не приведены).

В экспериментах №6 и №7, как было сказано, отмечалось обильное количество лейкоцитов в опухолевом очаге (15-28 сутки), в этой связи создавалось непреодолимое обстоятельство для корректной оценки состояния не рекрутированных в резорбирующийся опухолевый очаг («домашних») опухоль-ассоциированных CD11b+Ly-6G+/Ly-6C+ MDSC, поскольку, как известно, те же маркеры присутствуют на классически активированных провоспалительных макрофагах и нейтрофилах.

Два следующих эксперимента (эксперимент №8 и эксперимент №9) демонстрировали логически непротиворечивые данные по изменению количества CD11b+Ly-6G+/Ly-6C+ фагоцитов (достоверное снижение CD11b+Ly-6C+), свидетельствующие об отсутствии выраженного обогащения опухолевого очага (рекрутирования в опухолевый очаг) периферическими клетками с характерными маркерами моноцитарной фракции (Рисунок 18В).

Важным результатом проведенного анализа явился тот факт, что при естественной санации опухолевого очага от массы лейкоцитов, которые присутствовали в виде гнойных выделений в экспериментах №6 и №7, в данном случае (эксперименты №8 и №9) можно детектировать истинные изменения популяции MDSC.

Как было сказано выше, во второй серии экспериментов (эксперимент №8 и №9) четко прослеживалось достоверное снижение CD11b+Ly-6C+ клеток в группе, обработанной согласно подходу «Каранахан» в синергизме с GcMAF. Предполагается, что, если бы опухолевые CD11b+Ly-6C+ клетки замещались рекрутированными ПМФ с таким же фенотипом, то общее количество клеток сохранялось бы на исходном или близким к таковому уровне. Анализ графиков мог означать следующие варианты событий: 1) произошло физическое удаление части CD11b+Ly-6C+ клеток из опухолевого очага, что могло бы свидетельствовать об их высокой чувствительности к проведенным обработкам; 2) произошла реполяризация M2/M1 и N2/N1

фагоцитов с потерей специфических поверхностных маркеров. В обоих вариантах это бы наблюдалось, как снижение (изменение) процента CD11b+Ly-6C+ клеток.

Определить направление произошедших изменений можно было путем анализа синтеза мРНК специфических факторов (цитокины, Arg1, NOS2, IDO1) клетками ОАС контрольных и экспериментальных мышей. Возможность рекрутирования можно было оценить сравнительным анализом синтеза указанных мРНК клетками ОАС и фагоцитами, локализованными вне системы циркуляции (мы взяли в анализ перитонеальные макрофаги – ПМФ).

При физическом удалении таких клеток в сравнительных экспериментах по качественному ПЦР анализу и типированию специфических мРНК про- и противовоспалительных факторов путем ПЦР анализа в реальном времени можно ожидать количественное снижение мРНК, специфичных для MDSC клеток, в опухолях, выделенных из групп «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF, по сравнению с образцами опухолей необработанных контрольных мышей. При реполяризации фенотипа будут достоверно детектироваться разнонаправленные изменения в палитре синтезируемых мРНК про- и противовоспалительных факторов ОАС в образцах, взятых в анализ.

Если профиль экспрессии мРНК анализируемых факторов в клетках ОАС будет отличаться от профиля экспрессии тех же самых мРНК в ПМФ, то сравнительный анализ позволит сказать о типе клеток в опухоли. Или это CD11b+Ly-6C+ миелоидные клетки опухолевого микроокружения, включая опухоль-ассоциированные макрофаги, или это CD11b+Ly-6C+ рекрутированные макрофаги. Если профиль экспрессии мРНК анализируемых факторов в клетках ОАС не будет отличаться от профиля экспрессии в ПМФ, то сравнительный анализ не позволит разграничить два указанных типа клеток. В этом случае будет невозможно определить факт рекрутирования фагоцитов в опухоль.

Для оценки изменений в синтезе мРНК в работе анализировалась экспрессия генов провоспалительных (противоопухолевых) факторов/цитокинов: IL-1β, IL-12a, TNF-α, NOS2; и противовоспалительных (иммуносупрессивных, проопухолевых) факторов/цитокинов: TGF-β1, Arg1, IL-10, IDO1.

Как было сказано выше, мишенью GcMAF являются макрофаги любой локализации. В этой связи все полученные результаты по анализу синтеза мРНК в группе «Каранахан»+GcMAF мы связываем с изменениями, произошедшими в популяции CD11b+Ly-6C+ клеток, и рассматриваем только в таком сочетании. Изменения в популяции CD11b+Ly-6G+ гранулоцитарных нейтрофилов могли быть вторичными, связанными с первичным воздействием GcMAF на моноцитарные MDSC.

Для того чтобы провести все указанные сравнения, в первую очередь необходимо было определить, как изменяется фенотип и палитра синтезируемых мРНК ПМФ интактных животных

в результате активации GcMAF без дополнительных обработок. То есть оценить чистый эффект действия GcMAF.

3.4.2. Характеристика фенотипа и ПЦР анализ синтеза специфических мРНК ПМФ, выделенными из мышей линий C57BL/6, интактных и активированных индукторами GcMAF и LPS

Введение GcMAF в схему лечения экспериментальных мышей согласно подходу «Каранахан» привело к существенному повышению эффективности терапии. Известно, что этот фактор активирует макрофаги к фагоцитозу и повышению литической активности по отношению к опухолевым клеткам (Рисунок 17К, Л). Для того чтобы оценить воздействие активатора GcMAF на макрофаги в системе *ex vivo* (чистый эффект воздействия), была проведена серия экспериментов по оценке изменения количества клеток с маркерами CD11b+Ly-6G+/Ly-6C+, которые также характерны для MDSC. Для анализа была взята линия мышей C57BL/6. LPS использовали в качестве положительного контроля.

Оказалось, что ПМФ линии C57BL/6 экспрессируют специфические CD11b+Ly-6G+/Ly-6C+ маркерные молекулы. Обработка клеток GcMAF и LPS (общепринятый активатор макрофагов) приводила к увеличению количества клеток с фенотипом CD11b+Ly-6C+. При этом количество перитонеальных клеток с маркерами гранулоцитов CD11b+Ly-6G+, обработанных GcMAF, снижалось. Для LPS этот маркерный признак изменялся неопределенно и разнонаправлено (Рисунок 19А). При боковом светорассеянии ПМФ выглядели как одна популяция. Наличие двух маркеров макрофагов и гранулоцитов без видимого морфологического различия, причем отвечающих на обработку по-разному, может означать, что исходная популяция была представлена незрелыми клетками двух популяций фагоцитов. Обработка GcMAF и LPS стимулировала созревание незрелых моноцитов, что дало прирост CD11b+Ly-6C+ клеток. Количество клеток популяции CD11b+Ly-6G+ при обработке GcMAF не увеличивалось, что свидетельствует об отсутствии активирующего действия GcMAF на гранулоцитарную фракцию ПМФ.

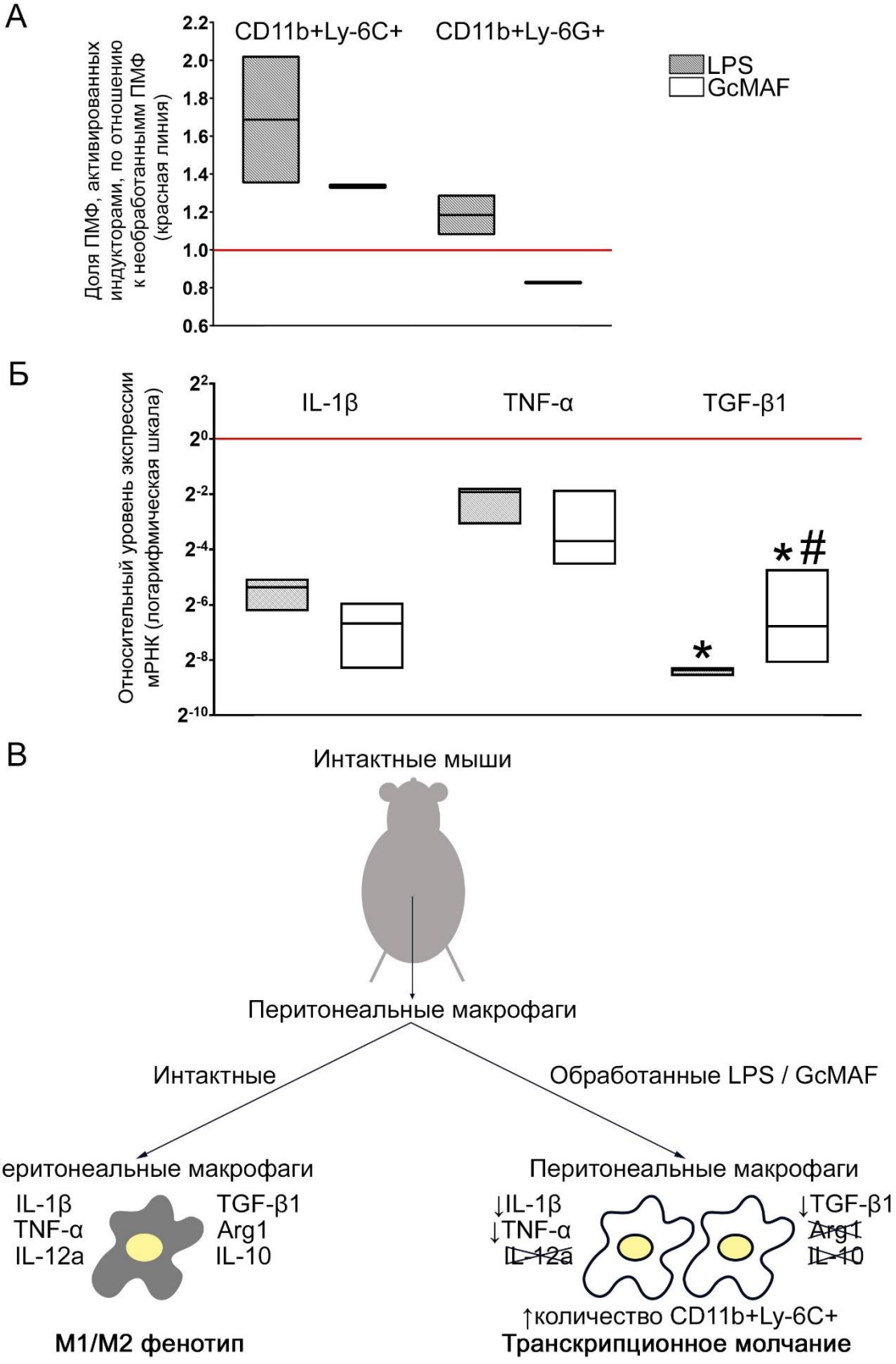


Рисунок 19. Характеристика фенотипа и синтеза специфических мРНК про- и противовоспалительных факторов в перитонеальных макрофагах (ПМФ), выделенных из интактных мышей, неактивировнных и активированных индукторами липополисахаридом (LPS)

и групп-специфическим активирующим макрофаги фактором (GcMAF). А) Результаты анализа популяций ПМФ методом проточной цитометрии на маркеры клеток-супрессоров миелоидного происхождения (CD11b+Ly-6C+ и CD11b+Ly-6G+) (результаты нормированы на ПМФ, не обработанные индукторами; обозначено красной линией). График – Floating bars (от минимального до максимального значения); линия на медиане. Оценочный эксперимент был проведен на двух мышах в каждой группе (n=2). Б) Относительные уровни экспрессии мРНК генов некоторых про- и противовоспалительных цитокинов в ПМФ интактных животных, активированных GcMAF и LPS, по сравнению с неактивированными ПМФ (обозначены красной линией, уровень их экспрессии = 1; ось Y логарифмическая). * – отличия от интактных клеток статистически значимы, $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни). # – отличия между клетками, активированными LPS и GcMAF, статистически значимы, $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни). График – Floating bars (от минимального до максимального значения); линия на медиане; n=5, пулированные образцы. В) Графическое представление синтеза мРНК и относительных уровней экспрессии мРНК. На рисунке схематично показаны макрофаги. Увеличение числа схематичных клеток указывает на увеличение числа CD11b+Ly-6C+ моноцитарных клеток среди ПМФ. Серый цвет обозначает фенотип M1/M2 клеток, выделяющих как про-, так и противовоспалительные факторы; белый цвет обозначает функциональное состояние транскрипционного молчания. Название фактора/цитокина без стрелки обозначает его присутствие в образце. Зачеркнутое название фактора обозначает его отсутствие в образце. Наличие/отсутствие в образце оценивали с помощью полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами. Относительные уровни экспрессии мРНК генов оценивали методом ПЦР в реальном времени. Название фактора/цитокина со стрелкой вверх (вниз) обозначает увеличение (уменьшение) относительного уровня экспрессии мРНК фактора/цитокина по сравнению с таковым в интактных ПМФ.

Проведенный количественный анализ синтеза мРНК генов TGF-β1, TNF-α, IL-1β путем ПЦР в реальном времени и качественный ПЦР анализ (данные не приводятся) генов Arg1, IL-12a, IL-10, IDO1, NOS2 ПМФ интактных животных, без обработки и обработанных GcMAF и LPS, свидетельствовал, что: 1) необработанные ПМФ интактных животных синтезировали мРНК IL-1β, IL-12a, TGF-β1, Arg1, TNF-α, IL-10, IDO1, NOS2, то есть мРНК факторов/цитокинов, относящихся к противоположным векторам (плечам) воспалительного процесса (качественный анализ, данные не приводятся); 2) оба активатора имели одинаковое направление воздействия на активность синтеза проанализированных мРНК факторов/цитокинов обоих векторов воспаления. Происходило ингибирование транскрипционной активности всех проанализированных генов, активных в ПМФ интактных животных. Относительный уровень экспрессии мРНК генов IL-1β,

TNF-α и TGF-β1 в ПМФ, обработанных LPS, был ниже уровня экспрессии в интактных ПМФ в 44,3 (log_2 = – 5,47); 4,4 (log_2 = – 2,14) и 335,6 раз (log_2 = – 8,39), соответственно. Относительный уровень экспрессии мРНК генов IL-1β, TNF-α и TGF-β1 в ПМФ, обработанных препаратом GcMAF, был ниже уровня экспрессии в интактных ПМФ в 102 (log_2 = – 6,67); 7,5 (log_2 = – 2,9) и 58,9 раз (log_2 = – 5,88), соответственно. Общая картина активности генов, проанализированных в ПЦР факторов/цитокинов, свидетельствовала, что и LPS, и GcMAF «успокаивают» синтетическую как супрессорную, так и провоспалительную активность ПМФ (Рисунок 19Б, В).

Сопоставление результатов по определению количества CD11b+Ly-6C+ макрофагов и направления синтеза проанализированных факторов/цитокинов предполагает тот факт, что обработка GcMAF в выбранной экспериментальной дозе индуцировала увеличение количества фагоцитов с указанным маркером и что при этом палитра синтезирующихся мРНК ПМФ менялась с характерной для смешанного M1/M2 фенотипа (необработанные ПМФ) на особое функциональное состояние транскрипционного молчания.

3.4.3. ПЦР анализ синтеза мРНК клетками, локализованными в очаге редуцирующейся опухоли, на 15-16 сутки эксперимента

Основной задачей настоящего исследования являлась попытка определить изменения, произошедшие с клетками в редуцирующейся опухоли после обработок согласно подходу «Каранахан» в монорежиме и в комбинации с GcMAF. Маркером произошедших изменений был выбран анализ синтеза мРНК генов TGF-β1, TNF-α, IL-1β, Arg1, IL-12a, IL-10, IDO1, NOS2. Анализ был проведен с использованием лизатов из криоконсервированных образцов опухоли мышей из экспериментов №8 и №9, где не было обнаружено выраженного увеличения количества лейкоцитов (нейтрофилов) в ОАС. Этот факт означал, что полученные результаты в большей мере относились к «домашним» клеткам ОАС, но не к рекрутированным фагоцитам.

Проведенный качественный ПЦР анализ синтеза мРНК генов TGF-β1, Arg1, NOS2, IL-10, TNF-α, IL-1β, IL-12a, IDO1 клетками опухолевого очага на 15-16 сутки от начала терапии свидетельствовал, что введение в терапию GcMAF имеет ингибирующий эффект воздействия на синтез мРНК генов противовоспалительных факторов/цитокинов и не отменяет активирующий эффект воздействия подхода «Каранахан» на синтез мРНК гена iNOS синтазы, характеризующей провоспалительные свойства макрофагов, при сохранении синтеза мРНК гена IL-1β (качественный анализ, данные не приводятся). Для проведения последующего ПЦР анализа в реальном времени были выбраны факторы/цитокины TGF-β1, Arg1, NOS2, IL-10, синтез мРНК которых стабильно выявлялся во всех ПЦР реакциях (Рисунок 20А).

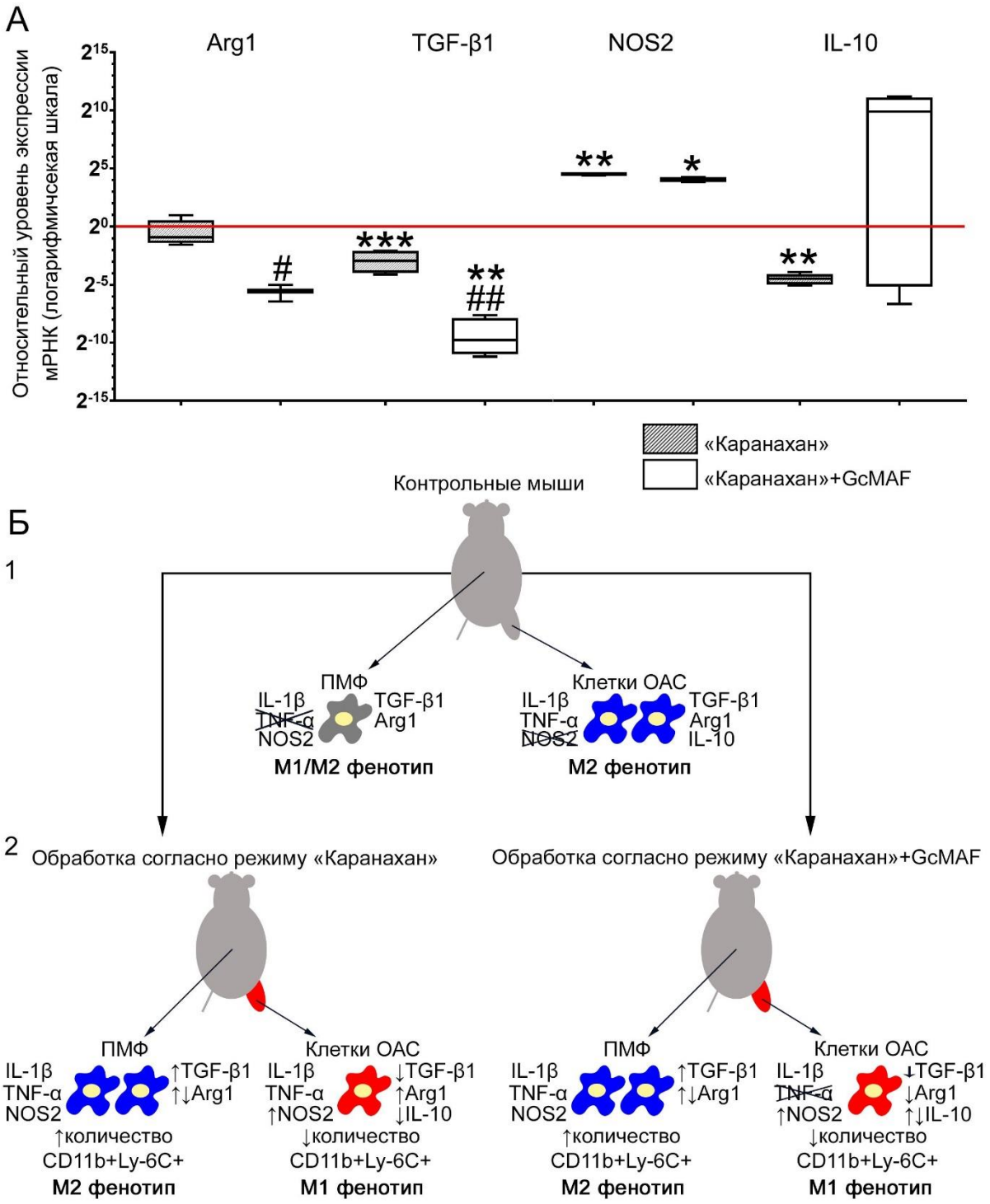


Рисунок 20. Анализ синтеза специфических мРНК про- и противовоспалительных факторов/цитокинов в редуцирующихся опухолях, выделенных от контрольных мышей и мышей, получавших лечение согласно подходу «Каранахан» в монорежиме и в синергии с GcMAF. А) Относительные уровни экспрессии мРНК генов в популяциях опухолевых клеток, выделенных от экспериментальных мышей, по сравнению с клетками, выделенными от контрольных мышей (обозначены красной линией, уровень их экспрессии = 1; ось Y логарифмическая; n=3). График – Box and whisker plot; представлена медиана, нижний и верхний

квантили, минимальное и максимальное значение выборки. Отличия от контрольной группы статистически значимы: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ (U-критерий Манна-Уитни). Отличия между экспериментальными группами «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF статистически значимы: # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни). Б) Графическое представление синтеза мРНК и относительных уровней экспрессии мРНК генов некоторых про- и противовоспалительных факторов/цитокинов в перитонеальных макрофагах (ПМФ) и клетках опухоль-ассоциированной стромы (ОАС). 1) На рисунке схематично показаны ПМФ и макрофаги ОАС мышей, несущих опухоль (контрольные мыши). Синий цвет обозначает противовоспалительный фенотип М2; серый цвет обозначает фенотип М1/М2 клеток, выделяющих как про-, так и противовоспалительные факторы. Название фактора/цитокина без стрелки обозначает его присутствие в образце. Зачеркнутое название фактора/цитокина обозначает его отсутствие в образце. Наличие/отсутствие в образце оценивали с помощью полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами. 2) Оценка изменений фенотипа ПМФ и клеток ОАС после лечения. На рисунке схематично показаны ПМФ и макрофаги ОАС мышей, получавших лечение согласно подходу «Каранахан» и согласно подходу «Каранахан» в синергии с GcMAF. Увеличение/уменьшение количества схематичных клеток после обработки указывает на увеличение/уменьшение количества CD11b+Ly-6C+ моноцитарных клеток среди ПМФ и клеток ОАС. Синий цвет обозначает противовоспалительный фенотип М2; красный цвет обозначает провоспалительный фенотип М1. Методом ПЦР в реальном времени оценивали относительные уровни экспрессии мРНК генов. Название фактора/цитокина со стрелкой вверх (вниз) обозначает увеличение (уменьшение) относительного уровня экспрессии мРНК фактора/цитокина в клетках, выделенных от обработанных мышей, по сравнению с таковым в клетках, выделенных от контрольных мышей. Название фактора/цитокина с двунаправленными стрелками обозначает разнонаправленные изменения относительного уровня мРНК фактора. Жирная стрелка указывает на усиленное ингибирование экспрессии TGF-β1 при синергичном действии подхода «Каранахан» и GcMAF.

Результаты ПЦР в реальном времени свидетельствовали о том, что проведенная терапия приводила к следующим результатам (уровень экспрессии мРНК вычислялся относительно контрольной группы): подход «Каранахан» в монорежиме – происходило ингибирование в 6,5 раз ($\log_2 = – 2,7$) синтеза мРНК иммуносупрессора TGF-β1, синтез мРНК иммуносупрессора Arg1 существенно не изменялся; подход «Каранахан» в синергизме с GcMAF – происходило ингибирование синтеза мРНК иммуносупрессоров TGF-β1 и Arg1 в 507 раз ($\log_2 = – 8,99$) и 47 раз ($\log_2 = – 5,55$), соответственно. Для гена TGF-β1 эффект ингибирования был аддитивным. Подход «Каранахан» в комбинации с GcMAF разнонаправленно действовал на активацию

синтеза мРНК IL-10. Так же, как и при качественном ПЦР анализе, было показано, что обработка согласно подходу «Каранахан» усиливала экспрессию гена NO синтазы 2 в 23 раза (log_2 = 4,52) по сравнению с контрольной группой, при этом добавление к терапии GcMAF не отменяло синтез мРНК этого гена (усиление экспрессии в 17 раз, log_2 = 4,09). Этот факт мог свидетельствовать об индукции синтеза окиси азота в опухоль-ассоциированной строме. В отсутствии ROS произведенный NO будет выступать в качестве лизирующего опухолевые клетки фактора, что в целом может свидетельствовать о появлении опухоль-реактивного циторедуцирующего действия, то есть М1 реполяризации MDSC (Рисунок 20А, Б).

Проведенный качественный и количественный ПЦР анализ влияния GcMAF предполагал, что изменение супрессорной активности клеток ОАС (реполяризация), оцененное по синтезу мРНК основных супрессоров в определенный выбранный день, зависело от животного и проведенной обработки (выбранная доза препарата), что проявлялось в индивидуальных различиях выраженности признака. Это означает, что признак в группе развивался неравномерно на протяжении выбранного отрезка времени и что, возможно, выбранная доза препарата индуцировала разнонаправленный синтез выбранных факторов/цитокинов в зависимости от индивидуального ответа организма на обработку препаратом.

Тем не менее на основании полученных результатов можно было констатировать тот факт, что введение в терапию согласно подходу «Каранахан» препарата GcMAF приводило к снижению процента клеток с характерным фенотипом CD11b+Ly-6C+, а также приводило к снижению синтеза мРНК (экспрессии) генов двух основных иммуносупрессоров – TGF-β1 и Arg1, и не отменяло повышенную экспрессию NOS2, что характеризовало изменения в ОАС как М1 реполяризацию.

3.4.4. Определение фенотипа и экспрессии мРНК генов факторов/цитокинов ПМФ после проведенного лечения мышей с развитой опухолью согласно подходу «Каранахан» в монорежиме и в комбинации с GcMAF

Для оценки возможности хемоаттракции ПМФ в очаг опухоли был проведен анализ содержания клеток с фенотипом CD11b+Ly-6C+ в популяции ПМФ и MDSC опухоли экспериментальных животных и изменений в палитре синтезирующихся в них мРНК про- и противовоспалительных цитокинов и факторов.

Мыши были пролечены согласно подходу «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF (эксперимент №10, ноябрь 2021г.). На 16 сутки от начала эксперимента мыши были выведены из эксперимента и ПМФ всех групп выделены и проанализированы. Установлено, что обе обработки стимулировали увеличение числа клеток с маркерами CD11b+Ly-6C+ в популяции ПМФ (Рисунок 21А).

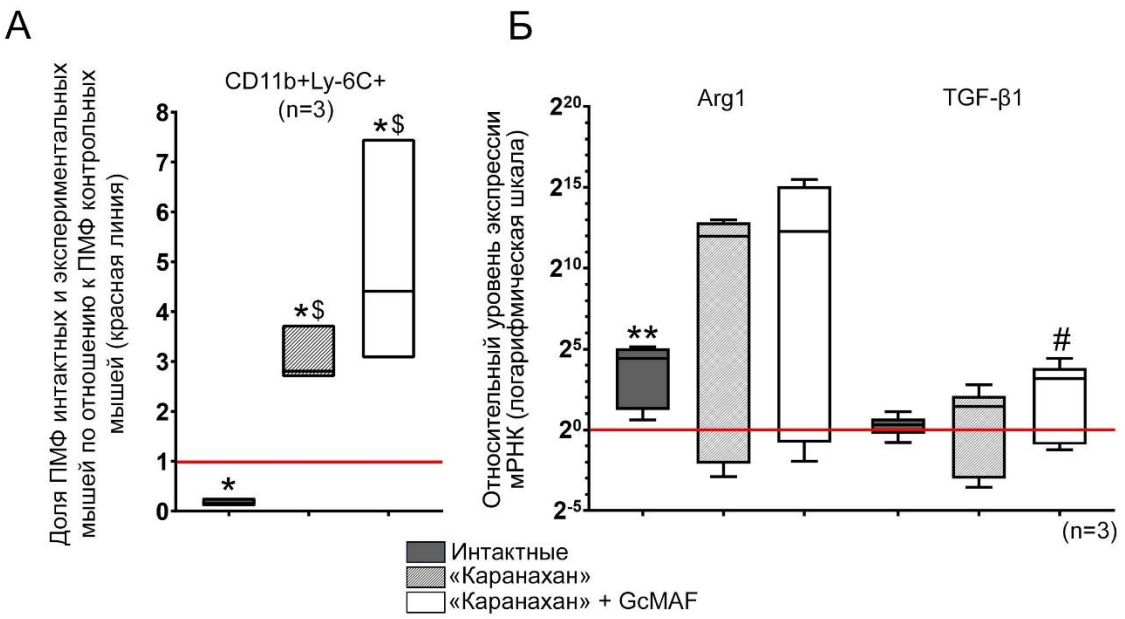


Рисунок 21. Фенотип и относительные уровни экспрессии мРНК генов специфических противовоспалительных факторов/цитокинов в популяции перитонеальных макрофагов (ПМФ) интактных мышей и мышей с опухолями после лечения согласно подходу «Каранахан» в монорежиме и в синергии с GcMAF. А) Характеристика фенотипа ПМФ (n=3). Результаты анализа методом проточной цитометрии маркеров моноцитарных клеток-супрессоров миелоидного ряда (CD11b+Ly-6C+) среди популяции ПМФ. Представлено количество ПМФ интактных и экспериментальных мышей, относительно ПМФ контрольных мышей (мыши с развитой опухолью, обозначены красной линией). График – Floating bars (от минимального до максимального значения), линия на медиане. * – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни). $ – отличия от интактной группы статистически значимы, $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни). Б) Относительные уровни экспрессии мРНК генов Arg1 и TGF-β1 в популяциях ПМФ, выделенных от интактных и экспериментальных мышей, по сравнению с ПМФ, выделенными от контрольных мышей (обозначены красной линией, уровень их экспрессии = 1; ось Y логарифмическая). График – Box and whisker plot; представлена медиана, нижний и верхний квантили, минимальное и максимальное значение выборки. ** – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни). # – отличия между экспериментальными группами «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF статистически значимы, $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни).

Проведенный качественный ПЦР анализ свидетельствовал, что оба варианта терапии активировали синтез мРНК генов про- и противовоспалительных факторов/цитокинов в ПМФ, причем разнонаправленно у мышей одной и той же группы и, как было отмечено выше, по-

видимому, это зависело от индивидуальных особенностей животного в сочетании с выбранной дозой и выбранным временем анализа после проведенного лечения (данные не приведены).

В этой связи для детальной характеристики экспрессии мРНК были выбраны два гена, относящихся к противовоспалительным факторам – Arg1 и TGF-β1, демонстрирующие четкие различия в синтезе мРНК у интактных мышей, контрольных мышей и пролеченных экспериментальных животных. Кроме того, это наиболее значимые факторы, которые опосредуют иммуносупрессирующую активность опухоль-ассоциированных клеток (Yang et al., 2025). Предполагалось, что сравнение экспрессии этих генов у ПМФ и макрофагов ОАС даст ответ на вопрос о том, произошли ли изменения с макрофагами ОАС (картина синтеза мРНК существенно отличается) или произошло заселение освободившихся стромальных ниш макрофагами, расположенными вне очага опухолевого роста (картина синтеза мРНК существенно не отличается).

Результаты ПЦР в реальном времени свидетельствовали, что в ПМФ мышей обеих экспериментальных групп синтез мРНК Arg1 был существенно выше, чем у контрольных мышей, хотя присутствовал большой разброс значений (в среднем относительный уровень экспрессии был выше в 3790 раз ($\log_2 = 11,89$) для группы «Каранахан» и в 14347 раз ($\log_2 = 13,81$) для группы «Каранахан»+GcMAF). Синтез мРНК TGF-β1 в результате проведенных обработок существенно не менялся и находился на уровне синтеза мРНК интактных животных и контрольных животных (Рисунок 21Б). То есть наблюдалось существенное отличие в синтезе мРНК Arg1 и TGF-β1 в клетках ОАС (подавление синтеза обоих факторов при введении в терапию препарата GcMAF) и ПМФ (повышение синтеза аргиназы и отсутствие значительного влияния на синтез мРНК TGF-β1). Это означает, что в результате проведенных обработок произошло обогащение ОАС реполяризованными клетками с М1 противоопухолевым фенотипом с минимальной возможностью хемоаттракции перитонеальных макрофагов в ОАС.

Проведенный анализ позволил сделать заключение о том, что CD11b+Ly-6C+ клетки резорбирующейся опухоли по палитре синтезирующихся мРНК анализируемых факторов/цитокинов не имели отношения к ПМФ и, по-видимому, являлись «домашними» макрофагами ОАС. Это означало, что в резорбции опухоли принимали участие измененные макрофаги ОАС, но не рекрутированные ПМФ. Предполагается, что обнаруженное обильное гноеобразование и наблюдаемые различия в количестве нейтрофилов в резорбирующейся опухоли были связаны с рекрутированием фагоцитов в определенные отрезки времени и зависели от эффекта сезона и года.

Результаты первой части исследования кратко обобщены в приложении 2.

4. Обсуждение к первой части исследования

Совмещение химиотерапии и иммунотерапии

Применение химиотерапии в монорежиме в клинической практике ограничено множеством недостатков, к которым относятся: быстрое выведение и неспецифическое распределение химиотерапевтических препаратов, приводящие к снижению эффективности химиотерапии и к системной токсичности; развитие устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическим средствам; слабый иммунный ответ; низкая иммуногенность (Liang et al., 2021).

Синергичное взаимодействие между иммунотерапией и химиотерапией способствовало появлению комбинированной терапии, которая даёт эффект, намного превосходящий эффект монотерапии. Одним из преимуществ цитотоксической химиотерапии является уменьшение размеров опухоли, а значит уменьшение массы опухолевых клеток, вырабатывающих иммуносупрессивные факторы. Более того, определенные виды химиотерапевтических препаратов, такие как митоксантрон, бортезомиб, доксорубицин, оксалиплатин и паклитаксел, вызывают гибель опухолевых клеток, известную как иммуногенная гибель клеток, и усиливают иммунотерапию. Иммуногенная гибель клеток — это форма регулируемой клеточной гибели, которая способствует активации адаптивного иммунного ответа. Многие из обычно используемых цитотоксических препаратов, таких как антрациклины, циклофосфамид, препараты платины и таксаны, воздействуют на клеточный цикл в пролиферирующих клетках и вызывают апоптоз. После гибели опухолевых клеток антигенпрезентирующие клетки поглощают дебрис опухолевых клеток и представляют неоантигены опухоли иммунным клеткам, тем самым повышая антигенность опухолевых клеток. Известно, что несколько субпопуляций иммунных клеток подавляют противоопухолевый иммунитет (Liang et al., 2021; Zhu et al., 2021). Цитотоксическая химиотерапия препаратами платины, циклофосфамидом, гемцитабином и 5-фторурацилом может значительно уменьшить количество MDSC как у человека, так и у мыши (Melief et al., 2020; Suzuki et al., 2005; Vincent et al., 2010; Welters et al., 2016). Человеческие регуляторные Т-лимфоциты не экспрессируют транспортёр циклофосфамида ABCB1 и более чувствительны к лечению циклофосфамидом, чем другие иммунные клетки (Dimeloe et al., 2014). Кроме того, химиотерапия изменяет микроокружение опухоли и способствует дифференцировке иммунных клеток, поддерживающих противоопухолевый иммунитет. Например, циклофосфамид и доксорубицин способствуют дифференцировке M1-макрофагов, ассоциированных с опухолью (Buhtoiarov et al., 2011).

Существует множество исследований, в которых доказана эффективность синергичного применения химиотерапии и иммунотерапии. У пациентов с ранее не леченным метастатическим немелкоклеточным раком лёгкого без мутаций EGFR или ALK добавление пембролизумаба

(ингибитор PD-1) к стандартной химиотерапии пеметрекседом и препаратом на основе платины привело к значительно более длительной общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования по сравнению с одной только химиотерапией (Gandhi et al., 2018). Добавление атезолизумаба (антитело против PD-L1) к химиотерапии (карбоплатина и этопозид) при лечении мелкоклеточного рака лёгких на поздних стадиях в качестве терапии первой линии привело к значительному увеличению общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования по сравнению с химиотерапией без атезолизумаба (Horn et al., 2018). Атезолизумаб в сочетании с наб-паклитакселом увеличил продолжительность жизни без прогрессирования у пациентов с метастатическим трижды негативным раком молочной железы (Schmid et al., 2018). Поддерживающая терапия авелумабом (антитело против PD-L1) в сочетании с поддерживающей терапией (препараты на основе платины) значительно увеличила общую выживаемость по сравнению с поддерживающей терапией без авелумаба у пациентов с уротелиальным раком, у которых заболевание не прогрессировало после химиотерапии первой линии (Powles et al., 2020).

В настоящем исследовании также осуществляется объединение химиотерапии с иммунотерапией, активирующей либо врожденный, либо адаптивный иммунный ответ. Основной биологической задачей первой части исследования является попытка определить условия, при которых препарат GcMAF будет оказывать безусловное противоопухолевое действие.

Противоопухолевое действие препарата GcMAF

В рамках параллельно проведенной работы (Dolgova et al., 2022) в ходе прямого анализа цитотоксичности *ex vivo* было установлено, что препарат GcMAF не оказывает существенного влияния на опухолевые клетки MCF-7 и U87 *in vitro*. В то же время мышиные перитонеальные макрофаги, активированные воздействием GcMAF, демонстрировали высокий индекс цитотоксичности по отношению к обеим протестированным клеточным линиям (MCF-7 и U87) и индуцировали гибель до 35% опухолевых клеток. Учитывая данные о поляризации макрофагов M0 фенотипа к опухоль-реактивному M1 фенотипу и данные по активации макрофагов мыши препаратом GcMAF, в настоящей работе выдвигается предположение о возможности *in tumor* реполяризации макрофагов в M1 фенотип при внутриопухолевых инъекциях активатора макрофагов, что должно будет сопровождаться разрушением опухоли.

Также в работе (Dolgova et al., 2022) было показано, что при обработке GcMAF *ex vivo* сгенерированных популяций дендритных клеток или макрофагов наблюдается выраженный провоспалительный ответ клеток, что предполагает опухоль-реактивное направление их активности. При этом клетки цельной крови после обработки GcMAF секретировали цитокины разнонаправленного действия, что свидетельствовало о возможности разнопланового влияния на развитие опухоли. Это означает, что в случае «чистых» линий клеток активация GcMAF

стимулирует тот клеточный ответ, который свойственен их биологическому предназначению в искусственных условиях активации и который не экранируется активностью других клеточных популяций. А в случае цельной крови активированные GcMAF различные популяции клеток начинали секретировать свойственные их биологической направленности цитокины, которые, как показали эксперименты, индуцировали развитие диаметрально противоположных клеточных реакций.

Опухоль, как известно, инфильтрируют различные группы иммунных клеток. При введении GcMAF в опухоль все они будут активироваться, причем в соответствии с имманентными характеристиками, свойственными каждому типу клеток. При этом они будут секретировать цитокины разнонаправленного действия. И в этом случае противоопухолевый ответ может быть выявлен только в случае превалирования цитокинов, индуцирующих противоопухолевые клеточные реакции. Такая ситуация возможна в случае разрушения супрессорной активности ОАС (Law et al., 2020).

На моделях мышиных опухолей карциномы Кребс-2 (Dolgova et al., 2022) и карциномы лёгкого Льюис (настоящее исследование) было установлено, что специфический активатор макрофагов GcMAF, используемый в монорежиме, не в состоянии индуцировать опухоль-реактивное/опухоль-нейтральное состояние клеток ОАС, что выражалось в отсутствии торможения роста экспериментальной опухоли (Рисунок15Б). Оказалось, что активность макрофагов блокируется факторами, секретируемыми опухолевыми клетками (Рисунок 15А, Таблица 4).

Таблица 4. Анализ секретируемых цитокинов, содержащихся в кондиционной среде опухолевых клеток В-лимфомы (Dolgova et al., 2022).

Цитокин (pg/ml)		**Кондиционная среда опухолевых клеток В-лимфомы**		
		3 дня	**14 дней**	**17 дней**
Про-воспалительные	**IL-1β**	0,9	2,2	0,0
	INF-α	38	40	20
	IL-17	1	1	2
	IL-18	2	2	1
	IL-12	6	6	5
	sTNF	236	247	298
	IFN-γ	1	1	1
	IL-6	30	38	31

	TNF-α	152	110	56
Противо-воспалительные	**IL-4**	1,4	1,5	1,3
	IL-10	27	32	62
Факторы роста	**GM-CSF**	138	126	86
	G-CSF	31	24	9
	VEGF	1436	1353	460
	IL-2	5	5	5
Хемокины	**IL-8**	1199	1241	1560
	MCP	3078	3149	2567

Оказалось, что уже активированные GcMAF макрофаги в результате действия факторов кондиционной среды теряют фагоцитарную активность, которая является одним из главных показателей M1 состояния фагоцитов (Weagel et al., 2015). Этот факт был объяснён в работе (Dolgova et al., 2022) следующим образом. Известно, что макрофаги, активированные к хемотаксису (один из наиболее устойчивых состояний активности макрофагов), не в состоянии проявлять другие профессиональные активности. Можно предположить, что IL-8 и MCP кондиционной среды дополнительно к первичной активации GcMAF индуцируют механизмы хемотаксиса макрофагов, изменяя тем самым исходно активированный фагоцитирующий фенотип на более стабильный (устойчивый к действию различных направлений активации). Также возможно, что фагоцитоз макрофагов не является безоговорочным маркером M1 фенотипа, а избыточное содержание в кондиционной среде хемокинов IL-8 и MCP реполяризует и удерживает в M2(M0) состоянии исходно фагоцитирующие макрофаги. Другим обстоятельством индуцированной анергии макрофагов могла быть избыточная секреция супрессора иммунных клеток, в том числе макрофагов, VEGF.

Прямые подтверждения угнетения кондиционной средой, полученной от растущей культуры опухолевых клеток, фагоцитарной активности активированных препаратом GcMAF макрофагов свидетельствовали о том, что ОАС активно противодействует взаимодействию GcMAF и ТАМ (Рисунок 15А).

В витальных тестах достоверно определяемая противоопухолевая активность препарата была обнаружена в нескольких экспериментах на глиобластоме человека (Dolgova et al., 2022). Также этот эффект наблюдается в настоящем исследовании при обработке карциномы Льюис препаратом GcMAF в синергизме с подходом «Каранахан» (Dolgova et al., 2022).

В настоящей работе при анализе супрессорной активности опухолевых лизатов, полученных после терапии согласно подходу «Каранахан», выявляется режим синергичного введения препаратов подхода «Каранахан» и GcMAF, при котором сохраняется активированный

М1 фенотип (по фагоцитирующему индексу) перитонеальных макрофагов мыши. Используя найденные временные параметры, проводится исследование состояния популяций иммунных клеток опухоли, селезёнки и мононуклеаров крови, начиная с момента литического разложения опухоли. На основании результатов двух независимых экспериментов установлено, что при лечении мышей, несущих трансплантат карциномы Льюис, согласно подходу «Каранахан» наблюдается выраженный аддитивный эффект действия GcMAF, усиливающий первичную активацию иммунного ответа режимом подхода «Каранахан» (увеличение количества хелперных Т-лимфоцитов, NK-клеток, CD8+Perf+ цитотоксических Т-лимфоцитов, регуляторных Т-лимфоцитов). Также в противоопухолевый иммунный ответ включаются активированные GcMAF перитонеальные макрофаги (Рисунок 18).

Одним из важнейших вопросов настоящего исследования является вопрос о том, что произошло с миелоидными клетками опухолевого микроокружения, в частности с клетками CD11b+Ly-6C+ фенотипа, в результате применения подхода «Каранахан» в монорежиме и в комбинации с GcMAF в отрезок времени, характеризующийся резорбцией опухоли (15-16 сутки от начала терапии). А именно, произошла ли опухоль-нейтральная или опухоль-реактивная (М0/М1) реполяризация М2 макрофагов ОАС и связана ли резорбция опухоли с активностью фагоцитов, находящихся в опухолевом очаге в указанный отрезок времени, или произошло рекрутирование в опухолевый очаг макрофагов, локализованных вне периферического русла (ПМФ) или нейтрофилов периферического русла.

Известно, что CD11b+Ly-6C+ фенотип характеризует одновременно и опухоль-реактивные М1 и проопухолевые М2 макрофаги (инфильтрирующие ОАС). Отличают эти популяции или по седиментационным характеристикам, или по продукции специфических факторов с цитолитическими или суперссорными свойствами (Gabrilovich, 2017). Для того чтобы определить произошедшие с клетками ОАС изменения, в настоящей работе проводится сравнительный анализ функциональных фенотипов макрофагов и эффективности синтеза мРНК основных факторов/цитокинов разнонаправленного действия в популяциях клеток ОАС и ПМФ леченных и нелеченных контрольных мышей. Необходимо отметить, что транскрипционный анализ генов цитокинов/факторов не дает полноценного представления об уровне зрелых цитокинов/факторов.

На начальном этапе работы оценивается фенотип и спектр синтезирующихся мРНК генов цитокинов и специфических факторов ПМФ мышей линии С57BL/6. ПМФ вместе с резидентными макрофагами образуют систему иммунных клеток, находящихся вне системы циркуляции. Оцениваются интактные ПМФ, а также ПМФ, активированные GcMAF, либо стандартным активатором – липополисахаридом (LPS). Проведенный анализ ПМФ позволяет

определить прямое воздействие на синтез специфических мРНК и связь изменений палитры синтезирующихся мРНК с CD11b+Ly-6C+ фенотипом.

Результаты анализа противоречат общеизвестным данным о том, что LPS является одним из главных индукторов M1 фенотипа макрофагов (Orecchioni et al., 2019). В настоящем исследовании ПМФ после обработки препаратом LPS перешли из смешанного M1/M2 фенотипа в особое функциональное состояние транскрипционного молчания, при котором снизился синтез мРНК генов как провоспалительных, так и противовоспалительных факторов. Это может объясняться явлением эндотоксиновой толерантности. Эндотоксиновая толерантность – это защитный механизм, который спасает организм от гибели при чрезмерном воспалительном ответе. Воспалительная реакция играет важную роль в борьбе с инфекциями. Однако воспаление может нанести непоправимый вред организму. Одним из самых сильных триггеров воспалительной реакции являются бактериальные липополисахариды (ЛПС), которые действуют в основном через Toll-подобный рецептор 4 (TLR4). Парадоксально, но в то время как воздействие ЛПС вызывает стойкую воспалительную реакцию, повторное или длительное воздействие ЛПС может вызвать состояние толерантности к эндотоксинам – явление, при котором макрофаги и моноциты утрачивают способность отвечать на повторное воздействие эндотоксина (Liu et al., 2019). Так, например, в работе (Gillen et al., 2021) было показано, что, хотя однократная стимуляция LPS усиливала высвобождение цитокинов, две последовательные стимуляции LPS в течение 24-часового периода вызывали снижение уровней цитокинов TNF-α, IL-10, IL-6. Такое состояние некоторые авторы называют M2-подобным состоянием. Например, в работе (Gu et al., 2022) авторы обработали макрофаги LPS от бактерии Porphyromonas gingivalis и детектировали снижение продукции провоспалительных факторов (TNF-α, IL-12, NO, MMP-2) и повышение продукции противовоспалительных факторов (IL-10, MMP-9) и активности аргиназы-1. Более того, эндотоксиновая толерантность может привести к M0-подобному состоянию. Так, например, в работе (Ufimtseva et al., 2026) было показано, что в зоне фиброза лёгких пациентов с туберкулёзом макрофаги переходят в M0-подобное неактивное состояние с подавленным NF-κB путем, перестают вырабатывать как про-, так и противовоспалительные цитокины и утрачивают способность контролировать размножение микобактерий, которые активно растут внутри них.

Далее оценивается спектр цитокинов и специфических факторов, характеризующих проопухолевый и противоопухолевый фенотипы, клеток, инфильтрирующих опухоль в трёх анализируемых группах мышей: получавших терапию согласно подходу «Каранахан» в режиме монотерапии, в комбинации с GcMAF и не получавших терапии. Оценка проводится на 15-16 сутки от начала терапевтической обработки в фазу выраженной резорбции опухоли. В рамках независимого эксперимента так же на 16 сутки от начала терапии оценивается фенотип и спектр

синтезирующихся мРНК цитокинов и специфических факторов перитонеальных макрофагов (так же трёх групп) как популяции клеток вне системы циркуляции.

Сравнение картины синтезирующихся мРНК клеток ОАС и ПМФ позволило оценить реполяризующий эффект GcMAF на функциональный фенотип макрофагов внутри компартмента опухолевого микроокружения и за его пределами. Результаты анализа популяции MDSC свидетельствуют о том, что произошла M1 реполяризация TAM. При обработке GcMAF в синергизме с подходом «Каранахан» в ОАС наблюдается резкое снижение количества клеток с маркерами миелоидных супрессоров, что приводит к снятию иммунной толерантности, обусловленной гуморальным действием опухоли, и созданию условий для активации опухоль-реактивных свойств TAM.

Влияние сезонных и годовых ритмов на эффективность противоопухолевой терапии

В рамках настоящего исследования было установлено влияние сезонных и годовых ритмов на эффективность подхода «Каранахан» на модели карциномы Льюис. Представляется необходимым сделать акцент на этом явлении, что является крайне важным при реальном лечении людей с онкологическими заболеваниями любыми терапевтическими подходами.

Сезонное и годовое влияние на эффективность подхода «Каранрахан» проявляется, в первую очередь, в динамике развития рецидивов после проведенного лечения. В ранней работе Ruzanova et al., 2022 было сделано предположение, что произвольное появление или исчезновение рецидивов могло быть связано: в первом случае с миграцией ОСК, которые произвольно заселяют остаточную стромальную ткань разрушенной опухоли и индуцируют развитие рецидива; для второго случая было высказано предположение, что индуцируется противоопухолевый иммунный ответ и опухоль-реактивные цитолитические клетки или врожденного, или адаптивного иммунитета произвольно мигрируют в остаточную опухолевую строму и лизируют развивающийся рецидив. Для того, чтобы определить, какая из возможностей реализуется, были проведены дополнительные эксперименты по оценке возможности миграции/диссеминации дзОСК карциномы Льюис и оценке иммунного ответа, индуцированного проводимым лечением (Ruzanova et al., 2022). Развитие иммунного ответа подробно описано в данной диссертационной работе. Полученные в работе (Ruzanova et al., 2022) результаты предполагали возможность миграции/диссеминации дзОСК опухоли Льюис, которая зависит от количества очагов опухолевого роста. Также полученные результаты свидетельствовали о том, что при лечении мышей, несущих трансплантат карциномы Льюис, согласно подходу «Каранахан» происходила активация противоопухолевого иммунного ответа. Именно этому явлению посвящена одна из глав раздела результатов Части 1.

В дополнение к сказанному, результаты проведенного сравнительного анализа лейкоцитарного вброса в опухолевый очаг и состояния клеток с фенотипом CD11b+Ly-6G+/Ly-

6С+ первых двух (эксперименты №6 и №7) и вторых двух (эксперименты №8 и №9) идентичных экспериментов настоящего исследования также предполагают, что существует эффект сезона/года, в результате которого состояние ОАС меняется таким образом, что в первых двух случаях мы наблюдаем масштабное увеличение количества лейкоцитов в очаге опухоли, а во вторых двух экспериментах такого эффекта не наблюдается.

Предполагаются следующие разъяснения возможного механизма влияния эффекта сезона/года на эффективность подхода «Каранахан», которая связана напрямую с гормональным статусом животных в определенный момент времени и ответом опухолевых клеток на сезонное изменение физиологического состояния мышей.

Зависимость эффективности подхода «Каранахан» от года проведения экспериментов может лимитироваться межгодовой вариабельностью гелиогеофизических и природно-климатических факторов (Hegemann et al., 2012; Schultz et al., 2020).

Сезонные и циркадные изменения в биологических системах известны и охарактеризованы (Burns and Moshkin, 1998; Onishi et al., 2020; Ortiz-Tudela et al., 2016; Smolensky et al., 2016; Wyse et al., 2021). Описаны сезонные изменения в экспрессии генов микроРНК (Tiwari et al., 2021; Yao et al., 2023) и продукции фактора некроза опухоли (Huber et al., 2021). Описана сезонная корреляция частоты возникновения первичных опухолей, которую связывают с количеством вырабатываемого витамина D (Muñoz and Grant, 2022; Wikén et al., 2023), и частоты возникновения постоперационных легочных метастазов при раке молочной железы (РМЖ) (Oh et al., 2008). Известно, что многие биохимические параметры (сывороточный мелатонин, уровень стероидных рецепторов) РМЖ носят сезонный характер (Kuzmenko et al., 2021). Существует также множество экспериментальных исследований (сезонные циклы тестикулярной активности, циклический гистогенез, влияние осенней среды на пролиферацию клеток головного мозга), характеризующих сезонные и циркадные изменения в пролиферативной активности различных типов клеток, включая стволовые клетки (Aibazov et al., 2022; Golan et al., 2019; Margotta, 2015; Tendler et al., 2021). Считается, что эти изменения связаны с сезонными изменениями частоты и амплитуды высвобождения глюкокортикоидов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой (кортизола у людей, кортикостерона у грызунов). Зимний ритм с высокой амплитудой приводит к максимальной синхронизации и сдвигу во времени фаз клеточного цикла по сравнению с летним (Androulakis, 2021; Ballesta et al., 2017; Kiessling et al., 2017; Li et al., 2022; Pierre et al., 2018; Shostak, 2017; Sulli et al., 2019).

В ранних исследованиях лаборатории индуцированных клеточных процессов показана сезонная активность совместного действия ЦФ и препарата нативной ДНК человека на стволовые гемопоэтические клетки. Зимой вследствие совместного действия разрушается лимфоидный росток кроветворения и формируется промежуток времени, названный нами «окном смерти»,

который исчезает в летнее время (Dolgova et al., 2013). В экспериментах на модели Кребс-2 установлено, что репаративный цикл опухолевых клеток меняется в зависимости от сезона и что от этого изменения зависит эффективность подхода «Каранахан» (Potter et al., 2018). В экспериментах на модели опухоли Льюис так же были выявлены эффекты сезонной и годовой зависимости эффективности подхода «Каранахан». Оказалось, что в экспериментах с двумя привитыми и одним обработанным трансплантатом, проведёнными весной и осенью одного и того же года, наблюдались выраженные изменения в эффективности редукции опухоли, частоте возникновения и устойчивом развитии рецидивов. Эти результаты представлены в данной работе, а также опубликованы в научном журнале (Ruzanova et al., 2022).

Поскольку процесс репарации любых повреждений хроматина напрямую связан с пролиферацией, можно полагать, что обнаруженная сезонная изменчивость и изменчивость по годам для гемопоэтических стволовых клеток, карциномы Кребс-2 и карциномы Льюис является следствием изменения длины пролиферативного цикла, что и составляет основную причину принципиальных изменений в основных платформах подхода «Каранахан» и, как следствие, в изменении его эффективности (Potter et al., 2018).

Таким образом, результаты исследования предполагают, что для проявления противоопухолевого воздействия препарата GcMAF необходимо главное условие – разрушение супрессорного действия ОАС (MDSC, Treg). Если опухоль имеет активный защитный гуморальный фон, то GcMAF своим противовоспалительным вектором способствует защите опухоли от иммунного надзора и способствует её развитию. Если опухоль лишается супрессорного гуморального фона, то превалирующим становится опухоль-реактивный вектор GcMAF.

Сумма полученных данных свидетельствует, что препарат GcMAF, использующийся в корректном режиме в синергизме с подходом «Каранахан», усиливает иммунные противоопухолевые реакции, индуцированные подходом «Каранахан».

Так же, как в перечисленных выше исследованиях, в настоящей работе усиление противоопухолевой эффективности объединенного режима по сравнению с монорежимами иммунотерапии и химиотерапии проявляется в увеличении выживаемости экспериментальных животных и в уменьшении частоты возникновения рецидивов (Gandhi et al., 2018; Horn et al., 2018; Powles et al., 2020; Schmid et al., 2018).

Часть 2. Аддитивное противоопухолевое действие подхода «Каранахан» и активности адаптивного противоопухолевого иммунитета, индуцированного *in situ* вакцинацией антителами к OX40R

1. Определение основных параметров подхода «Каранахан» на модели иммуногенной В-клеточной лимфомы А20, перевиваемой мышам линии BALB/c

1.1. Интернализация TAMRA-меченого ДНК-зонда клетками В-клеточной лимфомы А20

На первом этапе было определено наличие ОСК, способных интернализовать дцДНК, в культуре В-клеточной лимфомы А20 по параметру интернализации экстраклеточного ДНК-зонда, меченного флуорохромным красителем TAMRA.

На рисунке 22А приведен цитологический анализ, демонстрирующий присутствие дзОСК в опухоли В-клеточной лимфомы А20. Процентное содержание дзОСК (стволовых опухолевых клеток) в опухоли В-клеточной лимфомы А20 составило 0,4%.

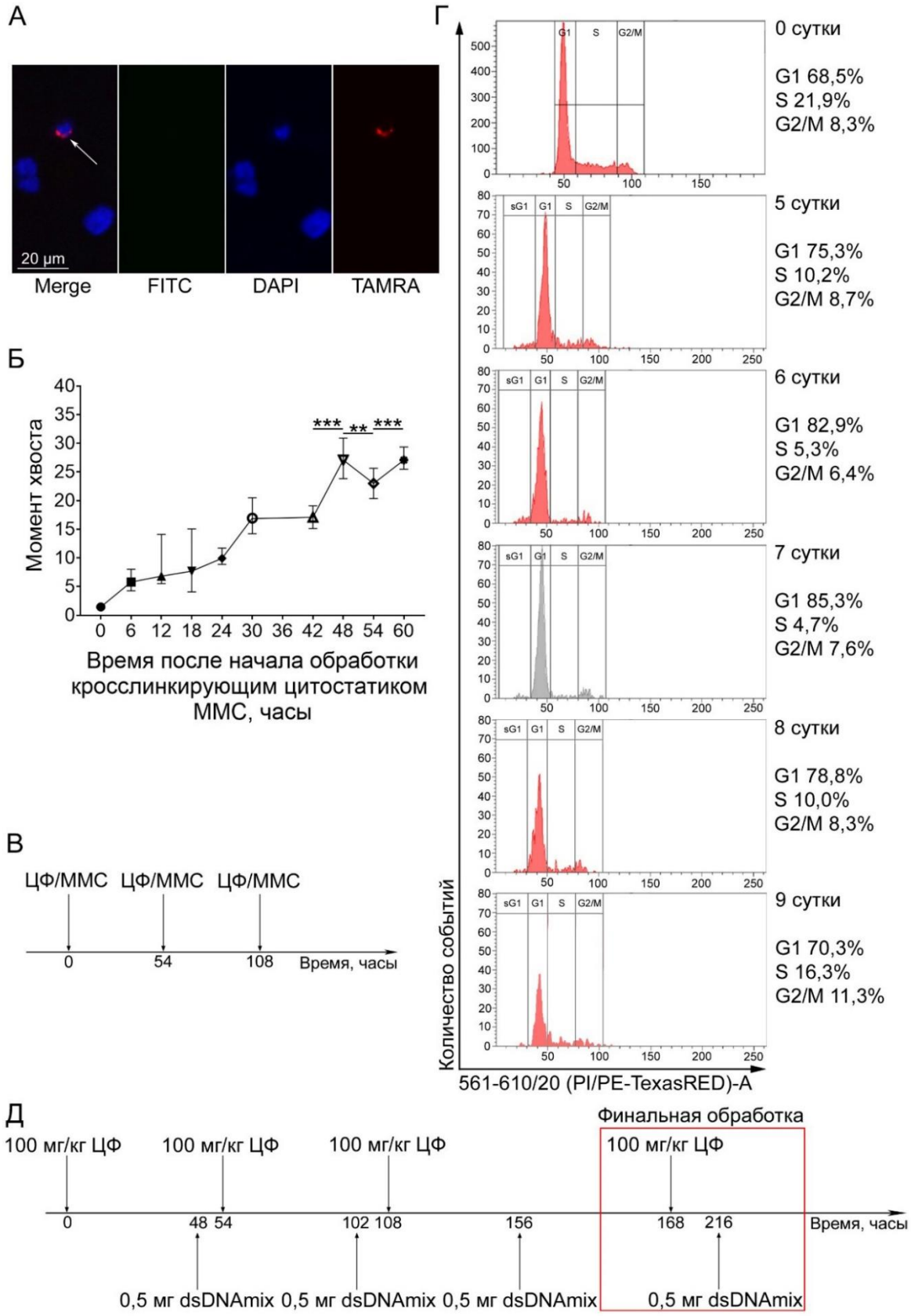


Рисунок 22. Характеристика базовых параметров терапевтического режима «Каранахан» для В-клеточной лимфомы А20. А) дзОСК. Приведены изображения в каналах FITC, DAPI, TAMRA и объединенное изображение (Merge). Стрелками указан специфический TAMRA-сигнал. Отрезок

соответствует 20 мкм. Б) Анализ репаративного цикла клеток. Динамика количества двуцепочечных разрывов в опухолевых клетках после инкубирования с ММС, оцененная методом «ДНК-комет». Отличия между точками статистически значимы: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (U-критерий Манна-Уитни). В) Терапевтическая схема трехкратной обработки, разработанная на основе параметров репаративного цикла. Для культуры клеток применяется ММС, для обработки животных применяется ЦФ. Г) Определение дня синхронизации опухолевых клеток после трехкратной обработки *in vitro* 1 мкг/мл ММС. Анализ клеточного цикла проводили при помощи окрашивания клеток йодидом пропидия. Интенсивность флуоресценции, которую вызывает йодид пропидия, пропорциональна содержанию ДНК в клетках, что позволяет различать фазы клеточного цикла. Ось X представляет относительное содержание ДНК, определяемое флуоресценцией йодида пропидия; ось Y представляет количество клеток с соответствующим содержанием ДНК. Рядом с графиками указано процентное содержание клеток в соответствующих фазах клеточного цикла. График, демонстрирующий момент синхронизации в G2/M, отмечен серым цветом. 0 сутки – клетки В-клеточной лимфомы А20 до обработки. Д) Схема терапии согласно подходу «Каранахан» для В-клеточной лимфомы А20 на мышах линии BALB/c, включающая инъекции 100 мг/кг ЦФ (в/б) и 0,5 мг/мышь препарата dsDNAmix (в/о).

1.2. Анализ временных параметров репаративного цикла клеток В-клеточной лимфомы А20 методом «ДНК-комет» после обработки ММС

Для анализа продолжительности репаративного цикла после обработки клеток В-клеточной лимфомы А20 *in vitro* кросслинкирующим цитостатиком ММС оценивалась динамика количества двуцепочечных разрывов в клетках методом «ДНК-комет».

Было установлено, что продолжительность репаративного цикла клеток В-клеточной лимфомы А20 после обработки кросслинкирующим цитостатиком ММС составляет 54 часа (Рисунок 22Б). Максимальное число двуцепочечных разрывов (переход от фазы NER к фазе HR) наблюдалось через 48 часов после воздействия ММС. При составлении временной схемы согласно подходу «Каранахан» это время использовалось для введения препарата dsDNAmix.

По результатам анализа была составлена схема трёх обработок кросслинкирующим цитостатиком В-клеточной лимфомы А20 (Рисунок 22В).

1.3. Определение времени синхронизации клеток В-клеточной лимфомы А20

Для анализа времени синхронизации клетки В-клеточной лимфомы А20 обрабатывали *in vitro* кросслинкирующим цитостатком прямого действия ММС трижды с интервалом 54 ч, согласно определенной схеме (Рисунок 22В). Анализ клеточного цикла клеток В-клеточной лимфомы А20 показал, что накопление клеток в G2/M фазе наблюдается на 7 сутки (соотношение

минимального значения клеток в S фазе и последовательного накопленного максимального количества клеток в G2/M фазе) (Рисунок 22Г). На 8-9 сутки детектировалось смешанное состояние клеток по отношению к клеточному циклу, свидетельствующее о выходе клеток из ареста.

Полученные результаты определили время финальной обработки цитостатиком на 7 сутки или спустя 168 ч после первой обработки. Именно в этот момент времени наблюдалось синхронное накопление клеток в G2/M фазе. Введение препарата dsDNAmix устанавливается в момент перехода фазы NER в фазу HR. Для опухоли В-клеточной лимфомы А20 он соответствовал 48 ч от каждого введения цитостатика. Таким образом, последняя инъекция препарата dsDNAmix приходилась на 9 сутки от начала терапии и приводила к финальной эрадикации ОСК.

В результате проведенного анализа была определена схема обработки ЦФ и препаратом dsDNAmix для В-клеточной лимфомы А20 (Рисунок 22Д).

Терапевтическая схема согласно подходу «Каранахан» для В-клеточной лимфомы А20 включала в себя три инъекции цитостатика ЦФ с интервалом 54 часа между инъекциями, четвертая финальная обработка цитостатиком ЦФ проводилась на 7 сутки или спустя 168 часов после первой обработки. Препарат dsDNAmix вводили спустя 48 часов после каждой обработки цитостатиком ЦФ.

2. Экспериментальное сравнение противоопухолевого действия подхода «Каранахан» и in situ вакцинации на модели В-клеточной лимфомы А20

Для экспериментального сравнения двух подходов в противоопухолевой терапии (эксперимент №1) мышам трансплантировали опухоль в обе задние лапы, при этом внутриопухолевым инъекциям препаратов подвергалась только опухоль на одной лапе (обработанная опухоль). Таким образом проводилась оценка возможной активации адаптивного звена иммунитета.

2.1. Лечение В-клеточной лимфомы А20 согласно терапевтическому подходу «Каранахан»

Лечение В-клеточной лимфомы А20 согласно подходу «Каранахан» продемонстрировало полную регрессию развивающихся трансплантатов на 5 сутки от начала терапии. На 33-40 сутки у 60% животных наблюдалось развитие рецидивов, при этом в среднем скорость развития графта была в 6 раз ниже скорости развития графта в контрольной группе (Рисунок 23А, В, Е). К концу периода наблюдения, на 80-е сутки от начала терапии, у 20% выживших животных опухоли в любой форме не обнаруживалось, было констатировано полное вылечивание от В-клеточной лимфомы А20 (Рисунок 23Г). Исходя из данных работы (Sagiv-Barfi et al., 2018) и анализа соотношений размеров обработанной и необработанной опухолей экспериментальной и контрольной групп, можно сделать вывод как о развитии локального врожденного иммунитета

или прямой цитотоксичности проведенной обработки, так и о развитии адаптивного иммунного ответа (Рисунок 23А, Б). Средняя продолжительность жизни составила 23 и 61 суток в контрольной и экспериментальной группах, соответственно (Рисунок 23Г, Д). Индекс торможения опухоли, вычисленный на 16 сутки эксперимента, составил 100% для обеих опухолей.

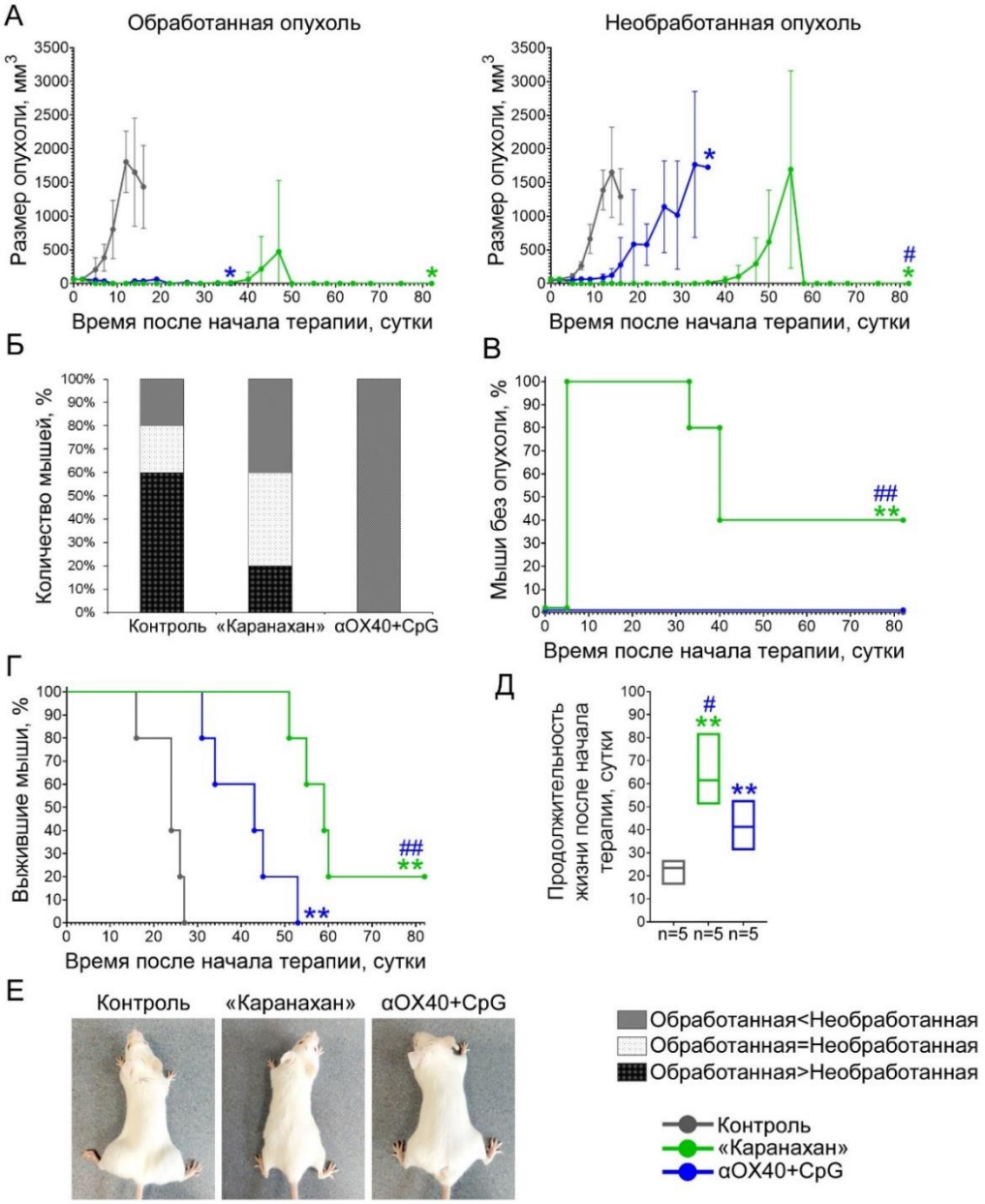


Рисунок 23. Сравнение эффективности подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации на модели иммуногенной В-клеточной лимфомы А20 на мышах с прививкой графта внутримышечно в обе задние лапы (Эксперимент №1). Контрольная группа – 5 мышей, группа «Каранахан» – 5 мышей, группа «αOX40+CpG» – 5 мышей. Мышей группы «Каранахан» обрабатывали ЦФ (в/б) по 100 мг/кг и препаратом dsDNAmix (в/о) по 0,5 мг/мышь согласно выбранной терапевтической схеме. Мышей группы «αOX40+CpG» обрабатывали совместным в/о введением CpG (50 мкг/мышь) и

αOX40 (4 мкг/мышь) в соответствии с опубликованной терапевтической схемой для *in situ* вакцинации (Sagiv-Barfi et al., 2018). Инъекции препаратами dsDNAmix, CpG и αOX40 производились только в один графт (обозначен как обработанная опухоль). А) Сравнение динамики роста опухолей в экспериментальных группах и контрольной группе, приведены средние значения ± стандартное отклонение. * – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,05$ (Множественный t-тест, Метод Бенджамини-Иекутиели). # – отличия между экспериментальными группами статистически значимы, $p < 0,05$ (Множественный t-тест, Метод Бенджамини-Иекутиели). Б) Процент животных в конечной точке эксперимента, у которых размер обработанной опухоли был меньше, чем необработанной опухоли, у которых был одинаковый размер опухолей на обеих лапах и тех, у кого размер обработанной опухоли был больше, чем размер необработанной опухоли. В) Динамика изменения количества мышей без опухоли. ** – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,01$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). ## – отличия между экспериментальными группами статистически значимы, $p < 0,01$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). Г) Выживаемость животных. ** – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,01$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). ## – отличия между экспериментальными группами статистически значимы, $p < 0,01$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). Д) Средняя продолжительность жизни в экспериментальных и контрольной группах. График – Floating bars (от минимального до максимального значения); линия на среднем значении. ** – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни). # – отличия между экспериментальными группами статистически значимы, $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни). Цвет * обозначает экспериментальную группу, которая отличается от контроля. Цвет # обозначает экспериментальную группу, от которой отличается группа, над которой поставлено условное обозначение. Е) Внешний вид животных (9 сутки после начала терапии).

2.2. Лечение В-клеточной лимфомы А20 согласно подходу in situ вакцинации

Лечение В-клеточной лимфомы А20 согласно подходу *in situ* вакцинации проводили в соответствии с работой Sagiv-Barfi et al., 2018. В данном исследовании использовался следующий режим обработок: комбинацию αOX40 (4 мкг) и олигодезоксинуклеотида CpG (50 мкг) вводили в один опухолевый сайт три раза с промежутком в 48 часов. Именно этот режим мы полностью воспроизвели в настоящем исследовании.

В группе мышей, обработанных согласно подходу *in situ* вакцинации, наблюдалась высокая эффективность терапии только для обработанных опухолей (Рисунок 23А, Б, Е). Опухоли полностью регрессировали и не вызывали рецидивов в 100% случаев, что говорит об активации врожденного иммунного ответа. Удаленный необработанный трансплантат после *in*

situ вакцинации показал двукратную задержку темпов роста по сравнению с контрольными мышами (Рисунок 23А). Полной регрессии необработанного опухолевого сайта и, следовательно, полной активации адаптивного иммунитета не произошло (Рисунок 23Б, В, Е). Средняя продолжительность жизни животных, обработанных согласно подходу *in situ* вакцинации, была почти в два раза выше по сравнению с группой контрольных мышей (средняя продолжительность жизни животных составила 23 и 41 сутки в группе контрольных и опытных животных, соответственно) (Рисунок 23Д). Индекс торможения опухоли, вычисленный на 16 сутки эксперимента, для обработанной опухоли составил 97%, а для необработанной опухоли – 79%.

Таким образом, была продемонстрирована эффективность обоих подходов в лечении экспериментальной В-клеточной лимфомы А20. Это предполагало возможность объединения терапий в одну терапевтическую платформу с целью увеличения противоопухолевой эффективности совместной терапии по сравнению с режимами монотерапий.

3. Объединение подхода «Каранахан» и in situ вакцинации CpG/αOX40 в одну терапевтическую платформу. Оценка совместного противоопухолевого действия

3.1. Пилотное объединение двух современных подходов в лечении злокачественных новообразований: подхода «Каранахан» и in situ вакцинации CpG/αOX40 на модели В-клеточной лимфомы А20

В ходе эксперимента №2 провели пробное объединение двух подходов в лечении онкологических заболеваний: подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации.

Лечение В-клеточной лимфомы А20 согласно подходу «Каранахан» в режиме монотерапии и совместно с антителами αOX40, введенными в опухолевый сайт одновременно с препаратом dsDNAmix, продемонстрировало полную регрессию развивающихся трансплантатов на 7-10 сутки от начала терапии. На 28-34 сутки в вышеупомянутых группах наблюдалось развитие рецидивов. В конечной точке эксперимента у 70% животных, получавших лечение согласно подходу «Каранахан» в режиме монотерапии и совместно с αOX40, введенными в опухолевый сайт одновременно с препаратом dsDNAmix, развились рецидивы (Рисунок 24А, Б). При этом в среднем скорость развития необработанного графта в экспериментальных группах была в 7-8 раз ниже скорости развития графта в контрольной группе (Рисунок 24А). Средняя продолжительность жизни животных, обработанных согласно подходу «Каранахан» в режиме монотерапии или совместно с αOX40, введенными в опухолевый сайт одновременно с препаратом dsDNAmix, была в 2,3 и 2 раза выше по сравнению с контрольной группой, соответственно (Рисунок 24Г). Индекс торможения опухоли, вычисленный на 10 сутки эксперимента, составил 100% в обеих опухолях для обеих экспериментальных групп.

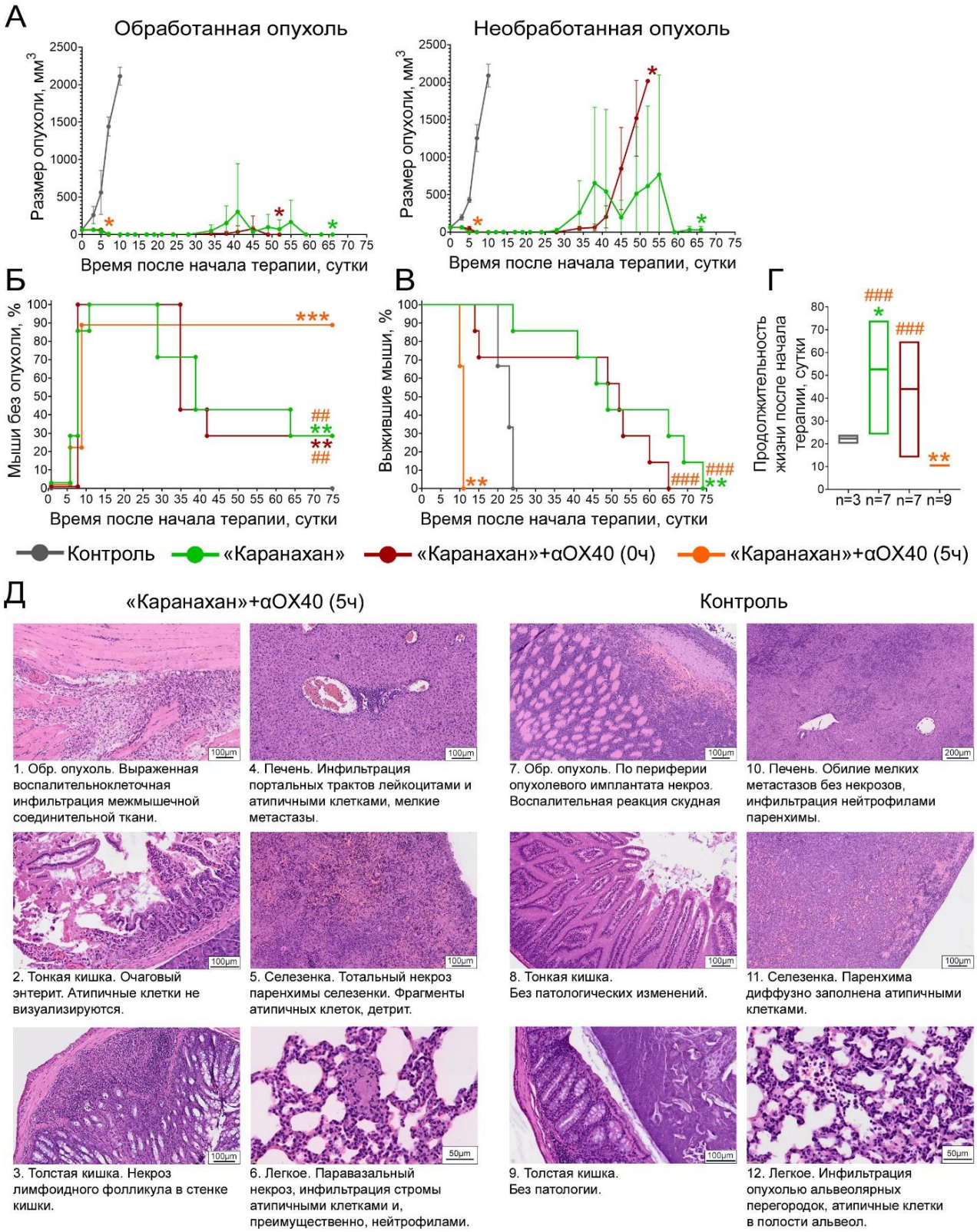


Рисунок 24. Пилотное совмещение двух подходов в лечении В-клеточной лимфомы А20 (подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации CpG/αOX40) в одну терапевтическую схему на мышах с прививкой графта внутримышечно в обе задние лапы (Эксперимент №2). Контрольная группа – 3 мыши, группа «Каранахан» – 7 мышей, группа «Каранахан»+αOX40 (0ч) – 7 мышей, «Каранахан»+αOX40 (5ч) – 9 мышей. Мышей группы «Каранахан» обрабатывали ЦФ (в/б) по 100

мг/кг и препаратом dsDNAmix (в/о) по 0,5 мг/мышь согласно выбранной терапевтической схеме. Мышей групп «Каранахан» + αOX40 (0ч) и «Каранахан» + αOX40 (5ч) обрабатывали ЦФ (в/б) по 100 мг/кг и препаратом dsDNAmix (в/о) по 0,5 мг/мышь согласно выбранной терапевтической схеме, а также αOX40 (в/о) по 8 мкг/мышь либо сразу после инъекций dsDNAmix (0ч), либо через 5 часов после инъекций dsDNAmix (5ч). Инъекции препаратами dsDNAmix и αOX40 производились только в один графт (обозначен, как обработанная опухоль). А) Сравнение динамики роста опухолей в экспериментальных группах и контрольной группе, приведены средние значения ± стандартное отклонение. * – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,05$ (Множественный t-тест, Метод Бенджамини-Иекутиели). Б) Динамика изменения количества мышей без опухоли. Отличия от контрольной группы статистически значимы: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). ## – отличия между экспериментальными группами статистически значимы, $p < 0,01$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). В) Выживаемость животных. ** – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,01$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). ### – отличия между экспериментальными группами статистически значимы, $p < 0,001$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). Г) Средняя продолжительность жизни в экспериментальных и контрольной группах. График – Floating bars (от минимального до максимального значения); линия на среднем значении. Отличия от контрольной группы статистически значимы: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни). ### – отличия между экспериментальными группами статистически значимы, $p < 0,001$ (U-критерий Манна-Уитни). Цвет * обозначает экспериментальную группу, которая отличается от контроля. Цвет # обозначает экспериментальную группу, от которой отличается группа, над которой поставлено условное обозначение. Д) Патоморфологический анализ органов животных (Эксперимент №3).

При введении αOX40 спустя 5 часов после введения препарата dsDNAmix к 8 суткам эксперимента у 90% животных наблюдалась полная регрессия развивающихся трансплантатов, однако на 10-11 сутки (в проиллюстрированном эксперименте) все животные пали практически одновременно (Рисунок 24Б, В, Г**).** Полученный результат требовал экспериментального объяснения.

Было сделано предположение, что факт стремительной гибели экспериментальных мышей при инъекциях антител в опухолевый сайт через 5 часов после введения препарата dsDNAmix может быть объяснен гиперактивацией иммунной системы и последующим развитием системной воспалительной реакции.

На следующем этапе настоящей работы были проведены многочисленные анализы, направленные на выявление причин скоротечной гибели экспериментальных животных.

3.1.1. Патоморфологический анализ органов животных

Для выяснения причин гибели мышей эксперимент по пилотному объединению двух современных подходов в лечении злокачественных новообразований (эксперимент №2) был повторен без существенных изменений, за исключением смещения времени проведения эксперимента на весенний период (эксперимент №3). При появлении признаков приближающейся гибели мышей выводили из эксперимента, выделяли и фиксировали органы для дальнейшего патоморфологического анализа.

Патоморфологический анализ показал, что при обработке мышей согласно подходу «Каранахан» совместно с αOX40, введенными спустя 5 часов после инъекции препарата dsDNAmix, в организме экспериментальных мышей развивался системный воспалительный процесс. В опухолевом сайте наблюдалась выраженная воспалительно-клеточная инфильтрация межмышечной соединительной ткани. В тонкой и толстой кишке, селезёнке, лёгких присутствовали многочисленные некрозы и обильная инфильтрация нейтрофилами, что говорило о воспалении. В селезёнке и лёгких детектировались атипичные клетки.

У контрольных мышей в опухолевом сайте наблюдался некроз, но воспалительная реакция скудная. В тонкой и толстой кишке патологических изменений обнаружено не было. В селезёнке и лёгких наблюдалось присутствие атипичных клеток.

В печени как у контрольных мышей, так и у экспериментальных мышей, наблюдалось обилие мелких метастазов и инфильтрация лейкоцитами (Рисунок 24Д).

Полученные патоморфологические данные свидетельствовали, что при обработке мышей согласно подходу «Каранахан» совместно с αOX40, введенными спустя 5 часов после введения препарата dsDNAmix, в организме животных развивался воспалительный процесс, охватывающий весь организм. Картина патологических изменений проанализированных органов и тканей свидетельствовала, что проведенные обработки индуцировали системную воспалительную реакцию, следствием которой всегда является полиорганная недостаточность и гибель организма.

В следующей части исследования были проведены эксперименты, направленные на понимание причин, послуживших развитию системного воспаления и гибели животных при обработке мышей согласно подходу «Каранахан» совместно с αOX40, введенными спустя 5 часов после введения препарата dsDNAmix.

3.1.2. Анализ клеточных популяций крови мышей, обработанных согласно подходу «Каранахан»

В данном разделе мышей с развитой опухолью обрабатывали согласно терапевтическому режиму «Каранахан» (Рисунок 22Д). Никаких дополнительных инъекций произведено не было.

Оценка абсолютного количества иммунных клеток, способных активировать системное воспаление: CD11b+Ly-6C+, CD11b+Ly-6G+

В начальном пилотном эксперименте было обнаружено, что спустя 5 часов после первой обработки препаратом dsDNAmix согласно подходу «Каранахан» наблюдается мощный выброс в кровь клеток миелоидного ряда CD11b+Ly-6C+/Ly-6G+ (моноцитов и гранулоцитов), который повторялся после второй, третьей и четвертой обработки с различной интенсивностью (Ruzanova et al., 2025).

В повторном исследовании была проведена оценка абсолютного количества клеток миелоидного ряда у животных, позволившая провести статистическую оценку события. Было показано, что спустя 5 часов после первой обработки препаратом dsDNAmix согласно подходу «Каранахан» опять наблюдается мощный выброс в кровь клеток миелоидного ряда CD11b+Ly-6C+/Ly-6G+ (моноцитов и гранулоцитов). Спустя 5 часов после второй и четвертой обработок препаратом dsDNAmix согласно подходу «Каранахан» наблюдались менее обильные выбросы в кровь клеток миелоидного ряда (Рисунок 25А). Минимальное количество клеток миелоидного ряда CD11b+Ly-6C+/Ly-6G+, способных индуцировать ситемное воспаление, детектировалось после третьей обработки ЦФ и препаратом dsDNAmix и находилось на уровне единичных клеток.

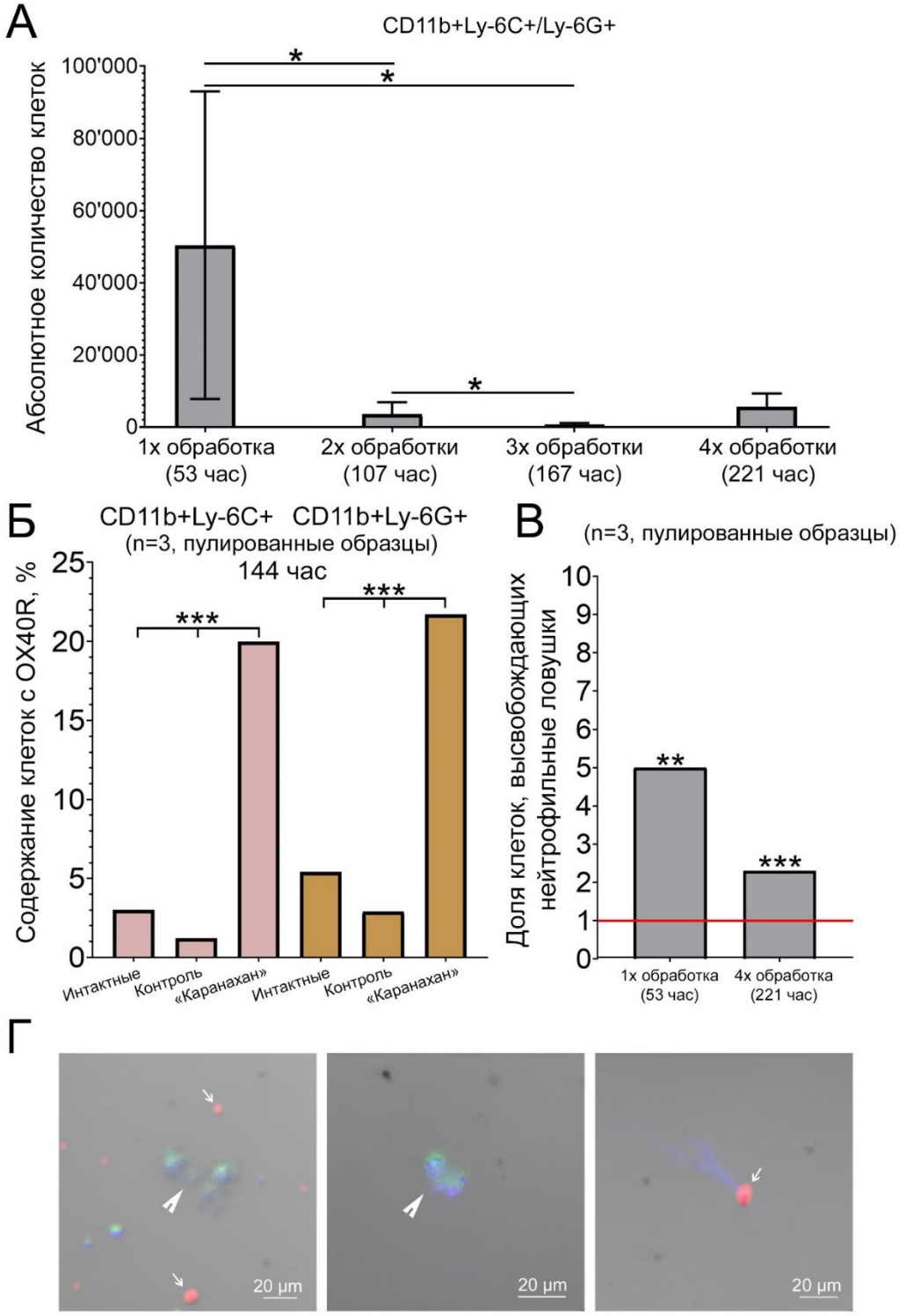


Рисунок 25. Оценка изменения количества CD11b+Ly-6C+/Ly-6G+ клеток в крови экспериментальных животных, индуцированного проведенным лечением согласно подходу «Каранахан» у мышей с В-клеточной лимфомой А20. А) Абсолютное количество клеток миелоидного происхождения CD11b+Ly-6C+/Ly-6G+ во всем объёме крови, выделенной из мышей экспериментальной группы после 1-ой, 2-ой, 3-ей и последней 4-ой обработок согласно подходу «Каранахан» (n=4 для каждой временной точки; одна обработка=ЦФ+dsDNAmix). Приведены средние значения ± стандартное отклонение. * – отличия между точками

статистически значимы, $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни). Б) Процентное содержание клеток миелоидного происхождения: моноцитов CD11b+Ly-6C+ и гранулоцитов CD11b+Ly-6G+, несущих на своей поверхности OX40R, на 6 сутки (144 час) после начала терапии согласно подходу «Каранахан» (пулированные образцы, n=3). *** – отличия между группами статистически значимы, $p < 0,001$ (χ^2-тест). В) Оценка количества клеток миелоидного происхождения с фенотипом CD11b+, несущих на своей поверхности маркер гранулоцитов Ly-6G, активированных к нетозу. На графике представлена доля клеток, высвободивших нейтрофильные ловушки в кровотоке, у мышей, обработанных согласно подходу «Каранахан», относительно контрольных мышей (обозначены красной линией). Оценивался процент CD11b+DAPI+Ly-6G+ клеток среди всей популяции CD11b+ клеток. На рисунке представлены результаты пуллированных образцов крови (n=3). Отличия между контрольной и экспериментальной группами статистически значимы: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (χ^2-тест). Г) Внешний вид нейтрофильных ловушек. Отрезок соответствует 20 мкм. Красный сигнал – CD11b+, зеленый сигнал – Ly-6G+, синий сигнал – DAPI. Клетки CD11b+ обозначены тонкой стрелкой, а клетки CD11b+DAPI+Ly-6G+ обозначены толстой стрелкой.

Совокупность полученных результатов говорила о том, что обработка экспериментальных мышей согласно подходу «Каранахан» индуцировала активацию иммунной системы с мощным выбросом в кровь моноцитов и гранулоцитов (CD11b+Ly-6C+/Ly-6G+) в определенные временные точки (через 5 часов) после инъекции препарата dsDNAmix. Именно эти клетки могли стать причиной резкой гибели животных при введении в терапию антител αOX40.

Количество клеток миелоидного происхождения: моноцитов CD11b+Ly-6C+ и гранулоцитов CD11b+Ly-6G+, несущих на своей поверхности FcR и OX40R

Установлено, что в экспериментальной системе настоящего исследования (контрольные и экспериментальные мыши) 100% CD11b+Ly-6C+/ CD11b+Ly-6G+ клеток (при созревании дают макрофаги и нейтрофилы, соответственно) несут на своей поверхности FcR. Показано, что при обработке мышей согласно подходу «Каранахан» значительно возрастало процентное содержание CD11b+Ly-6C+/CD11b+Ly-6G+ клеток, несущих на своей поверхности OX40R. Для моноцитов этот показатель менялся следующим образом: 3% – в крови интактных мышей, 1,2% – в крови контрольных мышей и 20% – в крови мышей, обработанных согласно подходу «Каранахан»; для гранулоцитов: 5,4% – в крови интактных мышей, 2,9% – в крови контрольных мышей и 21,7% – в крови мышей, обработанных согласно подходу «Каранахан» (Рисунок 25Б).

Таким образом, было показано, что на поверхности моноцитов и гранулоцитов, выброшенных в кровоток в пиковых значениях после обработки согласно подходу «Каранахан», присутствовали FcR и OX40R. Специфическое взаимодействие с агонистическими антителами

αOX40, по-видимому, являлось триггером развития системного воспаления в организме экспериментальных мышей.

Оценка количества клеток-супрессоров миелоидного происхождения с фенотипом CD11b+Ly-6G+, активированных к нетозу

На данном этапе в крови экспериментальных и контрольных мышей оценивался процент CD11b+DAPI+Ly-6G+ клеток среди всех CD11b+ клеток. Было показано, что после первой обработки согласно подходу «Каранахан» количество клеток, формирующих нейтрофильные ловушки, увеличивалось в 5 раз, а после четвёртой обработки – в 2,2 раза по сравнению с контрольными мышами (Рисунок 25В, Г).

Таким образом, при лечении В-клеточной лимфомы А20 согласно подходу «Каранахан» в определенные временные точки происходил мощный выброс в кровяное русло CD11b+Ly-6C+ и CD11b+Ly-6G+ клеток.

В последней части исследования терапевтический режим введения антител был скорректирован относительно полученных данных о пиковых и минимальных значениях популяций клеток в крови экспериментальных мышей с потенциальными цитолитическими свойствами и клеток, способных к нетозу.

3.2. Скорректированная совместная терапия согласно подходу «Каранахан» и in situ вакцинации CpG/αOX40 на модели В-клеточной лимфомы А20

Терапия опухолей согласно подходу «Каранахан» на мышиных моделях состоит из четырех процедур (обработок): инъекция цитостатика ЦФ (в/б) + инъекция препарата dsDNAmix (в/о) (Рисунок 26А). Все инъекции при этом привязаны к репаративному и клеточному циклам определенной опухолевой модели.

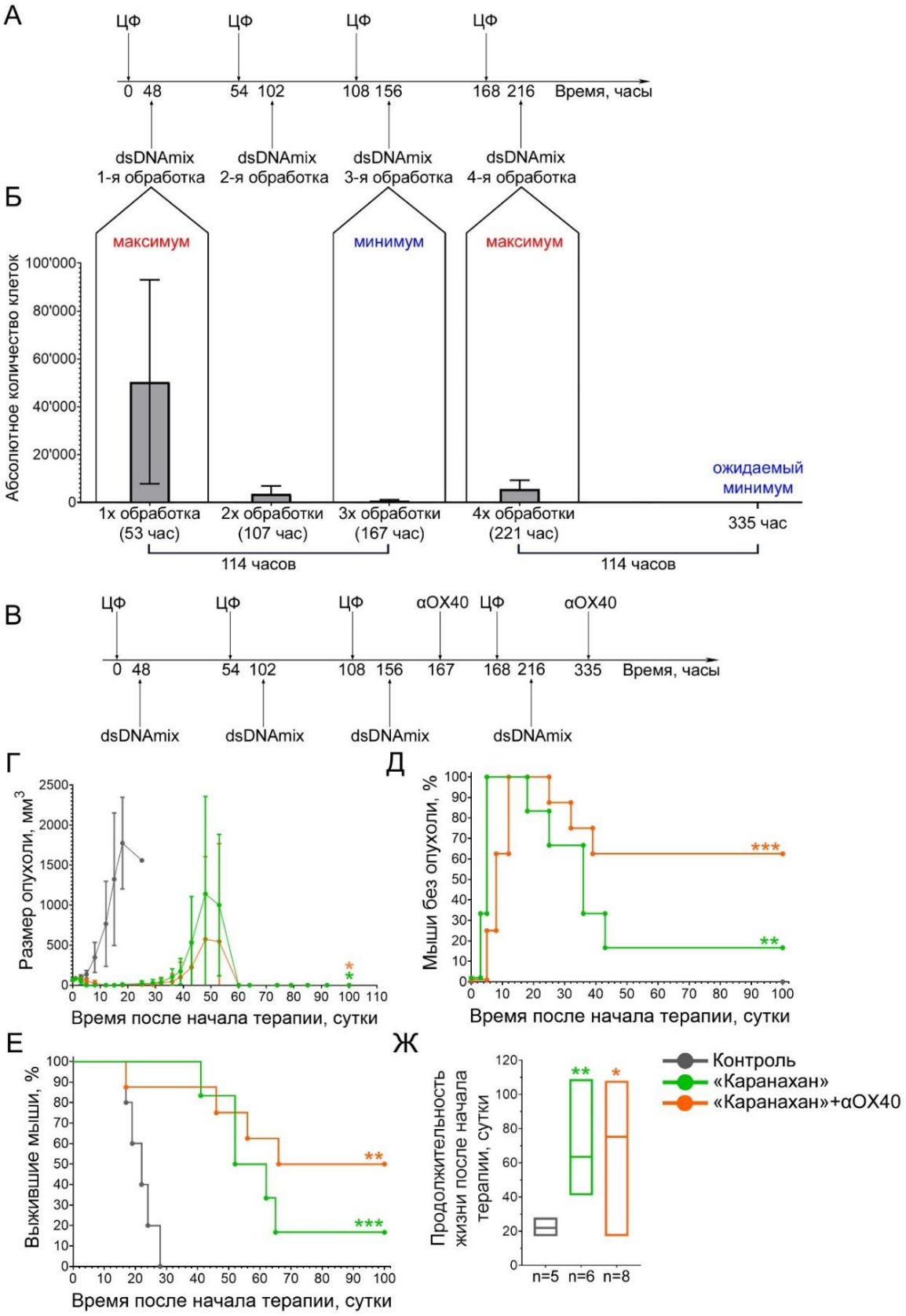


Рисунок 26. Скорректированное совмещение двух подходов лечения В-клеточной лимфомы А20 (подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации CpG/αOX40) в одну терапевтическую платформу. Эксперимент №4. А) Терапевтическая схема лечения В-клеточной лимфомы А20 согласно

подходу «Каранахан». Б) Абсолютное количество клеток миелоидного происхождения CD11b+Ly-6C+/Ly-6G+ во всем объёме крови, выделенной из мышей экспериментальной группы после 1-ой, 2-ой, 3-ей и последней 4-ой обработок согласно подходу «Каранахан» (n=4 для каждой временной точки). Приведены средние значения ± стандартное отклонение. Были определены точка мощного выброса (53 час) и две точки менее обильного выброса (107, 221 час) моноцитов и гранулоцитов в кровь. Также была определена точка минимального выброса (167 час) и была предсказана временная точка с низким выбросом моноцитов и гранулоцитов в кровь (335 час – по аналогии с наступлением минимума спустя 114 часов после 1-ой обработки). В) Терапевтическая схема лечения В-клеточной лимфомы А20 согласно подходу «Каранахан» в комбинации с *in situ* вакцинацией антителами αOX40. Г)-Ж) Сравнение противоопухолевой эффективности подхода «Каранахан» и подхода «Каранахан», объединенного с внутриопухолевыми инъекциями αOX40, на модели иммуногенной В-клеточной лимфомы А20 (Эксперимент №4). Контрольная группа – 5 мышей, группа «Каранахан» – 6 мышей, группа «Каранахан»+αOX40 – 8 мышей. Мышей группы «Каранахан» обрабатывали ЦФ (в/б) по 100 мг/кг и препаратом dsDNAmix (в/о) по 0,5 мг/мышь согласно выбранной терапевтической схеме. Мышей группы «Каранахан»+αOX40 обрабатывали ЦФ (в/б) по 100 мг/кг и препаратом dsDNAmix (в/о) по 0,5 мг/мышь согласно выбранной терапевтической схеме, а также αOX40 (в/о) по 8 мкг/мышь в две временные точки: 167 часов и 335 часов после начала терапии. Г) Сравнение динамики роста опухолей в экспериментальных группах и контрольной группе, приведены средние значения ± стандартное отклонение. * – отличия от контрольной группы статистически значимы, $p < 0,05$ (Множественный t-тест, Метод Бенджамини-Иекутиели). Д) Динамика изменения количества мышей без опухоли. Отличия от контрольной группы статистически значимы: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). Е) Выживаемость животных. Отличия от контрольной группы статистически значимы: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (Log-rank-тест (тест Мантеля-Кокса)). Ж) Средняя продолжительность жизни в экспериментальных и контрольной группах. График – Floating bars (от минимального до максимального значения); линия на среднем значении. Отличия от контрольной группы статистически значимы: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни). Цвет * обозначает экспериментальную группу, которая отличается от контроля.

Было установлено, что спустя 5 часов после 1-ой (53 час), второй (107 час) и после 4-ой (221 час) обработок согласно подходу «Каранахан» наблюдался выброс в кровь значительного количества моноцитов и гранулоцитов (Рисунок 26Б). На своей поверхности эти клетки несут FcR и OX40R. Можно полагать, что при взаимодействии рецепторов с αOX40 происходила активация литической активности макрофагов и нейтрофилов, приводящая к лизису клеток-

мишеней. Более того, в результате проведенных обработок согласно подходу «Каранахан» нейтрофилы активировались к нетозу. Вместе эти процессы индуцировали системное воспаление и полиорганную недостаточность, приводящие к гибели животных. Полученные результаты были учтены в составлении новой терапевтической схемы лечения В-клеточной лимфомы А20 в эксперименте №4, где были исключены инъекции αОХ40 антител в точках возросшего количества моноцитов и гранулоцитов в крови экспериментальных животных. Была выбрана терапевтическая схема, где αОХ40 вводились в третью временную точку (167 часов), в которой детектировалось минимальное количество клеток, способных активировать системную воспалительную реакцию, и во временную точку предсказанного минимума клеток – 335 часов (спустя 114 часов после 4-ой обработки, по аналогии с наступлением минимума спустя 114 часов после 1-ой обработки) (Рисунок 26Б, В). Этим маневром мы исключили или сделали минимально возможным наблюдаемый эффект системного воспаления, полиорганной недостаточности и гибели мышей.

Была составлена новая скорректированная экспериментальная схема совмещения двух подходов лечения В-клеточной лимфомы А20 **(**Рисунок 26В). «Каранахан»+αОХ40 – схема, при которой антитела вводили в третью временную точку (167 час) и в предсказанную временную точку с низким выбросом моноцитов и гранулоцитов в кровь (335 час).

В ходе эксперимента №4 было показано, что при обработке мышей согласно подходу «Каранахан» в режиме монотерапии наблюдалась полная регрессия опухолей на 5 сутки от начала терапии. Затем начиная с 18 суток наблюдалось развитие рецидивов у 83% мышей. При обработке мышей согласно подходу «Каранахан» совместно с антителами αОХ40 наблюдалась полная регрессия опухолей на 12 сутки от начала терапии. Затем начиная с 25 суток наблюдалось развитие рецидивов у 37% мышей (Рисунок 26Г, Д). Средняя продолжительность жизни животных, обработанных согласно подходу «Каранахан» совместно с антителами αОХ40, составляла 75 суток, что в 3,4 раза больше, чем в контрольной группе, и в 1,2 раза больше, чем в группе животных, обработанных согласно подходу «Каранахан» в режиме монотерапии (Рисунок 26Е, Ж). К 100 суткам эксперимента выжило и полностью вылечилось от В-клеточной лимфомы 50% животных в группе «Каранахан»+αОХ40 и 17% животных в группе «Каранахан» (Рисунок 26Е). В среднем скорость развития графта в экспериментальных группах была в 5 раз ниже скорости развития графта в контрольной группе (Рисунок 26Г). Индекс торможения опухоли, вычисленный на 18 сутки эксперимента, составил 99% для группы «Каранахан» и 100% для группы «Каранахан»+αОХ40.

Таким образом, было показано, что использование антител совместно с подходом «Каранахан» в режиме, когда антитела вводятся в третью временную точку (167 час) и в предсказанную временную точку с низким выбросом моноцитов и гранулоцитов в кровь (335

час), является эффективным терапевтическим подходом, существенно превосходящим монорежим согласно подходу «Каранахан». При указанном совмещенном режиме максимально был исключен элемент активации системной воспалительной реакции. Было показано, что комбинация подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации антителами αOX40 показала аддитивность с индексом CI=1,05.

Результаты второй части исследования кратко обобщены в приложении 3.

4. Обсуждение ко второй части исследования

Результаты проведенного исследования, направленного на оценку возможности объединения двух новых походов в одну высокоэффективную противоопухолевую терапию, демонстрируют, что элементы двух выбранных подходов могут вступать в конфликт, сопровождающийся гибелью всех мышей соответствующей экспериментальной группы. Проведенный анализ свидетельствует, что основной причиной конфликта является взаимодействие пяти факторов: 1) стимулирующее действие обработкой ЦФ; 2) стимулирующее действие препаратом dsDNAmix; 3) связанный с этим выброс в периферическое русло большого количества клеток с фенотипом CD11b+Ly-6C+, CD11b+Ly-6G+; 4) введение в кровоток антител к OX40R; 5) время введения антител к OX40R. Сила молекулярно-клеточного конфликта была такова, что все мыши группы погибли в одно и то же время в течение 10-11 (эксперимент №2) или 13-14 (эксперимент №3) суток после проведенной обработки (два повтора, соответственно). Как показал патоморфологический анализ, у мышей была индуцирована системная воспалительная реакция (СВР) с многочисленными расположенными повсеместно очагами воспаления. При этом при смещении времени инъекций антител αOX40 к моменту полного затихания экспансии периферического русла клетками CD11b+Ly-6C+ и CD11b+Ly-6G+, эффект гибели животных полностью исчезает, и, более того, новый вариант обработки демонстрирует аддитивный противоопухолевый эффект в сравнении с монорежимом «Каранахан».

Предполагаемый механизм индукции системной воспалительной реакции

Два типа клеток при их чрезмерной активации и присутствии в большом количестве в периферической крови способны индуцировать распространенное воспаление, обнаруженное при патоморфологическом анализе органов погибших мышей. Это макрофаги (моноцитарные клетки CD11b+Ly-6C+) и нейтрофилы (гранулоцитарные клетки CD11b+Ly-6G+). Эти популяции клеток обладают мощным арсеналом цитотолитических механизмов, которые при активации приводят к разрушению специфических мишеней. В случае отсутствия таргетных структур цитотоксические мононуклеары могут индуцировать лизис здоровых клеток и некрозы тканей в результате нереализованных активированных литических и иных механизмов (Proskurina et al., 2020). При их избыточном выбросе (появлении) в кровь такая активность будет

проявляться в возникновении множественных очагов некроза, что наблюдается у павших животных.

Чтобы разобраться в явлении синхронной скоротечной гибели всех мышей в группе мы проанализировали, как нам кажется, все возможные приемлемые к ситуации варианты активации клеток с указанным фенотипом, с которыми, как показали эксперименты, связан эффект гибели мышей. Ход активирующих событий был следующий. Мыши с установленными опухолями были обработаны ЦФ. Обработка индуцировала процесс репарации межцепочечных сшивок. Во время демаркации двух фаз репаративного процесса мышам были сделаны инъекции препарата dsDNAmix. Через 5 часов (для «летальной группы») после обработки препаратом dsDNAmix были инъецированы антитела к OX40R. Процедуры были повторены согласно расписанию подхода «Каранахан».

Как следует из анализа клеточных популяций крови, именно обработка ЦФ и dsDNAmix индуцирует выброс миелоидных супрессоров в кровь, пик которых приходится на 5 часов после инъекций препарата dsDNAmix. Что является главным триггером этого события из полученных данных определить невозможно.

На обоих типах клеток (CD11b+Ly-6C+, CD11b+Ly-6G+) экспрессируются два рецептора: FcR (Antuamwine et al., 2023) и OX40R (Weinberg et al., 2011). FcR присутствует практически на всех клетках с указанным фенотипом. Количество клеток, несущих OX40R, увеличивается до ~20% так же на обоих типах клеток. В группе необработанных контрольных мышей и интактных животных этот показатель составил в среднем около 3%. Известно, что OX40R выходит на цитоплазаматическую мембрану через 1-4 часа после индукции, с пиком в 48-72 часа (Konstorum et al., 2019; Redmond et al., 2009b, 2009a). Мы полагаем, что одновременно с выбросом в кровоток избыточного количества CD11b+Ly-6C+ и CD11b+Ly-6G+ клеток, детектируемого после введения ЦФ и препарата dsDNAmix, произошла их активация, сопровождающаяся экспрессией на цитоплазматической мембране OX40R.

Как могло повлиять на активность клеток двух популяций появление на их поверхности FcR и OX40R?

Известно, что цитотоксические иммунные клетки могут быть активированы специфическим взаимодействием агонистического лиганда и соответствующего рецептора (Fischer and Takizawa, 2022; Pourakbari et al., 2021; Wang and Wei, 2023). В анализируемой системе используются агонистические антитела к рецептору OX40. Этот факт означает, что активация цитолитических механизмов может быть связана или со специфическим взаимодействием антител к OX40R и OX40R, или за счет взаимодействия Fc-фрагмента этих же антител и FcR, или в результате двойной активации (Bournazos et al., 2020; Proskurina et al., 2020; Sagiv-Barfi et al., 2018). То есть при взаимодействии FcR/OX40R на поверхности макрофагов и (или) нейтрофилов

с αOX40 может произойти активация цитолитической активности этих клеток и индуцироваться неспецифический лизис окружающих клеток в тканях, что приведет к возникновению многочисленных некротических воспалительных очагов.

Клетки с фенотипом CD11b+Ly-6C+ относятся к моноцитарной фракции и при созревании дают макрофаги (МФ) (Liu et al., 2023). Степень зрелости CD11b+Ly-6C+ MDSC функционально определена не была. Однако экспрессия рецепторов FcR и OX40R может свидетельствовать об их зрелом состоянии.

Как известно, FcR определяет фагоцитарную активность макрофагов (Cherdyntseva et al., 2017; Li et al., 2023). Присутствие OX40R на клетках этого типа ранее показано не было. Возможно, что таким стимулирующим эффектом обладает действие ЦФ. Взаимодействие с антителами αOX40 как в варианте FcR/Fc-фрагмент, так и в варианте OX40R/αOX40, может сопровождаться активацией цитолитической активности макрофагов в виде продукции NO, свободных радикалов и провоспалительных цитокинов (Kovaleva et al., 2022), и при пиковых выбросах этих клеток в кровь будет индуцироваться неспецифический лизис любых близ расположенных клеток, что приведет к возникновению многочисленных некротически воспаленных зон. Также возможен вариант активации макрофагов через взаимодействие с антителами через FcR и одновременным взаимодействием фагоцитов с клетками, несущими OX40L. Известно, что OX40L экспрессируется на поверхности АПК, NK-клеток, активированных Т-лимфоцитов, клеток гладкой мускулатуры дыхательных путей, клеток сосудистого эндотелия (Zhao et al., 2023). Такое двойное взаимодействие будет характеризоваться и активным фагоцитозом, и «прицельным» разрушением клетки-мишени (направленным циторедуцирующим действием макрофага). Разрушение эндотелия сосудов и гладкой дыхательной мускулатуры очевидно является критическим для выживания организма. При таком сценарии также будут формироваться многочисленные очаги некрозов и воспаление будет усиливаться.

Клетки с фенотипом CD11b+Ly-6G+ относятся к полиморфноядерным лейкоцитам и при созревании они могут превращаться в нейтрофилы (Heim et al., 2018; Mehmeti-Ajradini et al., 2020). Нейтрофилы являются одним из наиболее агрессивных типов клеток иммунной системы, способных при активации лизировать любые патогены и клетки собственного организма. В киллерный (литический) потенциал нейтрофилов входит обширный арсенал молекулярных и клеточных механизмов, включающий секретируемые белковые факторы, выделение гипохлорной кислоты, активные формы кислорода, антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), выброс цитокинов TNF-α, IFN-γ, IL-1β, 2, 4, 12, усиливающих цитолитическую активность нейтрофилов, и формирование нейтрофильных ловушек (NET-нетоз) (Gruijs et al., 2021; Heemskerk and van Egmond, 2018; Liew and Kubes, 2019).

Зрелый нейтрофил несет на своей поверхности FcR, который определяет механизм ADCC. В идеале ADCC проявляется при связывании FcR нейтрофилов с антителами, образовавшими иммунные комплексы с антигенами на поверхности клетки. Такое связывание приводит к образованию синапса и дегрануляции, в результате чего клетка гибнет (Behrens et al., 2023).

Имеется работа, где показано присутствие OX40R на нейтрофилах (Kaltenmeier et al., 2022). Взаимодействие OX40R нейтрофила с OX40L сопровождается повышением общей выживаемости нейтрофилов в связи с задержкой физиологического апоптоза.

Как было сказано выше, в результате стимуляции ЦФ и препаратом dsDNAmix резко возрастает количество гранулоцитов периферической крови, детектируемое через 5 часов после введения dsDNAmix. Введение в эту точку антител к OX40R приводит к синхронной гибели мышей вследствие развития СВР. Предполагается, что активированные обработкой ЦФ и dsDNAmix нейтрофилы, несущие одновременно FcR и OX40R, при появлении антител могут осуществлять неспецифический лизис клеток, экспрессирующих OX40L, к которым относятся перечисленные выше АПК, NK-клетки, активированные Т-лимфоциты, клетки гладкой мускулатуры дыхательных путей, клетки сосудистого эндотелия (Zhao et al., 2023). Механистически антитела, связавшись с нейтрофилом, активируют механизм дегрануляции, а взаимодействие с OX40L определяет клетку-мишень, с которой будет сформирован литический синапс.

И, таким образом, два типа фагоцитов в «едином порыве» будут разрушать клетки, несущие OX40L, к наиболее критичным из которых относятся клетки эндотелия сосудов, формирующие транспортную систему организма, и клетки гладкой мускулатуры дыхательных путей, определяющие поступление кислорода в организм. Такой тип повреждений, как свидетельствуют эксперименты с животными, не совместим с жизнью.

Одним из механизмов возникновения многочисленных некрозов у мышей экспериментальной группы может быть специфическая активация нейтрофилов, вызывающая их запрограммированную гибель – нетоз с образованием специфических структур – нейтрофильных ловушек (Cahilog et al., 2020; T. Chen et al., 2021; Vorobjeva and Chernyak, 2020). Нейтрофильные ловушки способствуют агрегации эритроцитов в микрокапиллярах, что вызывает микрососудистый тромбоз и, как следствие, СВР.

Результаты свидетельствуют, что от 30% до 55% нейтрофилов, выделенных в обозначенной точке эксперимента, способны к активному нетозу (T. Chen et al., 2021; Heemskerk and van Egmond, 2018; Stacey et al., 2021). Этот факт дополнительно свидетельствует в пользу предположения, что СВР, выявленная при патоморфологическом анализе, была индуцирована агрессивными фагоцитами, в большом количестве

мобилизованными в кровоток в результате проведенной терапии согласно подходу «Каранахан». А триггером формирования нейтрофильных ловушек стали антитела к OX40R.

Таким образом, наиболее вероятным сценарием выявленного патологического процесса было следующее. При взаимодействии FcR/OX40R на поверхности макрофагов и нейтрофилов с αOX40 произошла активация цитолитической активности этих клеток и был индуцирован неспецифический лизис окружающих клеток в тканях. Кроме того, нейтрофилы были активированы к нетозу. Именно вследствие этих событий возникли повсеместные очаги некрозов и системная воспалительная реакция, которая привела к полиорганной недостаточности и гибели экспериментальных животных.

Возможность объединения подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации CpG/αOX40

Определение точки максимального присутствия и падения количества фагоцитов в крови позволили скорректировать режим введения антител. Полученный результат свидетельствует о существовании принципиальной экспериментально показанной возможности объединения подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации CpG/αOX40. Главным условием безопасности и эффективности такого объединения будет непрерывный (каждые 6 часов) мониторинг количества фагоцитов в периферической крови и определение минимальных значений после пиковых выбросов, когда будет необходимо проводить инъекции антител.

Общее заключение по работе

В проведённом исследовании была предпринята попытка объединить терапевтический подход «Каранахан» с двумя вариантами *in situ* вакцинации: первый активирует врождённый иммунитет, второй – адаптивный иммунитет. В качестве активатора врожденного иммунитета был выбран препарат GcMAF – специфический активатор макрофагов. В качестве активатора адаптивного иммунитета была использована техника, представленная в работе (Sagiv-Barfi et al., 2018), с использованием антител к OX40R. В обоих случаях были найдены условия объединения двух подходов со значительным увеличением терапевтического эффекта по сравнению с режимами монотерапии. Оказалось, что в обоих случаях важнейшим фактором совмещения техник является время.

Для варианта «Каранахан»/GcMAF был экспериментально найден режим, при котором удалось сочесть противоопухолевые свойства подхода «Каранахан» и при этом сохранить жизнеспособность и активировать противоопухолевую активность макрофагов опухоль-ассоциированной стромы. Было обнаружено, что массированная обработка опухоли препаратом GcMAF позволяет избежать индукции анергии фагоцитов и восстановить опухоль-реактивные функции ассоциированных с опухолью макрофагов. И, таким образом, для проявления противоопухолевого действия препарата GcMAF необходимо главное условие – разрушение супрессорного влияния опухоль-ассоциированной стромы. В этом случае препарат GcMAF, использующийся в корректном режиме в синергизме с подходом «Каранахан», усиливает иммунные противоопухолевые реакции, индуцированные подходом «Каранахан».

Для варианта «Каранахан»/αOX40 в первоначальных экспериментах было обнаружено летальное токсическое действие совмещенной терапии. В процессе дальнейшей работы было установлено, что такой эффект связан со стимуляцией массированного выхода на периферию клеток с фенотипом CD11b+Ly-6C+ и CD11b+Ly-6G+. Мобилизация, по-видимому, обусловлена обработкой циклофосфамидом (ЦФ) и сложнокомпозиционным препаратом двуцепочечной ДНК (dsDNAmix). На фагоцитах конститутивно присутствует FcR к Fc-фрагменту антител. В процессе мобилизации на клетках экспрессируется OX40R и они трансформируются в зрелые макрофаги и нейтрофилы. После получения дополнительного стимула в виде взаимодействия с антителами к OX40R фагоциты активируются и превращаются в агрессивные клетки, свободно циркулирующие в кровотоке. Известно, что многие клетки организма, включая антигенпрезентирующие клетки, NK-клетки, активированные Т-лимфоциты, клетки гладкой мускулатуры дыхательных путей и клетки сосудистого эндотелия, экспрессируют на своей поверхности OX40L. Оба типа активированных фагоцитов связываются с клетками, несущими

OX40L, своим OX40R. Индуцируется литический потенциал фагоцитов согласно их биологическому предназначению. Указанные выше клетки-мишени лизируются, что проявляется на уровне патоморфологического анализа, как множественные некротические очаги воспаления. Индуцируется системная воспалительная реакция и полиорганная недостаточность, сопровождающаяся синхронной гибелью всей группы животных. Экспериментально был найден временной режим введения антител αOX40 в точки минимального присутствия в периферической крови фагоцитов, позволяющий избежать такого конфликта. В результате нового режима сочетания двух подходов был получен оптимистичный результат с высоким противоопухолевым эффектом.

Таким образом, в результате проведенного исследования были получены данные, свидетельствующие о возможности объединения терапевтического подхода «Каранахан» с двумя уникальными техниками лечения опухолей на основе *in situ* вакцинации: с использованием активатора макрофагов – GcMAF и с использованием антител к OX40R.

Выводы

1. Разработанный режим введения цитостатика циклофосфамида и препарата dsDNAmix согласно подходу «Каранахан» для карциномы Льюис включает в себя три инъекции цитостатика с интервалом 28 часов между инъекциями, четвертую финальную обработку цитостатиком на 4 сутки от начала терапии, инъекции препарата dsDNAmix через 18 часов после каждой обработки цитостатиком.
2. Подход «Каранахан» демонстрирует высокую противоопухолевую эффективность на модели карциномы лёгкого Льюис, приводя к полной ремиссии у 60-70% мышей и значительному увеличению средней продолжительности жизни по сравнению с контролем**.** Применение подхода «Каранахан» обеспечивает активацию противоопухолевого иммунного ответа, выражающуюся в увеличении хелперных Т-лимфоцитов в очаге опухоли и в селезёнке, увеличении количества NK-клеток в крови, редукции супрессорных клеток миелоидного происхождения в очаге опухоли.
3. Совмещение терапевтического подхода «Каранахан» с *in situ* вакцинацией активатором системы клеток врожденного иммунитета GcMAF при его многократном внутриопухолевом введении на модели карциномы лёгкого Льюис показывает выраженный синергичный противоопухолевый эффект (CI=0,35). В дополнение к элиминации опухолевых стволовых клеток происходит усиление активации иммунного ответа и реполяризация опухоль-ассоциированных макрофагов с М2 проопухолевого фенотипа на М1 противоопухолевый фенотип.
4. Разработанный режим введения цитостатика циклофосфамида и препарата dsDNAmix согласно подходу «Каранахан» для В-клеточной лимфомы А20 включает в себя три инъекции цитостатика с интервалом 54 часа между инъекциями, четвертую финальную обработку цитостатиком на 7 сутки от начала терапии, инъекции препарата dsDNAmix через 48 часов после каждой обработки цитостатиком.
5. Подход «Каранахан» демонстрирует высокую противоопухолевую эффективность на модели В-клеточной лимфомы А20, приводя к полной ремиссии у 40% мышей и безрецидивному выживанию 20% мышей. Применение подхода «Каранахан» вызывает увеличение в периферическом русле клеток миелоидного ряда CD11b+Ly-6C+/Ly-6G+, несущих на своей поверхности FcR и OX40R, при этом в клетках CD11b+Ly-6G+ индуцируется нетоз.
6. Режим совмещения терапевтического подхода «Каранахан» с *in situ* вакцинацией активатором системы клеток адаптивного иммунитета – антителами к OX40R – на модели

В-клеточной лимфомы А20 является безопасным и эффективным при введении антител в момент минимального присутствия в периферической крови мышей CD11b+Ly-6C+/Ly-6G+ клеток миелоидного ряда. В дополнение к элиминации опухолевых стволовых клеток определенный режим обеспечивает аддитивный противоопухолевый эффект (CI=1,05).

Список сокращений

АПК – антигенпрезентирующие клетки

В/б – внутрибрюшинно

В/о – внутриопухолево

дзОСК – ДНК-захватывающие опухолевые стволовые клетки – опухолевые стволовые клетки, захватывающие TAMRA-меченный ДНК-зонд

ДК – дендритные клетки

ММХТ ЦФ – метрономная малодозовая химиотерапия циклофосфамидом

МЦС – межцепочечные сшивки

ОАС – опухоль-ассоциированная строма

ОСК – опухолевые стволовые клетки

ПМФ – перитонеальные макрофаги

РМЖ – рак молочной железы

СВР – системная воспалительная реакция

ЦФ – циклофосфамид

ADCC – antibody-dependent cellular cytotoxicity – антителозависимая клеточная цитотоксичность

BCR – B-cell receptor – B-клеточный рецептор

CpG ODN – CpG oligodeoxynucleotide – CpG олигодезоксинуклеотид (CG-обогащенный олигодезоксинуклеотид)

CSF – colony-stimulating factor – колониестимулирующий фактор

DBP – Vitamin D-binding protein – витамин D-связывающий белок

dsDNAmix – double-stranded DNA mix – сложнокомпозиционный препарат двуцепочечной ДНК

GalNAc – N-Acetyl-D-Galactosamine – N-Ацетилгалактозамин

GcMAF – Gc protein-derived Macrophage Activating Factor – групп-специфический активирующий макрофаги фактор

HR – homologous recombination – гомологичная рекомбинация

LPS – Lipopolysaccharide – липополисахарид

MDSC – Myeloid-derived suppressor cell – супрессорные клетки миелоидного происхождения: PMN-MDSC – Polymorphonuclear-MDSC – полиморфноядерные MDSC; M-MDSC – monocytic MDSC – моноцитарные MDSC

MHC – major histocompatibility complex – главный комплекс гистосовместимости

MMC – mitomycin C – митомицин С

NER – nucleotide excision repair – эксцизионная репарация нуклеотидов

NKT-клетки – natural killer T cells – естественные киллерные Т-лимфоциты

NK-клетки – natural killer cells – естественные/натуральные киллеры

OX40R/OX40L – OX40 рецептор/OX40 лиганд

αOX40 – антитело против OX40 рецептора

TAMRA – tetramethylrhodamine - тетраметилродамин

TAM – tumor-associated macrophages – опухоль-ассоциированные макрофаги: TAM1 – опухоль-ассоциированные макрофаги M1 фенотипа (противоопухолевые, классически активированные), TAM2 – опухоль-ассоциированные макрофаги M2 фенотипа (проопухолевые, альтернативно активированные макрофаги)

TAN – tumor-associated neutrophils – опухоль-ассоциированные нейтрофилы: TAN1 – опухоль-ассоциированные нейтрофилы N1 фенотипа (противоопухолевые), TAN2 – опухоль-ассоциированные нейтрофилы N2 фенотипа (проопухолевые)

TCR – T-cell receptor – Т-клеточный рецептор

Th – T helper cells – CD4+ хелперный Т-лимфоцит: Th1 – хелперный Т-лимфоцит 1-ого типа; Th2 – хелперный Т-лимфоцит 2-ого типа

TLR – Toll-like receptor –Толл-подобный рецептор

Treg – regulatory T cells – регуляторный Т-лимфоцит

Список литературы

1. Adam D. Emerging science of chronotherapy offers big opportunities to optimize drug delivery // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2019. Vol. 116, № 44. P. 21957–21959.

2. Addeo R., Sgambato A., Cennamo G., Montella L., Faiola V., Abbruzzese A., et al. Low-Dose Metronomic Oral Administration of Vinorelbine in the First-line Treatment of Elderly Patients With Metastatic Breast Cancer // Clin. Breast Cancer. 2010. Vol. 10, № 4. P. 301–306.

3. Adhikary S., Pathak S., Palani V., Acar A., Banerjee A., Al-Dewik N.I., et al. Current Technologies and Future Perspectives in Immunotherapy towards a Clinical Oncology Approach // Biomedicines. 2024. Vol. 12, № 1. P. 217.

4. Ahmed A., Tait S.W.G. Targeting immunogenic cell death in cancer // Mol. Oncol. 2020. Vol. 14, № 12. P. 2994–3006.

5. Aibazov M., Trukhachev V., Selionova M., Malorodov V. Seasonal changes in testis size, testosterone levels and sperm production quality in meat rams // Reprod. Domest. Anim. 2022. Vol. 57, № 10. P. 1125–1135.

6. Aichele P., Neumann-Haefelin C., Ehl S., Thimme R., Cathomen T., Boerries M., et al. Immunopathology caused by impaired CD8+ T-cell responses // Eur. J. Immunol. 2022. Vol. 52, № 9. P. 1390–1395.

7. Al-Shammri S., Chattopadhyay A., Hanah M.G., Doi S., Akanji A. Association of Blood Levels of Vitamin D and Its Binding Protein with Clinical Phenotypes of Multiple Sclerosis // Biomedicines. 2023. Vol. 11, № 7. P. 1808.

8. Alamilla-Presuel J.C., Burgos-Molina A.M., González-Vidal A., Sendra-Portero F., Ruiz-Gómez M.J. Factors and molecular mechanisms of radiation resistance in cancer cells // Int. J. Radiat. Biol. 2022. Vol. 98, № 8. P. 1301–1315.

9. Aldoghachi A.F., Chong Z.X., Yeap S.K., Cheong S.K., Ho W.Y., Ong A.H.K. Stem Cells for Cancer Therapy: Translating the Uncertainties and Possibilities of Stem Cell Properties into Opportunities for Effective Cancer Therapy // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, № 2. P. 1012.

10. Alizadeh D., Larmonier N. Chemotherapeutic targeting of cancer-induced immunosuppressive cells // Cancer Res. 2014. Vol. 74, № 10. P. 2663–2668.

11. Almeida J.S., Casanova J.M., Santos-Rosa M., Tarazona R., Solana R., Rodrigues-Santos P. Natural Killer T-like Cells: Immunobiology and Role in Disease // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, № 3. P. 2743.

12. Alrefaei A., Alzahrani M., Alsuhaim S. Cyclophosphamide related toxicity; a systematic review // Int. J. Med. Dev. Ctries. 2022. Vol. 6, № 5. P. 740–747.

13. Alves A.L. V., Gomes I.N.F., Carloni A.C., Rosa M.N., da Silva L.S., Evangelista A.F., et al. Role

of glioblastoma stem cells in cancer therapeutic resistance: a perspective on antineoplastic agents from natural sources and chemical derivatives // Stem Cell Res. Ther. 2021. Vol. 12, № 1. P. 1–22.

14. Alves Costa Silva C., Facchinetti F., Routy B., Derosa L. New pathways in immune stimulation: targeting OX40 // ESMO Open. 2020. Vol. 5, № 1. P. e000573.

15. Alyamkina E.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Dolgova E. V., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., et al. A strategy of tumor treatment in mice with doxorubicin-cyclophosphamide combination based on dendritic cell activation by human double-stranded DNA preparation // Genet. Vaccines Ther. 2010. Vol. 8, № 1. P. 7.

16. Alyamkina E.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Minkevich A.M., Kozel A. V, Dolgova E. V, et al. Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts // Cancer Cell Int. 2015. Vol. 15, № 1. P. 32.

17. Amiama-Roig A., Verdugo-Sivianes E.M., Carnero A., Blanco J.R. Chronotherapy: Circadian Rhythms and Their Influence in Cancer Therapy // Cancers (Basel). 2022. Vol. 14, № 20. P. 5071.

18. Andersen M.H. Tumor microenvironment antigens // Semin. Immunopathol. 2022. Vol. 45, № 2. P. 253.

19. Anderson N.M., Simon M.C. The tumor microenvironment // Curr. Biol. 2020. Vol. 30, № 16. P. R921–R925.

20. Androulakis I.P. Circadian rhythms and the HPA axis: A systems view // WIREs Mech. Dis. 2021. Vol. 13, № 4. P. e1518.

21. Antuamwine B.B., Bosnjakovic R., Hofmann-Vega F., Wang X., Theodosiou T., Iliopoulos I., et al. N1 versus N2 and PMN-MDSC: A critical appraisal of current concepts on tumor-associated neutrophils and new directions for human oncology // Immunol. Rev. 2023. Vol. 314, № 1. P. 250–279.

22. Attina G., Mastrangelo S., Romano A., Talloa D., Maurizi P., Ruggiero A. Metronomic Chemotherapy : An Alternative Strategy in Cancer Treatment Based on Continuous Low-Dose Administration // Biomed. Pharmacol. J. 2025. Vol. 18, № 3. P. 1917–1924.

23. Baci D., Bosi A., Gallazzi M., Rizzi M., Noonan D.M., Poggi A., et al. The Ovarian Cancer Tumor Immune Microenvironment (TIME) as Target for Therapy: A Focus on Innate Immunity Cells as Therapeutic Effectors // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21, № 9. P. 3125.

24. Baeyens A., Saadoun D., Billiard F., Rouers A., Grégoire S., Zaragoza B., et al. Effector T Cells Boost Regulatory T Cell Expansion by IL-2, TNF, OX40, and Plasmacytoid Dendritic Cells Depending on the Immune Context // J. Immunol. 2015. Vol. 194, № 3. P. 999–1010.

25. Bakar S.N., Kue C.S. A Combination Therapy of Cyclophosphamide and Immunomodulating Agents in Cancer // Curr. Cancer Drug Targets. 2025. Vol. 25, № 10. P. 1187–1199.

26. Bakhtiyaridovvombaygi M., Yazdanparast S., Kheyrandish S., Safdari S.M., Amiri Samani F., Sohani M., et al. Harnessing natural killer cells for refractory/relapsed non-Hodgkin lymphoma:

biological roles, clinical trials, and future prospective // Biomark. Res. 2024. Vol. 12, № 1. P. 1–44.

27. Ballesta A., Innominato P.F., Dallmann R., Rand D.A., Lévi F.A. Systems chronotherapeutics // Pharmacol. Rev. 2017. Vol. 69, № 2. P. 161–199.

28. Barbosa C.R.R., Barton J., Shepherd A.J., Mishto M. Mechanistic diversity in MHC class I antigen recognition // Biochem. J. 2021. Vol. 478, № 24. P. 4187–4202.

29. Barcelos S., Ricciuti D., Mondanelli G., Gargaro M. Rewriting the dendritic cell code in cancer — from subset identity to immunotherapeutic design // FEBS Lett. 2025. Vol. 599, P. 2060–2083.

30. Barnabei L., Laplantine E., Mbongo W., Rieux-Laucat F., Weil R. NF-κB: At the Borders of Autoimmunity and Inflammation // Front. Immunol. 2021. Vol. 12, P. 716469.

31. Basu A., Ramamoorthi G., Albert G., Gallen C., Beyer A., Snyder C., et al. Differentiation and Regulation of TH Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy // Front. Immunol. 2021. Vol. 12, P. 669474.

32. Bayatipoor H., Mehdizadeh S., Jafarpour R., Shojaei Z., Pashangzadeh S., Motallebnezhad M. Role of NKT cells in cancer immunotherapy—from bench to bed // Med. Oncol. 2022. Vol. 40, № 1. P. 1–15.

33. Behranvand N., Nasri F., Zolfaghari Emameh R., Khani P., Hosseini A., Garssen J., et al. Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment // Cancer Immunol. Immunother. 2021. Vol. 71, № 3. P. 507–526.

34. Behrens L.M., van Egmond M., van den Berg T.K. Neutrophils as immune effector cells in antibody therapy in cancer // Immunol. Rev. 2023. Vol. 314, № 1. P. 280–301.

35. Benny S., Mishra R., Manojkumar M.K., Aneesh T.P. From Warburg effect to Reverse Warburg effect ; the new horizons of anti- cancer therapy // Med. Hypotheses. 2020. Vol. 144, P. 110216.

36. van den Bijgaart R.J.E., Schuurmans F., Fütterer J.J., Verheij M., Cornelissen L.A.M., Adema G.J. Immune Modulation Plus Tumor Ablation: Adjuvants and Antibodies to Prime and Boost Anti-Tumor Immunity *In Situ* // Front. Immunol. 2021. Vol. 12, P. 617365.

37. Bogachev S., Dolgova E., Potter E., Proskurina A., Ritter G., Nikolin V., et al. A method for the treatment of cancer. RU 2662354 C1, 2018.

38. Bogachev S.S., Dolgova E. V., Potter E.A., Proskurina A.S., Ritter G.S., Efremov Y.R., et al. Method of subcutaneous transplant growth inhibition of experimental human glioblastoma U-87, transplanted to immunodeficient mice Nu/J. RU 2717218 C1, 2020.

39. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell // Nat. Med. 1997. Vol. 3, № 7. P. 730–737.

40. Bouillon R., Schuit F., Antonio L., Rastinejad F. Vitamin D Binding Protein: A Historic Overview // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2020. Vol. 10, P. 910.

41. Bournazos S., Gupta A., Ravetch J. V. The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent

enhancement // Nat. Rev. Immunol. 2020. Vol. 20, № 10. P. 633–643.

42. Bravetti G., Falvo P., Talarico G., Orecchioni S., Bertolini F. Metronomic chemotherapy, dampening of immunosuppressive cells, antigen presenting cell activation, and T cells. A quartet against refractoriness and resistance to checkpoint inhibitors // Cancer Lett. 2023. Vol. 577, P. 216441.

43. Brettschneider E.E.S., Terabe M. The Role of NKT Cells in Glioblastoma // Cells. 2021. Vol. 10, № 7. P. 1641.

44. Broere F., Van Eden W. T Cell Subsets and T Cell-Mediated Immunity // Nijkamp Parnham's Princ. Immunopharmacol. 2019. P. 23–35.

45. Bruni D., Angell H.K., Galon J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy // Nat. Rev. Cancer. 2020. Vol. 20, № 11. P. 662–680.

46. Bubin R., Uljanovs R., Strumfa I. Cancer Stem Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, № 8. P. 7030.

47. Buhtoiarov I.N., Sondel P.M., Wigginton J.M., Buhtoiarova T.N., Yanke E.M., Mahvi D.A., et al. Anti-tumour synergy of cytotoxic chemotherapy and anti-CD40 plus CpG-ODN immunotherapy through repolarization of tumour-associated macrophages // Immunology. 2011. Vol. 132, № 2. P. 226–239.

48. Burks J., Olkhanud P.B., Berzofsky J.A. The role of NKT cells in gastrointestinal cancers // Oncoimmunology. 2022. Vol. 11, № 1. P. 2009666.

49. Burns J., Moshkin M. Internal coordination of circadian rhythms and temporal synergism in animal adaptive reactions // Zh. Obshch. Biol. 1998. Vol. 59, № 4. P. 377–399.

50. Butcher M.J., Zhu J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice // Fac. Rev. 2021. Vol. 10, № 30. P. 30.

51. Cahilog Z., Zhao H., Wu L., Alam A., Eguchi S., Weng H., et al. The Role of Neutrophil NETosis in Organ Injury: Novel Inflammatory Cell Death Mechanisms // Inflammation. 2020. Vol. 43, № 6. P. 2021–2032.

52. Cao J., Yan Q. Cancer Epigenetics, Tumor Immunity, and Immunotherapy // Trends in Cancer. 2020. Vol. 6, № 7. P. 580–592.

53. Cao L., Meng X., Zhang Z., Liu Z., He Y. Macrophage heterogeneity and its interactions with stromal cells in tumour microenvironment // Cell Biosci. 2024. Vol. 14, № 1. P. 1–22.

54. Cardoso A.P., Pinto M.L., Castro F., Costa Â.M., Marques-Magalhães Â., Canha-Borges A., et al. The immunosuppressive and pro-tumor functions of CCL18 at the tumor microenvironment // Cytokine Growth Factor Rev. 2021. Vol. 60, P. 107–119.

55. Cazzaniga M.E., Cordani N., Capici S., Cogliati V., Riva F., Cerrito M.G. Metronomic Chemotherapy // Cancers (Basel). 2021. Vol. 13, № 9. P. 2236.

56. Chakraborty S., Park C.Y. Pathogenic Mechanisms in Acute Myeloid Leukemia // Curr. Treat.

Options Oncol. 2022. Vol. 23, № 11. P. 1522–1534.

57. Chang W.-W., Timis T., Buruiana S., Dima D., Nistor M., Maria Muresan X., et al. Advances in Cell and Immune Therapies for Melanoma // Biomedicines. 2025. Vol. 13, № 1. P. 98.

58. Chen B.J., Zhao J.W., Zhang D.H., Zheng A.H., Wu G.Q. Immunotherapy of Cancer by Targeting Regulatory T cells // Int. Immunopharmacol. 2022. Vol. 104, P. 108469.

59. Chen C., Doloff J.C., Waxman D.J. Intermittent Metronomic Drug Schedule Is Essential for Activating Antitumor Innate Immunity and Tumor Xenograft Regression // Neoplasia. 2014. Vol. 16, № 1. P. 84–96.

60. Chen D.S., Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer–immune set point // Nature. 2017. Vol. 541, № 7637. P. 321–330.

61. Chen H., Guo J., Bian F., Zhao Y. Microfluidic technologies for cell deformability cytometry // Smart Med. 2022. Vol. 1, № 1. P. e20220001.

62. Chen T., Li Y., Sun R., Hu H., Liu Y., Herrmann M., et al. Receptor-Mediated NETosis on Neutrophils // Front. Immunol. 2021. Vol. 12, P. 775267.

63. Chen Z. Da, Zhang P.F., Xi H.Q., Wei B., Chen L., Tang Y. Recent Advances in the Diagnosis, Staging, Treatment, and Prognosis of Advanced Gastric Cancer: A Literature Review // Front. Med. 2021. Vol. 8, P. 744839.

64. Cheng W., Kang K., Zhao A., Wu Y. Dual blockade immunotherapy targeting PD-1/PD-L1 and CTLA-4 in lung cancer // J. Hematol. Oncol. 2024. Vol. 17, № 1. P. 1–24.

65. Cheng X., Wei Y., Jiang X., Wang C., Liu M., Yan J., et al. Insight into the Prospects for Tumor Therapy Based on Photodynamic Immunotherapy // Pharmaceuticals. 2022. Vol. 15, № 11. P. 1359.

66. Cherdyntseva N. V., Mitrofanova I. V., Buldakov M.A., Stakheeva M.N., Patysheva M.R., Zavjalova M. V., et al. Macrophages and tumor progression: on the way to macrophage-specific therapy // Bull. Sib. Med. 2017. Vol. 16, № 4. P. 61–74.

67. Chong C., Coukos G., Bassani-Sternberg M. Identification of tumor antigens with immunopeptidomics // Nat. Biotechnol. 2021. Vol. 40, № 2. P. 175–188.

68. Choucroun P., Gillet D., Dorange G., Sawicki B., Dewitte J.D. Comet assay and early apoptosis // Mutat. Res. 2001. Vol. 478, P. 89–96.

69. Coënon L., Geindreau M., Ghiringhelli F., Villalba M., Bruchard M. Natural Killer cells at the frontline in the fight against cancer // Cell Death Dis. 2024. Vol. 15, № 8. P. 1–14.

70. Collins A.T., Berry P.A., Hyde C., Stower M.J., Maitland N.J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells // Cancer Res. 2005. Vol. 65, № 23. P. 10946–10951.

71. Colturato-Kido C., Lopes R.M., Medeiros H.C.D., Costa C.A., Prado-Souza L.F.L., Ferraz L.S., et al. Inhibition of autophagy enhances the antitumor effect of thioridazine in acute lymphoblastic leukemia cells // Life. 2021. Vol. 11, № 4. P. 365.

72. Cornel A.M., Mimpen I.L., Nierkens S. MHC Class I Downregulation in Cancer: Underlying Mechanisms and Potential Targets for Cancer Immunotherapy // Cancers (Basel). 2020. Vol. 12, № 7. P. 1760.

73. Correnti M., Binatti E., Gammella E., Invernizzi P., Recalcati S. The Emerging Role of Tumor Microenvironmental Stimuli in Regulating Metabolic Rewiring of Liver Cancer Stem Cells // Cancers (Basel). 2022. Vol. 15, № 1. P. 5.

74. Cózar B., Greppi M., Carpentier S., Narni-Mancinelli E., Chiossone L., Vivier E. Tumor-infiltrating natural killer cells // Cancer Discov. 2021. Vol. 11, № 1. P. 34–44.

75. Crispin J.C., Tsokos G.C. Cancer immunosurveillance by CD8 T cells // F1000Research. 2020. Vol. 9, P. F1000 Faculty Rev-80.

76. Croft M., Salek-Ardakani S., Ware C.F. Targeting the TNF and TNFR superfamilies in autoimmune disease and cancer // Nat. Rev. Drug Discov. 2024. Vol. 23, № 12. P. 939–961.

77. Croft M., So T., Duan W., Pejman S. The Significance of OX40 and OX40L to T cell Biology and Immune Disease // Immunol Rev. 2009. Vol. 229, № 1. P. 173–191.

78. Curi R., Levada-Pires A.C., Silva E.B. Da, Poma S.D.O., Zambonatto R.F., Domenech P., et al. The Critical Role of Cell Metabolism for Essential Neutrophil Functions // Cell. Physiol. Biochem. 2020. Vol. 54, № 4. P. 629–647.

79. Curley M.D., Therrien V.A., Cummings C.L., Sergent P.A., Koulouris C.R., Friel A.M., et al. CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer // Stem Cells. 2009. Vol. 27, № 12. P. 2875–2883.

80. Cyster J.G., Allen C.D.C. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions // Cell. 2019. Vol. 177, № 3. P. 524–540.

81. Dalerba P., Dylla S.J., Park I.K., Liu R., Wang X., Cho R.W., et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. Vol. 104, № 24. P. 10158–10163.

82. Damato A.R., Herzog E.D. Circadian clock synchrony and chronotherapy opportunities in cancer treatment // Semin. Cell Dev. Biol. 2022. Vol. 126, P. 27–36.

83. Das S., Khan T.H., Sarkar D. Comprehensive Review on the Effect of Stem Cells in Cancer Progression // Curr. Tissue Microenviron. Reports. 2024. Vol. 5, № 2. P. 39–59.

84. Delfanti G., Dellabona P., Casorati G., Fedeli M. Adoptive Immunotherapy With Engineered iNKT Cells to Target Cancer Cells and the Suppressive Microenvironment // Front. Med. 2022. Vol. 9, P. 897750.

85. Delrue C., Speeckaert M.M. Vitamin D and Vitamin D-Binding Protein in Health and Disease // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, № 5. P. 4642.

86. Deng Z., Qing Q., Huang B. A bibliometric analysis of the application of the PI3K-AKT-mTOR

signaling pathway in cancer // Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol. 2024. Vol. 397, № 10. P. 7255–7272.

87. Desai K., McManus J.M., Sharifi N. Hormonal Therapy for Prostate Cancer // Endocr. Rev. 2021. Vol. 42, № 3. P. 354–373.

88. Dhatchinamoorthy K., Colbert J.D., Rock K.L. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation // Front. Immunol. 2021. Vol. 12, P. 636568.

89. Dimeloe S., Frick C., Fischer M., Gubser P.M., Razik L., Bantug G.R., et al. Human regulatory T cells lack the cyclophosphamideextruding transporter ABCB1 and are more susceptible to cyclophosphamide-induced apoptosis // Eur. J. Immunol. 2014. Vol. 44, № 12. P. 3614–3620.

90. Dolgova E. V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Tyrinova T. V., et al. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination. // Cancer Biol. Ther. 2014. Vol. 15, № 10. P. 1378–1394.

91. Dolgova E. V., Efremov Y.R., Orishchenko K.E., Andrushkevich O.M., Alyamkina E.A., Proskurina A.S., et al. Delivery and processing of exogenous double-stranded DNA in mouse CD34+ hematopoietic progenitor cells and their cell cycle changes upon combined treatment with cyclophosphamide and double-stranded DNA // Gene. 2013. Vol. 528, № 2. P. 74–83.

92. Dolgova E. V., Kirikovich S.S., Levites E. V., Ruzanova V.S., Proskurina A.S., Ritter G.S., et al. Analysis of the Biological Properties of Blood Plasma Protein with GcMAF Functional Activity // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, № 15. P. 8075.

93. Dolgova E. V., Petrova D.D., Proskurina A.S., Ritter G.S., Kisaretova P.E., Potter E.A., et al. Identification of the xenograft and its ascendant sphere-forming cell line as belonging to EBV-induced lymphoma, and characterization of the status of sphere-forming cells // Cancer Cell Int. 2019. Vol. 19, P. 120.

94. Dolgova E. V., Potter E.A., Proskurina A.S., Minkevich A.M., Chernych E.R., Ostanin A.A., et al. Properties of internalization factors contributing to the uptake of extracellular DNA into tumor-initiating stem cells of mouse Krebs-2 cell line // Stem Cell Res. Ther. 2016a. Vol. 7, № 1. P. 76.

95. Dolgova E. V., Shevela E.Y., Tyrinova T. V., Minkevich A.M., Proskurina A.S., Potter E.A., et al. Nonadherent spheres with multiple myeloma surface markers contain cells that contribute to sphere formation and are capable of internalizing extracellular double-stranded DNA // Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk. 2016b. Vol. 16, № 10. P. 563–576.

96. Dolgova E. V, Andrushkevich O.M., Kisaretova P.E., Proskurina A.S., Ritter G.S., Dubatolova T.D., et al. Efficacy of the new therapeutic approach in curing malignant neoplasms on the model of human glioblastoma // Cancer Biol. Med. 2021. Vol. 18, № 3. P. 910–930.

97. Dolgova E.V., Mishinov S.V., Proskurina A.S., Potter E.A., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., et al. Novel Cancer Stem Marker and Its Applicability for Grading Primary Human Gliomas // Technol.

Cancer Res. Treat. 2018a. Vol. 17, P. 153303461775381.

98. Dolgova E.V., Proskurina A.S., Potter E.A., Tyrinova T. V., Taranov O.S., Efremov Y.R., et al. Evaluation of a strategy for tumor-initiating stem cell eradication in primary human glioblastoma cultures as a model // Vavilov J. Genet. Breed. 2018b. Vol. 22, № 7. P. 825–836.

99. Doloff J.C., Chen C.-S., Waxman D.J. Anti-tumor innate immunity activated by intermittent metronomic cyclophosphamide treatment of 9L brain tumor xenografts is preserved by anti-angiogenic drugs that spare VEGF receptor 2 // Mol. Cancer. 2014. Vol. 13, № 1. P. 158.

100. Doloff J.C., Waxman D.J. VEGF receptor inhibitors block the ability of metronomically dosed cyclophosphamide to activate innate immunity-induced tumor regression // Cancer Res. 2012. Vol. 72, № 5. P. 1103–1115.

101. Doustmihan A., Fathi M., Mazloomi M.A., Salemi A., Hamblin M.R., Jahanban-Esfahlan R. Molecular targets, therapeutic agents and multitasking nanoparticles to deal with cancer stem cells: A narrative review // J. Control. Release. 2023. Vol. 363, P. 57–83.

102. Du W., Frankel T.L., Green M., Zou W. IFNγ signaling integrity in colorectal cancer immunity and immunotherapy // Cell. Mol. Immunol. 2021. Vol. 19, № 1. P. 23–32.

103. Duarte D., Vale N. Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology // Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov. 2022. Vol. 3, P. 100110.

104. Dysthe M., Parihar R. Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment // Adv. Exp. Med. Biol. 2020. Vol. 1224, P. 117–140.

105. East J.E., Kennedy A.J., Webb T.J. Raising the Roof: The Preferential Pharmacological Stimulation of Th1 and Th2 Responses Mediated by NKT Cells // Med. Res. Rev. 2014. Vol. 34, № 1. P. 45–76.

106. El-Serafi I., Steele S. Cyclophosphamide Pharmacogenomic Variation in Cancer Treatment and Its Effect on Bioactivation and Pharmacokinetics // Adv. Pharmacol. Pharm. Sci. 2024. Vol. 2024, P. 4862706.

107. Emens L.A., Romero P.J., Anderson A.C., Bruno T.C., Capitini C.M., Collyar D., et al. Challenges and opportunities in cancer immunotherapy: a Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) strategic vision // J. Immunother. Cancer. 2024. Vol. 12, № 6. P. e009063.

108. Emilius L., Bremm F., Binder A.K., Schaft N., Dörrie J. Tumor Antigens beyond the Human Exome // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25, № 9. P. 4673.

109. Eramo A., Lotti F., Sette G., Pilozzi E., Biffoni M., Di Virgilio A., et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population // Cell Death Differ. 2008. Vol. 15, № 3. P. 504–514.

110. Fagiani F., Di Marino D., Romagnoli A., Travelli C., Voltan D., Mannelli L.D.C., et al. Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases // Signal Transduct. Target. Ther. 2022. Vol. 7, № 1. P. 1–20.

111. Fan J., Shi J., Zhang Y., Liu J., An C., Zhu H., et al. NKG2D discriminates diverse ligands through selectively mechano-regulated ligand conformational changes // EMBO J. 2021. Vol. 41, № 2. P. e107739.

112. Farahzadi R., Valipour B., Fathi E., Pirmoradi S., Molavi O., Montazersaheb S., et al. Oxidative stress regulation and related metabolic pathways in epithelial–mesenchymal transition of breast cancer stem cells // Stem Cell Res. Ther. 2023. Vol. 14, № 1. P. 1–19.

113. Fatma H., Siddique H.R. Cancer cell plasticity, stem cell factors, and therapy resistance: how are they linked? // Cancer Metastasis Rev. 2023. Vol. 43, № 1. P. 423–440.

114. Fehri E., Ennaifer E., Bel Haj Rhouma R., Ardhaoui M., Boubaker S. TLR9 and Glioma: Friends or Foes? // Cells. 2022. Vol. 12, № 1. P. 152.

115. Finn O.J. Human Tumor Antigens Yesterday, Today, and Tomorrow // Cancer Immunol. Res. 2017. Vol. 5, № 5. P. 347.

116. Fischer R., Kontermann R.E., Pfizenmaier K. Selective Targeting of TNF Receptors as a Novel Therapeutic Approach // Front. Cell Dev. Biol. 2020. Vol. 8, P. 533034.

117. Fischer U., Takizawa F. Cellular Immune Responses // Princ. Fish Immunol. 2022. P. 141–176.

118. Fishelson Z., Kirschfink M. Complement C5b-9 and Cancer: Mechanisms of Cell Damage, Cancer Counteractions, and Approaches for Intervention // Front. Immunol. 2019. Vol. 10, P. 752.

119. Fouad Y.A., Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer // Am. J. Cancer Res. 2017. Vol. 7, № 5. P. 1016–1036.

120. Francescangeli F., De Angelis M.L., Rossi R., Cuccu A., Giuliani A., De Maria R., et al. Dormancy, stemness, and therapy resistance: interconnected players in cancer evolution // Cancer Metastasis Rev. 2023. Vol. 42, № 1. P. 197–215.

121. Friedman-DeLuca M., Karagiannis G.S., Condeelis J.S., Oktay M.H., Entenberg D. Macrophages in tumor cell migration and metastasis // Front. Immunol. 2024. Vol. 15, P. 1494462.

122. Fu C., Zhou L., Mi Q.S., Jiang A. Plasmacytoid Dendritic Cells and Cancer Immunotherapy // Cells. 2022. Vol. 11, № 2. P. 222.

123. Fu N.N., Xie F., Sun Z.W., Wang Q. The OX40/OX40L Axis Regulates T Follicular Helper Cell Differentiation: Implications for Autoimmune Diseases // Front. Immunol. 2021. Vol. 12, P. 670637.

124. Gabrilovich D.I. Myeloid-derived suppressor cells // Cancer Immunol. Res. 2017. Vol. 5, № 1. P. 3–8.

125. Gandhi L., Rodríguez-Abreu D., Gadgeel S., Esteban E., Felip E., De Angelis F., et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer // N. Engl. J. Med. 2018. Vol. 378, № 22. P. 2078–2092.

126. Gao Y., Guo J., Bao X., Xiong F., Ma Y., Tan B., et al. Adoptive Transfer of Autologous Invariant Natural Killer T Cells as Immunotherapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Phase I Clinical

Trial // Oncologist. 2021. Vol. 26, № 11. P. e1919–e1930.

127. Gaudino S.J., Kumar P. Cross-talk between antigen presenting cells and T cells impacts intestinal homeostasis, bacterial infections, and tumorigenesis // Front. Immunol. 2019. Vol. 10, P. 360.

128. Gephart B.D., Coulter D.W., Solheim J.C. Effects of the Alkylating Agent Cyclophosphamide in Potentiating Anti-Tumor Immunity // Int. J. Mol. Sci. 2025. Vol. 26, № 13. P. 6440.

129. Giannotta C., Autino F., Massaia M. The immune suppressive tumor microenvironment in multiple myeloma: The contribution of myeloid-derived suppressor cells // Front. Immunol. 2023. Vol. 13, P. 1102471.

130. Gillen J., Ondee T., Gurusamy D., Issara-amphorn J., Manes N.P., Yoon S.H., et al. LPS Tolerance Inhibits Cellular Respiration and Induces Global Changes in the Macrophage Secretome // Biomolecules. 2021. Vol. 11, P. 164.

131. van Gils N., Denkers F., Smit L. Escape From Treatment; the Different Faces of Leukemic Stem Cells and Therapy Resistance in Acute Myeloid Leukemia // Front. Oncol. 2021. Vol. 11, P. 659253.

132. Giram P., Rahman K.M.M., Aqel O., You Y. *In Situ* Cancer Vaccines: Redefining Immune Activation in the Tumor Microenvironment // ACS Biomater Sci Eng. 2025. Vol. 11, № 5. P. 2550–2583.

133. Glaviano A., Foo A.S.C., Lam H.Y., Yap K.C.H., Jacot W., Jones R.H., et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer // Mol. Cancer. 2023. Vol. 22, № 1. P. 1–37.

134. Gogesch P., Dudek S., van Zandbergen G., Waibler Z., Anzaghe M. The Role of Fc Receptors on the Effectiveness of Therapeutic Monoclonal Antibodies // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, № 16. P. 8947.

135. Gol’dberg E.D., Masnaya N.V., Churin A.A. Immunity Parameters in Mice of Different Strains // Bull Exp Biol Med. 2005. Vol. 140, № 2. P. 219–221.

136. Golan K., Kollet O., Markus R.P., Lapidot T. Daily light and darkness onset and circadian rhythms metabolically synchronize hematopoietic stem cell differentiation and maintenance: The role of bone marrow norepinephrine, tumor necrosis factor, and melatonin cycles // Exp. Hematol. 2019. Vol. 78, P. 1–10.

137. Gong N., Alameh M.G., El-Mayta R., Xue L., Weissman D., Mitchell M.J. Enhancing *in situ* cancer vaccines using delivery technologies // Nat. Rev. Drug Discov. 2024. Vol. 23, № 8. P. 607–625.

138. Goswami K.K., Bose A., Baral R. Macrophages in tumor: An inflammatory perspective // Clin. Immunol. 2021. Vol. 232, P. 108875.

139. Greilberger J., Herwig R. Vitamin D - Deglycosylated Vitamin D Binding Protein Dimer: Positive Synergistic Effects on Recognition, Activation, Phagocytosis and Oxidative Stress on Macrophages. // Clin. Lab. 2020. Vol. 66, № 1. P. 169–177.

140. Gruijs M., Sewnath C.A.N., van Egmond M. Therapeutic exploitation of neutrophils to fight cancer

// Semin. Immunol. 2021. Vol. 57, P. 101581.

141. Gu J., Fu Z., Chen J., Liu Y., Cao X., Sun Y. Endotoxin tolerance induced by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide alters macrophage polarization // Microb. Pathog. 2022. Vol. 164, № 2022. P. 105448.

142. Gubin M.M., Vesely M.D. Cancer Immunoediting in the Era of Immuno-oncology // Clin. Cancer Res. 2022. Vol. 28, № 18. P. 3917–3928.

143. Guglielmo A., Zengarini C., Agostinelli C., Motta G., Sabattini E., Pileri A. The Role of Cytokines in Cutaneous T Cell Lymphoma: A Focus on the State of the Art and Possible Therapeutic Targets // Cells. 2024. Vol. 13, № 7. P. 584.

144. Guo Q., Zhou Y., Xie T., Yuan Y., Li H., Shi W., et al. Tumor microenvironment of cancer stem cells: Perspectives on cancer stem cell targeting // Genes Dis. 2024. Vol. 11, № 3. P. 101043.

145. Habib S., Osborn G., Willsmore Z., Chew M.W., Jakubow S., Fitzpatrick A., et al. Tumor associated macrophages as key contributors and targets in current and future therapies for melanoma // Expert Rev. Clin. Immunol. 2024. Vol. 20, № 8. P. 895–911.

146. Haist M., Stege H., Grabbe S., Bros M. The Functional Crosstalk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells within the Immunosuppressive Tumor Microenvironment // Cancers (Basel). 2021. Vol. 13, № 2. P. 1–34.

147. Hamilton T.A., Zhao C., Jr P.G.P., Datta S. Myeloid colony-stimulating factors as regulators of macrophage polarization // Front Immunol. 2014. Vol. 5, P. 554.

148. Hariyanto A.D., Permata T.B.M., Gondhowiardjo S.A. Role of CD4+CD25+FOXP3+ TReg cells on tumor immunity // Immunol. Med. 2022. Vol. 45, № 2. P. 94–107.

149. He S., Zheng L., Qi C. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the tumor microenvironment and their targeting in cancer therapy // Mol. Cancer. 2025. Vol. 24, № 1. P. 5.

150. He Z., Zhang S. Tumor-Associated Macrophages and Their Functional Transformation in the Hypoxic Tumor Microenvironment // Front. Immunol. 2021. Vol. 12, P. 741305.

151. Heemskerk N., van Egmond M. Monoclonal antibody-mediated killing of tumour cells by neutrophils // Eur. J. Clin. Invest. 2018. Vol. 48, P. e12962.

152. Hegde S., Leader A.M., Merad M. MDSC: Markers, development, states, and unaddressed complexity // Immunity. 2021. Vol. 54, № 5. P. 875–884.

153. Hegemann A., Matson K.D., Both C., Tieleman B.I. Immune function in a free-living bird varies over the annual cycle , but seasonal patterns differ between years // Oecologia. 2012. Vol. 170, P. 605–618.

154. Heim C.E., West S.C., Ali H., Kielian T. Heterogeneity of Ly6G+ Ly6C+ myeloid-derived suppressor cell infiltrates during Staphylococcus aureus biofilm infection // Infect. Immun. 2018. Vol. 86, № 12. P. e00684-18.

155. Hermann P.C., Huber S.L., Herrler T., Aicher A., Ellwart J.W., Guba M., et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer // Cell Stem Cell. 2007. Vol. 1, № 3. P. 313–323.

156. Hilligan K.L., Ronchese F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses // Cell. Mol. Immunol. 2020. Vol. 17, № 6. P. 587–599.

157. Hinshaw D.C., Shevde L.A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression // Cancer Res. 2019. Vol. 79, № 18. P. 4557–4567.

158. Ho W.J., Jaffee E.M., Zheng L. The tumour microenvironment in pancreatic cancer — clinical challenges and opportunities // Nat. Rev. Clin. Oncol. 2020. Vol. 17, № 9. P. 527–540.

159. Holmström M.O., Cordua S., Skov V., Kjær L., Pallisgaard N., Ellervik C., et al. Evidence of immune elimination, immuno-editing and immune escape in patients with hematological cancer // Cancer Immunol. Immunother. 2020. Vol. 69, № 2. P. 315–324.

160. Homma S., Yamamoto N. Activation process of macrophages after *in vitro* treatment of mouse lymphocytes with dodecylglycerol. // Clin. Exp. Immunol. 1990. Vol. 79, № 2. P. 307–313.

161. Hong S., Zhang Zhimin, Liu H., Tian M., Zhu X., Zhang Zhuqiang, et al. B Cells Are the Dominant Antigen-Presenting Cells that Activate Naive CD4+ T Cells upon Immunization with a Virus-Derived Nanoparticle Antigen // Immunity. 2018. Vol. 49, P. 1–14.

162. Horn L., Mansfield A.S., Szczęsna A., Havel L., Krzakowski M., Hochmair M.J., et al. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer // N. Engl. J. Med. 2018. Vol. 379, № 23. P. 2220–2229.

163. Hu S., Xiang D., Zhang X., Zhang L., Wang S., Jin K., et al. The mechanisms and cross-protection of trained innate immunity // Virol. J. 2022. Vol. 19, № 1. P. 210.

164. Hu Y., Wang X., Wei Y., Liu H., Zhang J., Shen Y., et al. Functional Inhibition of Natural Killer Cells in a BALB/c Mouse Model of Liver Fibrosis Induced by Schistosoma japonicum Infection // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2020. Vol. 10, P. 598987.

165. Huang C., Zhang C., Cao Y., Li J., Bi F. Major roles of the circadian clock in cancer // Cancer Biol. Med. 2023. Vol. 20, № 1. P. 1.

166. Huang Jing, Yang B., Peng Y., Huang Jinsheng, Wong S.H.D., Bian L., et al. Nanomedicine-Boosting Tumor Immunogenicity for Enhanced Immunotherapy // Adv. Funct. Mater. 2021. Vol. 31, № 21. P. 2011171.

167. Huang L., Ge X., Liu Y., Li H., Zhang Z. The Role of Toll-like Receptor Agonists and Their Nanomedicines for Tumor Immunotherapy // Pharmaceutics. 2022. Vol. 14, № 6. P. 1228.

168. Huang M., Liu Y., Yan Q., Peng M., Ge J., Mo Y., et al. NK cells as powerful therapeutic tool in cancer immunotherapy // Cell. Oncol. 2024. Vol. 47, № 3. P. 733–757.

169. Huber N., Vetter S., Stalder G., Gerritsmann H., Giroud S. Dynamic Function and Composition

Shift in Circulating Innate Immune Cells in Hibernating Garden Dormice // Front. Physiol. 2021. Vol. 12, P. 620614.

170. Huppert L.A., Daud A.I. Intratumoral therapies and in-situ vaccination for melanoma // Hum. Vaccin. Immunother. 2022. Vol. 18, № 3. P. 1890512.

171. Di Ianni N., Musio S., Pellegatta S. Altered Metabolism in Glioblastoma: Myeloid-Derived Suppressor Cell (MDSC) Fitness and Tumor-Infiltrating Lymphocyte (TIL) Dysfunction // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, № 9. P. 4460.

172. Ilango S., Paital B., Jayachandran P., Padma P.R., Nirmaladevi R. Epigenetic alterations in cancer // Front. Biosci. - Landmark. 2020. Vol. 25, № 6. P. 1058–1109.

173. Imširović V., Wensveen F.M., Polić B., Jelenčić V. Maintaining the Balance: Regulation of NK Cell Activity // Cells. 2024. Vol. 13, № 17. P. 1464.

174. Iriki H., Takahashi H., Amagai M. Diverse Role of OX40 on T Cells as a Therapeutic Target for Skin Diseases // J. Invest. Dermatol. 2023. Vol. 143, № 4. P. 545–553.

175. Ishikawa M., Inoue T., Inui T., Kuchiike D., Kubo K., Uto Y., et al. A novel assay system for macrophage-activating factor activity using a human U937 cell line // Anticancer Res. 2014. Vol. 34, № 8. P. 4577–4581.

176. Ishina I.A., Zakharova M.Y., Kurbatskaia I.N., Mamedov A.E., Belogurov A.A., Gabibov A.G. MHC Class II Presentation in Autoimmunity // Cells. 2023. Vol. 12, № 2. P. 314.

177. Itahashi K., Irie T., Nishikawa H. Regulatory T-cell development in the tumor microenvironment // Eur. J. Immunol. 2022. Vol. 52, № 8. P. 1216–1227.

178. Jan N., Sofi S., Qayoom H., Shabir A., Haq B.U., Macha M.A., et al. Metronomic chemotherapy and drug repurposing: A paradigm shift in oncology // Heliyon. 2024. Vol. 10, № 3. P. e24670.

179. Jassim A., Rahrmann E.P., Simons B.D., Gilbertson R.J. Cancers make their own luck: theories of cancer origins // Nat. Rev. Cancer. 2023. Vol. 23, № 10. P. 710–724.

180. Jhunjhunwala S., Hammer C., Delamarre L. Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion // Nat. Rev. Cancer. 2021. Vol. 21, № 5. P. 298–312.

181. Jiang W., Liang M., Lei Q., Li G., Wu S. The Current Status of Photodynamic Therapy in Cancer Treatment // Cancers (Basel). 2023. Vol. 15, № 3. P. 585.

182. Johar D., Elmehrath A.O., Khalil R.M., Elberry M.H., Zaky S., Shalabi S.A., et al. Protein networks linking Warburg and reverse Warburg effects to cancer cell metabolism // BioFactors. 2021. Vol. 47, № 5. P. 713–728.

183. Jordan M., Waxman D.J. CpG-1826 immunotherapy potentiates chemotherapeutic and anti-tumor immune responses to metronomic cyclophosphamide in a preclinical glioma model // Cancer Lett. 2016. Vol. 373, № 1. P. 88–96.

184. Jorgovanovic D., Song M., Wang L., Zhang Y. Roles of IFN-γ in tumor progression and regression:

a review // Biomark. Res. 2020. Vol. 8, № 1. P. 1–16.

185. Kaltenmeier C., Yazdani H.O., Handu S., Popp B., Geller D., Tohme S. The Role of Neutrophils as a Driver in Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Cancer Growth // Front. Immunol. 2022. Vol. 13, P. 887565.

186. Kang J., Lee D., Lee K.J., Yoon J.E., Kwon J.H., Seo Y., et al. Tumor-Suppressive Effect of Metformin via the Regulation of M2 Macrophages and Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer // Cancers (Basel). 2022. Vol. 14, № 12. P. 2881.

187. Khan M., Zhao Z., Arooj S., Liao G. Bevacizumab for radiation necrosis following radiotherapy of brain metastatic disease: a systematic review & meta-analysis // BMC Cancer. 2021. Vol. 21, № 1. P. 1–19.

188. Khorasani A.B.S., Hafezi N., Sanaei M.J., Jafari-Raddani F., Pourbagheri-Sigaroodi A., Bashash D. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: Review of clinical trials and latest advances // Cell Biochem. Funct. 2024. Vol. 42, № 3. .

189. Kiessling S., Beaulieu-Laroche L., Blum I.D., Landgraf D., Welsh D.K., Storch K.-F., et al. Enhancing circadian clock function in cancer cells inhibits tumor growth // BMC Biol. 2017. Vol. 15, № 1. P. 13.

190. Kim H. Do, Yeh C.Y., Chang Y.C., Kim C.H. Dawn era for revisited cancer therapy by innate immune system and immune checkpoint inhibitors // Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 2024. Vol. 1870, № 3. P. 167019.

191. Kirikovich S.S., Levites E. V., Dolgova E. V., Proskurina A.S., Ritter G.S., Ruzanova V.S., et al. Effect of macrophage-activating factor (GcMAF-RF) upon exvivopolarization of macrophages, activation of dendritic cells and production of cytokines by human whole blood cells // Med. Immunol. 2021. Vol. 23, № 2. P. 257–274.

192. Kirikovich S.S., Levites E. V, Proskurina A.S., Ritter G.S., Dolgova E. V, Ruzanova V.S., et al. Production of GcMAF with Anti-Inflammatory Properties and Its Effect on Models of Induced Arthritis in Mice and Cystitis in Rats // Curr Issues Mol Biol. 2024. Vol. 46, № 10. P. 10934–10959.

193. Kirikovich S.S., Levites E. V, Proskurina A.S., Ritter G.S., Peltek S.E., Vasilieva A.R., et al. The Molecular Aspects of Functional Activity of Macrophage-Activating Factor GcMAF // Int J Mol Sci. 2023. Vol. 24, № 24. P. 17396.

194. Kisaretova P.E., Kirikovich S.S., Ritter G.S., Efremov Y.R., Taranov O.S., Dubatolova T.D., et al. Approbation of the cancer treatment approach based on the eradication of TAMRA+ cancer stem cells in a model of murine cyclophosphamide resistant lymphosarcoma. // Anticancer Res. 2020. Vol. 40, № 2. P. 795–805.

195. Koka K., Verma A., Dwarakanath B.S., Papineni R.V.L. Technological Advancements in External Beam Radiation Therapy (EBRT): An Indispensable Tool for Cancer Treatment // Cancer Manag. Res.

2022. Vol. 14, P. 1421–1429.

196. Konstorum A., Vella A.T., Adler A.J., Laubenbacher R.C. A mathematical model of combined CD8 T cell costimulation by 4-1BB (CD137) and OX40 (CD134) receptors // Sci. Rep. 2019. Vol. 9, № 1. P. 10862.

197. Kovaleva O. V., Podlesnaya P.A., Gratchev A.N. Macrophage cytotoxic activity and its role in the tumor pathogenesis // Alm. Clin. Med. 2022. Vol. 50, № 1. P. 13–20.

198. Kraehenbuehl L., Weng C.H., Eghbali S., Wolchok J.D., Merghoub T. Enhancing immunotherapy in cancer by targeting emerging immunomodulatory pathways // Nat. Rev. Clin. Oncol. 2021. Vol. 19, № 1. P. 37–50.

199. Kroemer G., Chan T.A., Eggermont A.M.M., Galluzzi L. Immunosurveillance in clinical cancer management // CA. Cancer J. Clin. 2024. Vol. 74, № 2. P. 187–202.

200. Kuol N., Stojanovska L., Nurgali K., Apostolopoulos V. The mechanisms tumor cells utilize to evade the host's immune system // Maturitas. 2017. Vol. 105, P. 8–15.

201. Kuzmenko N. V., Tsyrlin V.A., Pliss M.G. Seasonal Dynamics of Melatonin, Prolactin, Sex Hormones and Adrenal Hormones in Healthy People: a Meta-Analysis // J. Evol. Biochem. Physiol. 2021. Vol. 57, № 3. P. 451–472.

202. Labani-Motlagh A., Ashja-Mahdavi M., Loskog A. The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses // Front. Immunol. 2020. Vol. 11, P. 525594.

203. Labrie M., Brugge J.S., Mills G.B., Zervantonakis I.K. Therapy resistance: opportunities created by adaptive responses to targeted therapies in cancer // Nat. Rev. Cancer. 2022. Vol. 22, № 6. P. 323–339.

204. Laha D., Grant R., Mishra P., Nilubol N. The Role of Tumor Necrosis Factor in Manipulating the Immunological Response of Tumor Microenvironment // Front. Immunol. 2021. Vol. 12, P. 656908.

205. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice // Nature. 1994. Vol. 367, № 6464. P. 645–648.

206. Law A.M.K., Valdes-Mora F., Gallego-Ortega D. Myeloid-derived suppressor cells as a therapeutic target for cancer // Cells. 2020. Vol. 9, № 3. P. 561.

207. Lé A.M., Torres T. OX40-OX40L Inhibition for the Treatment of Atopic Dermatitis—Focus on Rocatinlimab and Amlitelimab // Pharmaceutics. 2022. Vol. 14, № 12. P. 2753.

208. Lei X., He Q., Li Z., Zou Q., Xu P., Yu H., et al. Cancer stem cells in colorectal cancer and the association with chemotherapy resistance // Med. Oncol. 2021. Vol. 38, № 4. P. 1–13.

209. Lei X., Lei Y., Li J.K., Du W.X., Li R.G., Yang J., et al. Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy // Cancer Lett. 2020. Vol. 470, P. 126–133.

210. Leiphrakpam P.D., Are C. PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway as a Target for Colorectal Cancer Treatment // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25, № 6. P. 3178.

211. Leon K.E., Tangudu N.K., Aird K.M., Buj R. Loss of p16: A Bouncer of the Immunological Surveillance? // Life. 2021. Vol. 11, № 4. P. 309.

212. Leong W.I., Ames R.Y., Haverkamp J.M., Torres L., Kline J., Bans A., et al. Low-dose metronomic cyclophosphamide complements the actions of an intratumoral C-class CpG TLR9 agonist to potentiate innate immunity and drive potent T cell-mediated anti-tumor responses // Oncotarget. 2019. Vol. 10, № 68. P. 7220.

213. Levites E. V., Kirikovich S.S., Dolgova E. V., Proskurina A.S., Ritter G.S., Ostanin A.A., et al. *In vitro* assay of biological activity of a national preparation of macrophage activating factor (GcMAF-RF) // Vavilov J. Genet. Breed. 2020. Vol. 24, № 3. P. 284–291.

214. Li H., Yu J., Wu Y., Shao B., Wei X. *In situ* antitumor vaccination: Targeting the tumor microenvironment // J. Cell. Physiol. 2020. Vol. 235, № 7–8. P. 5490–5500.

215. Li L., Han B., Kong Y., Zhang G., Zhang Z. Vitamin D binding protein in psychiatric and neurological disorders: Implications for diagnosis and treatment // Genes Dis. 2024. Vol. 11, № 5. P. 101309.

216. Li S.Y., Guo Y.L., Tian J.W., Zhang H.J., Li R.F., Gong P., et al. Anti-Tumor Strategies by Harnessing the Phagocytosis of Macrophages // Cancers (Basel). 2023. Vol. 15, № 10. P. 2717.

217. Li W., Li T., Liu L., Han Q., Zhang H., Sun Y., et al. Seasonal photoperiodic influence of pineal melatonin on hypothalamic-pituitary-adrenal axis-hippocampal-receptor in male rats // J. Tradit. Chinese Med. Sci. 2022. Vol. 9, № 2. P. 143–152.

218. Liang J.L., Luo G.F., Chen W.H., Zhang X.Z. Recent Advances in Engineered Materials for Immunotherapy-Involved Combination Cancer Therapy // Adv. Mater. 2021. Vol. 33, № 31. P. e2007630.

219. Liedtke K., Alter C., Günther A., Hövelmeyer N., Klopfleisch R., Naumann R., et al. Endogenous CD83 Expression in CD4+ Conventional T Cells Controls Inflammatory Immune Responses // J. Immunol. 2020. Vol. 204, № 12. P. 3217–3226.

220. Liesveld J.L., Baran A., Azadniv M., Misch H., Nedrow K., Becker M., et al. A phase II study of sequential decitabine and rapamycin in acute myelogenous leukemia // Leuk. Res. 2022. Vol. 112, P. 106749.

221. Liew P.X., Kubes P. The Neutrophil's role during health and disease // Physiol. Rev. 2019. Vol. 99, № 2. P. 1223–1248.

222. Lin L., Li Z., Yan L., Liu Y., Yang H., Li H. Global, regional, and national cancer incidence and death for 29 cancer groups in 2019 and trends analysis of the global cancer burden, 1990–2019 // J. Hematol. Oncol. 2021. Vol. 14, № 1. P. 1–24.

223. Lin Y.J., Wei K.C., Chen P.Y., Lim M., Hwang T.L. Roles of Neutrophils in Glioma and Brain Metastases // Front. Immunol. 2021. Vol. 12, P. 701383.

224. Liu D., Cao S., Zhou Y., Xiong Y. Recent advances in endotoxin tolerance // J Cell Biochem. 2019. Vol. 120, P. 56–70.

225. Liu H., Wang Z., Zhou Y., Yang Y. MDSCs in breast cancer: an important enabler of tumor progression and an emerging therapeutic target // Front. Immunol. 2023. Vol. 14, P. 1199273.

226. Liu J., Geng X., Hou J., Wu G. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression // Cancer Cell Int. 2021. Vol. 21, № 1. P. 1–7.

227. Loh J.J., Ma S. Hallmarks of cancer stemness // Cell Stem Cell. 2024. Vol. 31, № 5. P. 617–639.

228. Lu X. OX40 and OX40L Interaction in Cancer // Curr. Med. Chem. 2020. Vol. 28, № 28. P. 5659–5673.

229. Lucarini V., Melaiu O., Tempora P., D'amico S., Locatelli F., Fruci D. Dendritic Cells: Behind the Scenes of T-Cell Infiltration into the Tumor Microenvironment // Cancers (Basel). 2021. Vol. 13, № 3. P. 433.

230. Lurje I., Werner W., Mohr R., Roderburg C., Tacke F., Hammerich L. *In Situ* Vaccination as a Strategy to Modulate the Immune Microenvironment of Hepatocellular Carcinoma // Front. Immunol. 2021. Vol. 12, P. 650486.

231. Ma C., Zhang Q., Greten T.F. MDSCs in liver cancer: A critical tumor-promoting player and a potential therapeutic target // Cell. Immunol. 2021. Vol. 361, P. 104295.

232. Macian F. NFAT PROTEINS : KEY REGULATORS OF T-CELL DEVELOPMENT AND FUNCTION // Nat. Rev. Immunol. 2005. Vol. 5, P. 472–484.

233. Mahmood T., Yang P.C. OX40L - OX40 Interactions : A Possible Target for Gastrointestinal Autoimmune Diseases // N Am J Med Sci. 2012. Vol. 4, № 11. P. 533–536.

234. Mahmoudian F., Ahmari A., Shabani S., Sadeghi B., Fahimirad S., Fattahi F. Aptamers as an approach to targeted cancer therapy // Cancer Cell Int. 2024. Vol. 24, № 1. P. 1–22.

235. Mai Y., Su J., Yang C., Xia C., Fu L. The strategies to cure cancer patients by eradicating cancer stem-like cells // Mol. Cancer. 2023. Vol. 22, № 1. P. 1–24.

236. Maimela N.R., Liu S., Zhang Y. Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment // Comput. Struct. Biotechnol. J. 2019. Vol. 17, P. 1–13.

237. Malfitano A.M., Pisanti S., Napolitano F., Di Somma S., Martinelli R., Portella G. Tumor-Associated Macrophage Status in Cancer Treatment // Cancers (Basel). 2020. Vol. 12, № 7. P. 1987.

238. Mallard B.W., Tiralongo J. Cancer stem cell marker glycosylation: nature, function and significance // Glycoconj. J. 2017. Vol. 34, № 4. P. 441–452.

239. Manrique S.Z., Dominguez A.L., Mirza N., Spencer C.D., Bradley J.M., Finke J.H., et al. Definitive activation of endogenous antitumor immunity by repetitive cycles of cyclophosphamide with

interspersed Toll-like receptor agonists // Oncotarget. 2016. Vol. 7, № 28. P. 42919–42942.

240. Mao C., Gorbet M.J., Singh A., Ranjan A., Fiering S. *In situ* vaccination with nanoparticles for cancer immunotherapy: understanding the immunology // Int. J. Hyperth. 2020. Vol. 37, № 3. P. 4–17.

241. Marabelle A., Tselikas L., de Baere T., Houot R. Intratumoral immunotherapy: using the tumor as the remedy // Ann. Oncol. 2017. Vol. 28, № suppl_12. P. xii33–xii43.

242. Marfil-Cantón M., Prados-Carmona A., Cebolla-Verdugo M., Husein-ElAhmed H., Campos F., Ruiz-Villaverde R. Anti-OX40 Biological Therapies in the Treatment of Atopic Dermatitis: A Comprehensive Review // J. Clin. Med. 2024. Vol. 13, № 22. P. 6925.

243. Margotta V. Interaction between autumnal temperature-photoperiod and experimentally induced transient cold shock influences proliferative activity in the brain of an adult terrestrial heterothermic vertebrate, Rana bergeri (Günther, 1986) // Ital. J. Anat. Embryol. 2015. Vol. 120, № 3. P. 192–200.

244. Mascarelli D.E., Rosa R.S.M., Toscaro J.M., Semionatto I.F., Ruas L.P., Fogagnolo C.T., et al. Boosting Antitumor Response by Costimulatory Strategies Driven to 4-1BB and OX40 T-cell Receptors // Front. Cell Dev. Biol. 2021. Vol. 9, P. 692982.

245. Mayo J.G. Biologic characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor // Cancer Chemother. Rep. 2. 1972. Vol. 3, № 1. P. 325–330.

246. Mazzoccoli G., Miele L., Marrone G., Mazza T., Vinciguerra M., Grieco A. A Role for the Biological Clock in Liver Cancer // Cancers (Basel). 2019. Vol. 11, № 11. P. 1778.

247. Mehmeti-Ajradini M., Bergenfelz C., Larsson A.M., Carlsson R., Riesbeck K., Ahl J., et al. Human G-MDSCs are neutrophils at distinct maturation stages promoting tumor growth in breast cancer // Life Sci. Alliance. 2020. Vol. 3, № 11. P. e202000893.

248. Melief C.J.M., Welters M.J.P., Vergote I., Kroep J.R., Kenter G.G., Ottevanger P.B., et al. Strong vaccine responses during chemotherapy are associated with prolonged cancer survival // Sci. Transl. Med. 2020. Vol. 12, № 535. P. eaaz8235.

249. Merlano M.C., Denaro N., Galizia D., Ruatta F., Occelli M., Minei S., et al. How Chemotherapy Affects the Tumor Immune Microenvironment: A Narrative Review // Biomedicines. 2022. Vol. 10, № 8. P. 1822.

250. Meylan F., Siegel R.M. TNF superfamily cytokines in the promotion of Th9 differentiation and immunopathology // Semin. Immunopathol. 2017. Vol. 39, P. 21–28.

251. Mirlekar B., Pylayeva-Gupta Y. IL-12 Family Cytokines in Cancer and Immunotherapy // Cancers (Basel). 2021. Vol. 13, № 2. P. 167.

252. Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Vlassov V. V, et al. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2019. Vol. 116, № 4. P. 1229–1234.

253. Mitra S., Lami M.S., Ghosh A., Das R., Tallei T.E., Fatimawali, et al. Hormonal Therapy for Gynecological Cancers: How Far Has Science Progressed toward Clinical Applications? // Cancers (Basel). 2022. Vol. 14, № 3. P. 759.

254. Mohan A., Raj Rajan R., Mohan G., Kollenchery Puthenveettil P., Maliekal T.T. Markers and Reporters to Reveal the Hierarchy in Heterogeneous Cancer Stem Cells // Front. Cell Dev. Biol. 2021. Vol. 9, P. 668851.

255. Möller M., Orth V., Umansky V., Hetjens S., Braun V., Reißfelder C., et al. Myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood as predictive biomarkers in patients with solid tumors undergoing immune checkpoint therapy: systematic review and meta-analysis // Front. Immunol. 2024. Vol. 15, P. 1403771.

256. Møller P. The comet assay: ready for 30 more years. // Mutagenesis. 2018. Vol. 33, № 1. P. 1–7.

257. Monti M., Consoli F., Vescovi R., Bugatti M., Vermi W. Human Plasmacytoid Dendritic Cells and Cutaneous Melanoma // Cells. 2020. Vol. 9, № 2. P. 417.

258. Monti M., Ferrari G., Gazzurelli L., Bugatti M., Facchetti F., Vermi W. Plasmacytoid dendritic cells at the forefront of anti-cancer immunity: rewiring strategies for tumor microenvironment remodeling // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2024. Vol. 43, № 1. P. 196.

259. Moskalenko M., Pan M., Fu Y., de Moll E.H., Hashimoto D., Mortha A., et al. Requirement for Innate Immunity and CD90+ NK1.1- Lymphocytes to Treat Established Melanoma with Chemo-Immunotherapy // Cancer Immunol. Res. 2015. Vol. 3, № 3. P. 296–304.

260. Motoyoshi Y., Kaminoda K., Saitoh O., Hamasaki K., Nakao K., Ishii N., et al. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide // Oncol. Rep. 2006. Vol. 16, P. 141–146.

261. Moynihan J., Cohen N. The kinetics of recovery of leukocyte number and lymphocyte function following an injection of a single high dose of cyclophosphamide in C3H/HeJ mice // Int. J. Immunopharmacol. 1989. Vol. 11, № 5. P. 517–527.

262. Muhammad S., Fan T., Hai Y., Gao Y., He J. Reigniting hope in cancer treatment: the promise and pitfalls of IL-2 and IL-2R targeting strategies // Mol. Cancer. 2023. Vol. 22, № 1. P. 1–23.

263. Mull B., Davis R., Munir I., Perez M.C., Simental A.A., Khan S. Differential expression of Vitamin D binding protein in thyroid cancer health disparities // Oncotarget. 2021. Vol. 12, № 7. P. 596.

264. Muñoz A., Grant W.B. Vitamin D and Cancer: An Historical Overview of the Epidemiology and Mechanisms // Nutrients. 2022. Vol. 14, № 7. P. 1448.

265. Muñoz R., Girotti A., Hileeto D., Arias F.J. Metronomic Anti-Cancer Therapy: A Multimodal Therapy Governed by the Tumor Microenvironment // Cancers (Basel). 2021. Vol. 13, № 21. P. 5414.

266. Munteanu C., Turti S., Achim L., Muresan R., Souca M., Prifti E., et al. The Relationship between Circadian Rhythm and Cancer Disease // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25, № 11. P. 5846.

267. Muraro E., Vinante L., Fratta E., Bearz A., Höfler D., Steffan A., et al. Metronomic Chemotherapy: Anti-Tumor Pathways and Combination with Immune Checkpoint Inhibitors // Cancers (Basel). 2023. Vol. 15, № 9. P. 2471.

268. Myers J.W., Peoples G.E., Clifton G.T. Overcoming cancer tolerance with immune checkpoint blockade // Cancer Immunol. 2020. P. 85–128.

269. Nabeshima Yoko, Abe C., Kawauchi T., Hiroi T., Uto Y., Nabeshima Yo-ichi. Simple method for large-scale production of macrophage activating factor GcMAF // Sci. Rep. 2020. Vol. 10, № 1. P. 19122.

270. Naicker S.D., Feerick C.L., Lynch K., Swan D., McEllistrim C., Henderson R., et al. Cyclophosphamide alters the tumor cell secretome to potentiate the anti-myeloma activity of daratumumab through augmentation of macrophage-mediated antibody dependent cellular phagocytosis // Oncoimmunology. 2021. Vol. 10, № 1. P. 1859263.

271. Nallar S.C., Xu D.Q., Kalvakolanu D. V. Bacteria and genetically modified bacteria as cancer therapeutics: Current advances and challenges // Cytokine. 2017. Vol. 89, P. 160–172.

272. Nawara H.M., Afify S.M., Hassan G., Zahra M.H., Seno A., Seno M. Paclitaxel-Based Chemotherapy Targeting Cancer Stem Cells from Mono- to Combination Therapy // Biomedicines. 2021. Vol. 9, № 5. P. 500.

273. Nelson A., Lukacs J.D., Johnston B. The Current Landscape of NKT Cell Immunotherapy and the Hills Ahead // Cancers (Basel). 2021. Vol. 13, № 20. P. 5174.

274. Neophytou C.M., Pierides C., Christodoulou M.I., Costeas P., Kyriakou T.C., Papageorgis P. The Role of Tumor-Associated Myeloid Cells in Modulating Cancer Therapy // Front. Oncol. 2020. Vol. 10, P. 899.

275. Niederlova V., Tsyklauri O., Kovar M., Stepanek O. IL-2-driven CD8+ T cell phenotypes: implications for immunotherapy // Trends Immunol. 2023. Vol. 44, № 11. P. 890–901.

276. Nishikawa H., Miyazono K. Establishment of immune suppression by cancer cells in the tumor microenvironment // Proc. Japan Acad. Ser. B. 2024. Vol. 100, № 2. P. 114–122.

277. Nishimuta H., Senoo A., Kasahara K., Kubo T., Yanaka S., Nagatoishi S., et al. Molecular mechanistic insights into the OX40 – OX40L complex from biophysical and computational analyses // Protein Sci. 2026. Vol. 35, № 1. P. e70404.

278. Nozari A., Berezovski M. V. Aptamers for CD Antigens: From Cell Profiling to Activity Modulation // Mol. Ther. - Nucleic Acids. 2017. Vol. 6, P. 29–44.

279. O'Brien C.A., Pollett A., Gallinger S., Dick J.E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice // Nature. 2007. Vol. 445, № 7123. P. 106–110.

280. Oh E.Y., Wood P.A., Du-Quiton J., Hrushesky W.J.M. Seasonal modulation of post-resection breast cancer metastasis // Breast Cancer Res. Treat. 2008. Vol. 111, № 2. P. 219–228.

281. Oh H., Ghosh S. NF-kB : roles and regulation in different CD4+ T-cell subsets // Immunol. Rev. 2013. Vol. 252, P. 41–51.

282. Oh S.M., Oh K., Lee D.-S. Intratumoral Administration of Secondary Lymphoid Chemokine and Unmethylated Cytosine-phosphorothioate-guanine Oligodeoxynucleotide Synergistically Inhibits Tumor Growth *in Vivo* // Oncol. Hematol. 2011. Vol. 26, P. 1270–1276.

283. Olive P.L., Banáth J.P., Durand R.E., Banath J.P. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “Comet” assay // Radiat. Res. 1990. Vol. 122, № 1. P. 86.

284. Onishi K.G., Maneval A.C., Cable E.C., Tuohy M.C., Scasny A.J., Sterina E., et al. Circadian and circannual timescales interact to generate seasonal changes in immune function // Brain. Behav. Immun. 2020. Vol. 83, P. 33–43.

285. Orecchioni M., Ghosheh Y., Pramod A.B., Ley K. Macrophage Polarization : Different Gene Signatures in M1 (LPS +) vs . Classically and M2 (LPS –) vs . Alternatively Activated Macrophages // Front Immunol. 2019. Vol. 10, P. 1084.

286. Ortiz-Tudela E., Innominato P.F., Rol M.A., Lévi F., Madrid J.A. Relevance of internal time and circadian robustness for cancer patients // BMC Cancer. 2016. Vol. 16, P. 285.

287. Oshimori N., Guo Y., Taniguchi S. An emerging role for cellular crosstalk in the cancer stem cell niche // J. Pathol. 2021. Vol. 254, № 4. P. 384–394.

288. Ostanin A.A., Kirikovich S.S., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Chernykh E.R., Bogachev S.. A thorny pathway of macrophage activating factor (GcMAF): from bench to bedside // Vavilov J. Genet. Breed. 2019. Vol. 23, № 5. P. 624–631.

289. Ostanin A.A., Leplina O.Y., Burakova E.A., Tyrinova T. V., Fokina A.A., Proskurina A.S., et al. Phosphate-modified CpG oligonucleotides induce *in vitro* maturation of human myeloid dendritic cells // Vavilov J. Genet. Breed. 2020. Vol. 24, № 6. P. 653–660.

290. Pahlavanneshan S., Sayadmanesh A., Ebrahimiyan H., Basiri M. Toll-Like Receptor-Based Strategies for Cancer Immunotherapy // J. Immunol. Res. 2021. Vol. 2021, P. 9912188.

291. Paijens S.T., Vledder A., de Bruyn M., Nijman H.W. Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era // Cell. Mol. Immunol. 2020. Vol. 18, № 4. P. 842–859.

292. Patel S.A., Kondratov R. V. Clock at the Core of Cancer Development // Biology (Basel). 2021. Vol. 10, № 2. P. 150.

293. Paul S., Konig M.F., Pardoll D.M., Bettegowda C., Papadopoulos N., Wright K.M., et al. Cancer therapy with antibodies // Nat. Rev. Cancer. 2024. Vol. 24, № 6. P. 399–426.

294. Petty A.J., Yang Y. Tumor-associated macrophages: Implications in cancer immunotherapy // Immunotherapy. 2017. Vol. 9, № 3. P. 289–302.

295. Pieper A.A., Zangl L.M., Speigelman D. V., Feils A.S., Hoefges A., Jagodinsky J.C., et al.

Radiation Augments the Local Anti-Tumor Effect of *In Situ* Vaccine With CpG-Oligodeoxynucleotides and Anti-OX40 in Immunologically Cold Tumor Models // Front. Immunol. 2021. Vol. 12, P. 763888.

296. Pierre K., Rao R.T., Hartmanshenn C., Androulakis I.P. Modeling the influence of seasonal differences in the HPA axis on synchronization of the circadian clock and cell cycle // Endocrinology. 2018. Vol. 159, № 4. P. 1808–1826.

297. Pishesha N., Harmand T.J., Ploegh H.L. A guide to antigen processing and presentation // Nat. Rev. Immunol. 2022. Vol. 22, № 12. P. 751–764.

298. Plesca I., Müller L., Böttcher J.P., Medyouf H., Wehner R., Schmitz M. Tumor-associated human dendritic cell subsets: Phenotype, functional orientation, and clinical relevance // Eur. J. Immunol. 2022. Vol. 52, № 11. P. 1750–1758.

299. Polidoro M.A., Mikulak J., Cazzetta V., Lleo A., Mavilio D., Torzilli G., et al. Tumor microenvironment in primary liver tumors: A challenging role of natural killer cells // World J. Gastroenterol. 2020. Vol. 26, № 33. P. 4900.

300. Poncette L., Bluhm J., Blankenstein T. The role of CD4 T cells in rejection of solid tumors // Curr. Opin. Immunol. 2022. Vol. 74, P. 18–24.

301. Poto R., Cristinziano L., Modestino L., de Paulis A., Marone G., Loffredo S., et al. Neutrophil Extracellular Traps, Angiogenesis and Cancer // Biomedicines. 2022. Vol. 10, № 2. P. 431.

302. Potter E.A., Dolgova E. V., Proskurina A.S., Efremov Y.R., Taranov O.S., Nikolin V.P., et al. Development of the therapeutic regimen based on the synergistic activity of cyclophosphamide and double-stranded DNA preparation which results in complete cure of mice engrafted with Krebs-2 ascites // Vavilov J. Genet. Breed. 2016a. Vol. 20, № 5. P. 723–735.

303. Potter E.A., Dolgova E. V, Proskurina A.S., Minkevich A.M., Efremov Y.R., Taranov O.S., et al. A strategy to eradicate well-developed Krebs-2 ascites in mice // Oncotarget. 2016b. Vol. 7, № 10. P. 11580–11594.

304. Potter E.A., Proskurina A.S., Ritter G.S., Dolgova E. V., Nikolin V.P., Popova N.A., et al. Efficacy of a new cancer treatment strategy based on eradication of tumor-initiating stem cells in a mouse model of Krebs-2 solid adenocarcinoma // Oncotarget. 2018. Vol. 9, № 47. P. 28486–28499.

305. Pourakbari R., Hajizadeh F., Parhizkar F., Aghebati-Maleki A., Mansouri S., Aghebati-Maleki L. Co-stimulatory agonists: An insight into the immunotherapy of cancer // EXCLI J. 2021. Vol. 20, P. 1055–1085.

306. Powles T., Park S.H., Voog E., Caserta C., Valderrama B.P., Gurney H., et al. Avelumab Maintenance Therapy for Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma // N. Engl. J. Med. 2020. Vol. 383, № 13. P. 1218–1230.

307. Del Prete A., Salvi V., Soriani A., Laffranchi M., Sozio F., Bosisio D., et al. Dendritic cell subsets in cancer immunity and tumor antigen sensing // Cell. Mol. Immunol. 2023. Vol. 20, № 5. P. 432–447.

308. Prince M.E., Sivanandan R., Kaczorowski A., Wolf G.T., Kaplan M.J., Dalerba P., et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. Vol. 104, № 3. P. 973–978.

309. Principe D.R., Chiec L., Mohindra N.A., Munshi H.G. Regulatory T-Cells as an Emerging Barrier to Immune Checkpoint Inhibition in Lung Cancer // Front. Oncol. 2021. Vol. 11, P. 684098.

310. Prokopeva A.E., Emene C.C., Gomzikova M.O. Antitumor Immunity: Role of NK Cells and Extracellular Vesicles in Cancer Immunotherapy // Curr. Issues Mol. Biol. 2024. Vol. 46, № 1. P. 140–152.

311. Proskurina A.S., Kupina V. V., Efremov Y.R., Dolgova E. V., Ruzanova V.S., Ritter G.S., et al. Karanahan: A Potential New Treatment Option for Human Breast Cancer and Its Validation in a Clinical Setting // Breast Cancer Basic Clin. Res. 2022. Vol. 16, № 3. P. 11782234211059932.

312. Proskurina A.S., Markina V.A., Ruzanova V.S., Ritter G.S., Dolgova E. V, Kirikovich S.S., et al. Results of the feasibility study of clinical trials of the new cancer treatment technology Karanahan for patients with advanced breast cancer // Transl. Cancer Res. 2026. Vol. 15, № 4. P. 255.

313. Proskurina A.S., Ruzanova V.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Theoretical premises of a “three in one” therapeutic approach to treat immunogenic and nonimmunogenic cancers: a narrative review // Transl. Cancer Res. 2021. Vol. 10, № 11. P. 4958.

314. Proskurina A.S., Ruzanova V.S., Tyrinova T. V., Strunkin D.N., Kirikovich S.S., Ritter G.S., et al. The basis of anticancer immunity mechanism induced by *in situ* vaccination // J. Sib. Fed. Univ. Biol. 2020. Vol. 2020, № 3. P. 235–269.

315. Psarras A., Antanaviciute A., Alase A., Carr I., Wittmann M., Emery P., et al. TNF-α Regulates Human Plasmacytoid Dendritic Cells by Suppressing IFN-γ Production and Enhancing T Cell Activation // J. Immunol. 2021. Vol. 206, № 4. P. 785–796.

316. Quesenberry P.J., Wen S., Goldberg L.R., Dooner M.S. The universal stem cell // Leukemia. 2022. Vol. 36, № 12. P. 2784.

317. Rastogi I., Jeon D., Moseman J.E., Muralidhar A., Potluri H.K., McNeel D.G. Role of B cells as antigen presenting cells // Front. Immunol. 2022. Vol. 13, P. 954936.

318. Ravnsborg T., Olsen D.T., Hammerich A., Christiansen M., Houen G., Højrup P. Biochimica et Biophysica Acta The glycosylation and characterization of the candidate Gc macrophage activating factor // Biochim Biophys Acta. 2010. Vol. 1804, № 4. P. 909–917.

319. Redmond W.L. Challenges and opportunities in the development of combination immunotherapy with OX40 agonists // Expert Opin. Biol. Ther. 2023. Vol. 23, № 9. P. 901.

320. Redmond W.L., Gough M.J., Weinberg A.D. Ligation of the OX40 co-stimulatory receptor reverses self-Ag and tumor-induced CD8 T-cell anergy *in vivo* // Eur. J. Immunol. 2009a. Vol. 39, № 8. P. 2184–2194.

321. Redmond W.L., Ruby C.E., Weinberg A.D. The Role of OX40-mediated Co-stimulation in T-cell activation and survival // Crit. Rev. Immunol. 2009b. Vol. 29, № 3. P. 187–201.

322. Requesens M., Foijer F., Nijman H.W., de Bruyn M. Genomic instability as a driver and suppressor of anti-tumor immunity // Front. Immunol. 2024. Vol. 15, P. 1462496.

323. Ricci-Vitiani L., Lombardi D.G., Pilozzi E., Biffoni M., Todaro M., Peschle C., et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells // Nature. 2007. Vol. 445, № 7123. P. 111–115.

324. Roerden M., Castro A.B., Cui Y., Harake N., Kim B., Dye J., et al. Neoantigen architectures define immunogenicity and drive immune evasion of tumors with heterogenous neoantigen expression // J. Immunother. Cancer. 2024. Vol. 12, № 11. P. e010249.

325. Roussot N., Ghiringhelli F., Rébé C. Tumor Immunogenic Cell Death as a Mediator of Intratumor CD8 T-Cell Recruitment // Cells. 2022. Vol. 11, № 22. P. 3672.

326. Rozenberg S., Di Pietrantonio V., Vandromme J., Gilles C. Menopausal hormone therapy and breast cancer risk // Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 2021. Vol. 35, № 6. P. 101577.

327. Russo E., Laffranchi M., Tomaipitinca L., Del Prete A., Santoni A., Sozzani S., et al. NK Cell Anti-Tumor Surveillance in a Myeloid Cell-Shaped Environment // Front. Immunol. 2021. Vol. 12, P. 787116.

328. Ruzanova V., Proskurina A., Efremov Y., Kirikovich S., Ritter G., Levites E., et al. Chronometric Administration of Cyclophosphamide and a Double-Stranded DNA-Mix at Interstrand Crosslinks Repair Timing, Called “Karanahan” Therapy, Is Highly Efficient in a Weakly Immunogenic Lewis Carcinoma Model // Pathol. Oncol. Res. 2022. Vol. 28, P. 1610180.

329. Ruzanova V., Proskurina A., Ritter G., Dolgova E., Oshikhmina S., Kirikovich S., et al. The synergistic antitumor effect of Karanahan technology and *in situ* vaccination using anti-OX40 antibodies // Oncol. Res. 2025. Vol. 33, № 5. P. 1229–1248.

330. Ruzanova V.S., Proskurina A.S., Ritter G.S., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., et al. Experimental comparison of the *in vivo* efficacy of two novel anticancer therapies // Anticancer Res. 2021. Vol. 41, № 7. P. 3371–3387.

331. Saadh M.J., Rasulova I., Khalil M., Farahim F., Sârbu I., Ciongradi C.I., et al. Natural killer cell-mediated immune surveillance in cancer: Role of tumor microenvironment // Pathol. - Res. Pract. 2024. Vol. 254, P. 155120.

332. Saburi E., Saburi A., Ghanei M. Promising role for Gc-MAF in cancer immunotherapy: From bench to bedside // Casp. J. Intern. Med. 2017. Vol. 8, № 4. P. 228–238.

333. Sadrolashrafi K., Guo L., Kikuchi R., Hao A., Yamamoto R.K., Tolson H.C., et al. An OX-Tra ’ Ordinary Tale : The Role of OX40 and OX40L in Atopic Dermatitis // Cells. 2024. Vol. 13, № 7. P. 587.

334. Sagiv-Barfi I., Czerwinski D.K., Levy S., Alam I.S., Mayer A.T., Gambhir S.S., et al. Eradication of spontaneous malignancy by local immunotherapy // Sci. Transl. Med. 2018. Vol. 10, № 426. P. eaan4488.

335. Saha T., Lukong K.E. Breast Cancer Stem-Like Cells in Drug Resistance: A Review of Mechanisms and Novel Therapeutic Strategies to Overcome Drug Resistance // Front. Oncol. 2022. Vol. 12, P. 856974.

336. Sahoo S., Ashraf B., Duddu A.S., Biddle A., Jolly M.K. Interconnected high-dimensional landscapes of epithelial–mesenchymal plasticity and stemness in cancer // Clin. Exp. Metastasis. 2022. Vol. 39, № 2. P. 279–290.

337. Salas-Benito D., Pérez-Gracia J.L., Ponz-Sarvisé M., Rodriguez-Ruiz M.E., Martínez-Forero I., Castañón E., et al. Paradigms on immunotherapy combinations with chemotherapy // Cancer Discov. 2021. Vol. 11, № 6. P. 1353–1367.

338. Salem M.L., Al-khami A.A., El-nagaar S.A., Zidan A.A., Al-Sharkawi I.M., Diaz-Montero C.M., et al. Kinetics of rebounding of lymphoid and myeloid cells in mouse peripheral blood, spleen and bone marrow after treatment with cyclophosphamide // Cell Immunol. 2012. Vol. 276, № 1–2. P. 67–74.

339. Salinas-Jazmín N., Rosas-Cruz A., Velasco-Velazquez M. Reporter gene systems for the identification and characterization of cancer stem cells // World J. Stem Cells. 2021. Vol. 13, № 7. P. 861.

340. Salomon B.L. Insights into the biology and therapeutic implications of TNF and regulatory T cells // Nat. Rev. Rheumatol. 2021. Vol. 17, № 8. P. 487–504.

341. Samaritani R., Corrado G., Vizza E., Sbiroli C. Cyclophosphamide “metronomic” chemotherapy for palliative treatment of a young patient with advanced epithelial ovarian cancer // BMC Cancer. 2007. Vol. 7, P. 1–5.

342. Sami A., Raza A. Reprogramming the tumor microenvironment – macrophages emerge as key players in breast cancer immunotherapy // Front. Immunol. 2024. Vol. 15, P. 1457491.

343. Sancar A., Van Gelder R.N. Clocks, cancer, and chronochemotherapy // Science. 2021. Vol. 371, № 6524. P. eabb0738.

344. Sanchez-Ruiz M., Iorgu A.M., Küster F., Hellmich M., Brunn A., Deckert M. CD8 T cell–Derived Perforin and TNF-α Are Crucial Mediators of Neuronal Destruction in Experimental Autoimmune Enteric Ganglionitis // Am. J. Pathol. 2021. Vol. 191, № 6. P. 1064–1076.

345. Sen Santara S., Lee D.J., Crespo Â., Hu J.J., Walker C., Ma X., et al. The NK cell receptor NKp46 recognizes ecto-calreticulin on ER-stressed cells // Nature. 2023. Vol. 616, № 7956. P. 348–356.

346. Sarabia-Sánchez M.A., Tinajero-Rodríguez J.M., Ortiz-Sánchez E., Alvarado-Ortiz E. Cancer Stem Cell markers: Symphonic masters of chemoresistance and immune evasion // Life Sci. 2024. Vol. 355, P. 123015.

347. Schatton T., Murphy G.F., Frank N.Y., Yamaura K., Waaga-Gasser A.M., Gasser M., et al. Identification of cells initiating human melanomas // Nature. 2008. Vol. 451, № 7176. P. 345–349.

348. Schmid P., Adams S., Rugo H.S., Schneeweiss A., Barrios C.H., Iwata H., et al. Atezolizumab and

Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer // N. Engl. J. Med. 2018. Vol. 379, № 22. P. 2108–2121.

349. Schultz E.M., Gunning C.E., Cornelius J.M., Reichard D.G., Klasing K.C., Hahn T.P., et al. Patterns of annual and seasonal immune investment in a temporal reproductive opportunist // Proc Biol Sci. 2020. Vol. 287, № 1929. P. 20192993.

350. Scott E.N., Gocher A.M., Workman C.J., Vignali D.A.A. Regulatory T Cells: Barriers of Immune Infiltration Into the Tumor Microenvironment // Front. Immunol. 2021. Vol. 12, P. 702726.

351. Seyrek K., Espe J., Reiss E., Lavrik I.N. The Crosstalk of Apoptotic and Non-Apoptotic Signaling in CD95 System // Cells. 2024. Vol. 13, № 21. P. 1814.

352. Shafi A.A., Knudsen K.E. Cancer and the Circadian Clock // Cancer Res. 2019. Vol. 79, № 15. P. 3806–3814.

353. Shan N.L., Shin Y., Yang G., Furmanski P., Suh N. Breast cancer stem cells: A review of their characteristics and the agents that affect them // Mol. Carcinog. 2021. Vol. 60, № 2. P. 73–100.

354. Shi Y., Hou Y., Mabrouk M.T., Yu C., Yang Y. *In Situ* Vaccines in the Era of Cancer Immunotherapy : Conceptual Innovation and Clinical Translation // Adv Sci. 2025. Vol. 12, № 37. P. e09836.

355. Shklovskaya E., Rizos H. MHC Class I Deficiency in Solid Tumors and Therapeutic Strategies to Overcome It // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, № 13. P. 6741.

356. Shostak A. Circadian clock, cell division, and cancer: from molecules to organism // Int. J. Mol. Sci. 2017. Vol. 18, № 4. P. 873.

357. Siegmund D., Wajant H. TNF and TNF receptors as therapeutic targets for rheumatic diseases and beyond // Nat. Rev. Rheumatol. 2023. Vol. 19, № 9. P. 576–591.

358. Simsek C., Esin E., Yalcin S. Metronomic chemotherapy: A systematic review of the literature and clinical experience // J. Oncol. 2019. Vol. 2019, P. 5483791.

359. Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., Squire J.A., Bayani J., Hide T., et al. Identification of human brain tumour initiating cells // Nature. 2004. Vol. 432, № 7015. P. 396–401.

360. Smolarz B., Zadrożna Nowak A., Romanowicz H. Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature) // Cancers (Basel). 2022. Vol. 14, № 10. P. 2569.

361. Smolensky M.H., Hermida R.C., Reinberg A., Sackett-Lundeen L., Portaluppi F. Circadian disruption: New clinical perspective of disease pathology and basis for chronotherapeutic intervention // Chronobiol. Int. 2016. Vol. 33, № 8. P. 1101–1119.

362. Song R., Zhang H., Liang Z. Research progress in OX40/OX40L in allergic diseases // Int. Forum Allergy Rhinol. 2024. Vol. 14, № 12. P. 1921–1928.

363. Stacey H.D., Golubeva D., Posca A., Ang J.C., Novakowski K.E., Zahoor M.A., et al. IgA potentiates NETosis in response to viral infection // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2021. Vol. 118, №

27. P. e2101497118.

364. Stockert J.C., Blázquez-Castro A., Cañete M., Horobin R.W., Villanueva Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets // Acta Histochem. 2012. Vol. 114, № 8. P. 785–796.

365. Strizova Z., Benesova I., Bartolini R., Novysedlak R., Cecrdlova E., Foley L.K., et al. M1/M2 macrophages and their overlaps – myth or reality? // Clin. Sci. 2023. Vol. 137, № 15. P. 1067–1093.

366. Subrahmanyam P.B., Carey G.B., Webb T.J. Bcl-xL regulates CD1d-mediated antigen presentation to NKT cells by altering CD1d trafficking through the endocytic pathway // J. Immunol. 2014. Vol. 193, № 5. P. 2096–2105.

367. Sulli G., Lam M.T.Y., Panda S. Interplay between circadian clock and cancer: New frontiers for cancer treatment // Trends in Cancer. 2019. Vol. 5, № 8. P. 475–494.

368. Sultanbaev A. V., Tuzankina I.A., Nasretdinov A.F., Sultanbaeva N.I., Musin S.I., Menshikov K. V., et al. Mechanisms of Formation of Specific Antitumor Immunity and Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors // Probl. Oncol. 2024. Vol. 70, № 3. P. 433–439.

369. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA. Cancer J. Clin. 2021. Vol. 71, № 3. P. 209–249.

370. Suzuki E., Kapoor V., Jassar A.S., Kaiser L.R., Albelda S.M. Gemcitabine Selectively Eliminates Splenic Gr-1+/CD11b+ Myeloid Suppressor Cells in Tumor-Bearing Animals and Enhances Antitumor Immune Activity // Clin. Cancer Res. 2005. Vol. 11, № 18. P. 6713–6721.

371. Swan D., Gurney M., Krawczyk J., Ryan A.E., O'Dwyer M. Beyond DNA damage: Exploring the immunomodulatory effects of cyclophosphamide in multiple myeloma // HemaSphere. 2020. Vol. 4, № 2. P. e350.

372. Tai Y., Wang Q., Korner H., Zhang L., Wei W. Molecular mechanisms of T cells activation by dendritic cells in autoimmune diseases // Front. Pharmacol. 2018. Vol. 9, P. 642.

373. Tan S., Li D., Zhu X. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond // Biomed. Pharmacother. 2020. Vol. 124, P. 109821.

374. Tay C., Tanaka A., Sakaguchi S. Tumor-infiltrating regulatory T cells as targets of cancer immunotherapy // Cancer Cell. 2023. Vol. 41, № 3. P. 450–465.

375. Taylor B.C., Balko J.M. Mechanisms of MHC-I Downregulation and Role in Immunotherapy Response // Front. Immunol. 2022. Vol. 13, P. 844866.

376. Tendler A., Bar A., Mendelsohn-Cohen N., Karin O., Kohanim Y.K., Maimon L., et al. Hormone seasonality in medical records suggests circannual endocrine circuits // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2021. Vol. 118, № 7. P. e2003926118.

377. Thapa B., Kato S., Nishizaki D., Miyashita H., Lee S., Nesline M.K., et al. OX40/OX40 ligand and

its role in precision immune oncology // Cancer Metastasis Rev. 2024. Vol. 43, № 3. P. 1001–1013.

378. Thu Y., Richmond A. NF-κB inducing kinase: a key regulator in the immune system and in cancer // Cytokine Growth Factor Rev. 2010. Vol. 21, № 4. P. 213–226.

379. Tiwari A., Wang A.L., Li J., Lutz S.M., Kho A.T., Weiss S.T., et al. Seasonal Variation in miR-328-3p and let-7d-3p Are Associated With Seasonal Allergies and Asthma Symptoms in Children // Allergy. Asthma Immunol. Res. 2021. Vol. 13, № 4. P. 576.

380. Tran A.P., Ali Al-Radhawi M., Kareva I., Wu J., Waxman D.J., Sontag E.D. Delicate Balances in Cancer Chemotherapy: Modeling Immune Recruitment and Emergence of Systemic Drug Resistance // Front. Immunol. 2020. Vol. 11, P. 1376.

381. Trosko J.E. On the potential origin and characteristics of cancer stem cells // Carcinogenesis. 2021. Vol. 42, № 7. P. 905–912.

382. Tsuji G., Yamamura K., Kawamura K., Kido-Nakahara M., Ito T., Nakahara T. Novel Therapeutic Targets for the Treatment of Atopic Dermatitis // Biomedicines. 2023. Vol. 11, № 5. P. 1303.

383. Tufail M., Wan W.D., Jiang C., Li N. Targeting PI3K/AKT/mTOR signaling to overcome drug resistance in cancer // Chem. Biol. Interact. 2024. Vol. 396, P. 111055.

384. Tummers B., Green D.R. The evolution of regulated cell death pathways in animals and their evasion by pathogens // Physiol. Rev. 2022. Vol. 102, № 1. P. 411.

385. Tuomela K., Ambrose A.R., Davis D.M. Escaping Death: How Cancer Cells and Infected Cells Resist Cell-Mediated Cytotoxicity // Front. Immunol. 2022. Vol. 13, P. 867098.

386. Ufimtseva E.G., Eremeeva N.I., Skornyakov S.N. Lesion-specific features of macrophage polarization contribute to Mycobacterium tuberculosis infection in the lungs of patients with pulmonary tuberculosis // Front. Immunol. 2026. № 17. P. 18332.

387. Vandikas M.S., Landin-Wilhelmsen K., Gillstedt M., Osmancevic A. Vitamin D-Binding Protein and the Free Hormone Hypothesis for Vitamin D in Bio-Naïve Patients with Psoriasis // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, № 3. P. 1302.

388. Venkatachalapathy D., Doddamani P., Hirriyannaiah A. V, Vishwanath P., Nataraj S., Prashant A. Stem Cells in Solid Tumors: Accumulated Evidence and Future Directions // Indian J. Med. Biochem. 2024. Vol. 28, № 1. P. 13–24.

389. Verma R.S., Singh G., Singh A., Singh P. Assessment of tumor microenvironment expression and clinical significance of immune inhibitory molecule CTLA-4, ligand B7-1, and tumor-infiltrating regulatory cells in Hodgkin lymphoma // J. Med. Life. 2023. Vol. 16, № 4. P. 599.

390. Vincent J., Mignot G., Chalmin F., Ladoire S., Bruchard M., Chevriaux A., et al. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity // Cancer Res. 2010. Vol. 70, № 8. P. 3052–3061.

391. Vorobjeva N. V., Chernyak B. V. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and

Pathology // Biochem. 2020. Vol. 85, № 10. P. 1178–1190.

392. Vorontsova A., Kan T., Raviv Z., Shaked Y. The Dichotomous Role of Bone Marrow Derived Cells in the Chemotherapy-Treated Tumor Microenvironment // J. Clin. Med. 2020. Vol. 9, № 12. P. 3912.

393. Wagner M., Koyasu S. Innate Lymphoid Cells in Skin Homeostasis and Malignancy // Front. Immunol. 2021. Vol. 12, P. 758522.

394. Walsh M.C., Lee J., Yongwon C. Tumor necrosis factor receptor- associated factor 6 (TRAF6) regulation of development , function , and homeostasis of the immune system // Immunol. Rev. 2015. Vol. 266, P. 72–92.

395. Wang B., Hu S., Teng Y., Chen J., Wang H., Xu Y., et al. Current advance of nanotechnology in diagnosis and treatment for malignant tumors // Signal Transduct. Target. Ther. 2024. Vol. 9, № 1. P. 1–65.

396. Wang D., Wei H. Natural killer cells in tumor immunotherapy // Cancer Biol. Med. 2023. Vol. 20, № 8. P. 539.

397. Wang D.R., Dou L.Y., Sui L.H., Xue Y., Xu S. Natural killer cells in cancer immunotherapy // MedComm. 2024. Vol. 5, № 7. P. e626.

398. Wang J., Qu J., Hou Q., Huo X., Zhao X., Chang L., et al. Strategies for the Isolation and Identification of Gastric Cancer Stem Cells // Stem Cells Int. 2024. Vol. 2024, P. 5553852.

399. Wang K., Tepper J.E. Radiation therapy-associated toxicity: Etiology, management, and prevention // CA. Cancer J. Clin. 2021. Vol. 71, № 5. P. 437–454.

400. Wang Q., Shen X., Chen G., Du J. Drug Resistance in Colorectal Cancer: From Mechanism to Clinic // Cancers (Basel). 2022. Vol. 14, № 12. P. 2928.

401. Wang R., Lan C., Benlagha K., Camara N.O.S., Miller H., Kubo M., et al. The interaction of innate immune and adaptive immune system // MedComm. 2024. Vol. 5, № 10. P. e714.

402. Wang S., Liu C., Yang C., Jin Y., Cui Q., Wang D., et al. PI3K/AKT/mTOR and PD-1/CTLA-4/CD28 pathways as key targets of cancer immunotherapy (Review) // Oncol. Lett. 2024. Vol. 28, № 6. P. 567.

403. Wang Y., Wang M., Wu H.X., Xu R.H. Advancing to the era of cancer immunotherapy // Cancer Commun. 2021. Vol. 41, № 9. P. 803–829.

404. Wang Yufei, Jia A., Bi Y., Wang Yuexin, Yang Q., Cao Y., et al. Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer Immunotherapy // Cancers (Basel). 2020. Vol. 12, № 9. P. 2626.

405. Wang Yurui, Song Y., He Y., Wang Yang, Maurer J., Kiessling F., et al. Direct Immunoactivation by Chemotherapeutic Drugs in Cancer Treatment // Adv. Ther. 2023. Vol. 6, № 12. P. 2300209.

406. Weagel E., Smith C., Liu P.G., Robison R., O'Neill K. Macrophage Polarization and Its Role in Cancer // J. Clin. Cell. Immunol. 2015. Vol. 6, P. 338.

407. Webb G.J., Hirschfield G.M., Lane P.J.L. OX40, OX40L and Autoimmunity: a Comprehensive

Review // Clin. Rev. Allergy Immunol. 2016. Vol. 50, № 3. P. 312–332.

408. Webb T.J., Carey G.B., East J.E., Sun W., Bollino D.R., Kimball A.S., et al. Alterations in cellular metabolism modulate CD1d-mediated NKT-cell responses // Pathog. Dis. 2016. Vol. 74, № 6. P. ftw055.

409. Wegiel B., Vuerich M., Daneshmandi S., Seth P. Metabolic switch in the tumor microenvironment determines immune responses to anti-cancer therapy // Front. Oncol. 2018. Vol. 8, P. 284.

410. Weinberg A.D., Morris N.P., Kovacsovics-Bankowski M., Urba W.J., Curti B.D. Science gone translational: the OX40 agonist story // Immunol. Rev. 2011. Vol. 244, № 1. P. 218–231.

411. Welters M.J., Van Der Sluis T.C., Van Meir H., Loof N.M., Van Ham V.J., Van Duikeren S., et al. Vaccination during myeloid cell depletion by cancer chemotherapy fosters robust T cell responses // Sci. Transl. Med. 2016. Vol. 8, № 334. P. 334ra52-334ra52.

412. WHO | World Health Organization. n.d.

413. Wikén I., Andersson T.M.L., Radkiewicz C. Seasonal effects on cancer incidence and prognosis // Acta Oncol. (Madr). 2023. Vol. 62, № 2. P. 103–109.

414. Willoughby J., Griffiths J., Tews I., Cragg M.S. OX40 : Structure and function – What questions remain? // Mol. Immunol. 2017. Vol. 83, P. 13–22.

415. Wu C., Wei Q., Utomo V., Nadesan P., Whetstone H., Kandel R., et al. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential // Cancer Res. 2007. Vol. 67, № 17. P. 8216–8222.

416. Wu H., Xu Z., Wang Z., Ren Z., Li L., Ruan Y. Dendritic cells with METTL3 gene knockdown exhibit immature properties and prolong allograft survival // Genes Immun. 2020. Vol. 21, № 3. P. 193–202.

417. Wu J., Waxman D.J. Immunogenic chemotherapy : Dose and schedule dependence and combination with immunotherapy // Cancer Lett. 2018. Vol. 419, P. 210–221.

418. Wu J., Waxman D.J. Metronomic cyclophosphamide schedule-dependence of innate immune cell recruitment and tumor regression in an implanted glioma model // Cancer Lett. 2014. Vol. 353, № 2. P. 272–280.

419. Wyse C., O'Malley G., Coogan A.N., McConkey S., Smith D.J. Seasonal and daytime variation in multiple immune parameters in humans: Evidence from 329,261 participants of the UK Biobank cohort // IScience. 2021. Vol. 24, № 4. P. 102255.

420. Xia P., Liu D.H., Xu Z.J., Ren F. Cancer Stem Cell Markers for Urinary Carcinoma // Stem Cells Int. 2022. Vol. 2022, P. 1–7.

421. Xiao L., Zhang L., Guo C., Xin Q., Gu X., Jiang C., et al. "Find Me" and "Eat Me" signals: tools to drive phagocytic processes for modulating antitumor immunity // Cancer Commun. (London, England). 2024. Vol. 44, № 7. P. 791–832.

422. Xiao X., Balasubramanian S., Liu W., Chu X., Wang H., Taparowsky E., et al. OX40 signaling

favors the induction of TH9 cells and airway inflammation // Nat Immunol. 2012. Vol. 13, № 10. P. 981–990.

423. Xu J., Zong S., Sheng T., Zheng J., Wu Q., Wang Q., et al. Rapamycin increases leukemia cell sensitivity to chemotherapy by regulating mTORC1 pathway-mediated apoptosis and autophagy // Int. J. Hematol. 2024. Vol. 119, № 5. P. 541–551.

424. Xu Y.D., Cheng M., Shang P.P., Yang Y.Q. Role of IL-6 in dendritic cell functions // J. Leukoc. Biol. 2022. Vol. 111, № 3. P. 695–709.

425. Yadav A.K., Desai N.S. Cancer Stem Cells: Acquisition, Characteristics, Therapeutic Implications, Targeting Strategies and Future Prospects // Stem Cell Rev. Reports. 2019. Vol. 15, № 3. P. 331–355.

426. Yamamoto N., Kumashiro R. Conversion of vitamin D3 binding protein (group-specific component) to a macrophage activating factor by the stepwise action of beta-galactosidase of B cells and sialidase of T cells // J. Immunol. 1993. Vol. 151, № 5. P. 2794–2802.

427. Yamamoto Nobuto, Suyama H., Yamamoto Nobuyuki. Immunotherapy for Prostate Cancer with Gc Protein-Derived Macrophage-Activating Factor, GcMAF // Transl. Oncol. 2008. Vol. 1, № 2. P. 65–72.

428. Yan L.H., Liu X.L., Mo S.S., Zhang D., Mo X.W., Tang W.Z. OX40 as a novel target for the reversal of immune escape in colorectal cancer // Am. J. Transl. Res. 2021. Vol. 13, № 3. P. 923.

429. Yang L., Ning Q., Tang S.S. Recent Advances and Next Breakthrough in Immunotherapy for Cancer Treatment // J. Immunol. Res. 2022. Vol. 2022, P. 8052212.

430. Yang Y., Li S., To K.K.W., Zhu S., Wang F., Fu L. Tumor-associated macrophages remodel the suppressive tumor immune microenvironment and targeted therapy for immunotherapy // J Exp Clin Cancer Res. 2025. Vol. 44, P. 1–28.

431. Yang Z.F., Ho D.W., Ng M.N., Lau C.K., Yu W.C., Ngai P., et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer // Cancer Cell. 2008. Vol. 13, № 2. P. 153–166.

432. Yao B., Tan Y., An K., Kang Y., Hou Q., Zhang D., et al. Seasonal patterns of miRNA and mRNA expression profiles in the testes of plateau zokors (Eospalax baileyi) // Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics. 2023. Vol. 48, P. 101143.

433. Yee P.P., Li W. Tumor necrosis: A synergistic consequence of metabolic stress and inflammation // BioEssays. 2021. Vol. 43, № 7. P. 2100029.

434. Yi M., Li T., Niu M., Mei Q., Zhao B., Chu Q., et al. Exploiting innate immunity for cancer immunotherapy // Mol. Cancer. 2023. Vol. 22, № 1. P. 1–55.

435. Yi M., Li T., Niu M., Zhang H., Wu Y., Wu K., et al. Targeting cytokine and chemokine signaling pathways for cancer therapy // Signal Transduct. Target. Ther. 2024. Vol. 9, № 1. P. 1–48.

436. Yu S., Zhang C., Xie K.P. Therapeutic resistance of pancreatic cancer: Roadmap to its reversal // Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer. 2021. Vol. 1875, № 1. P. 188461.

437. Yu Y.Q., Gamez-Belmonte R., Patankar J. V., Liebing E., Becker C. The Role of Programmed Necrosis in Colorectal Cancer // Cancers (Basel). 2022. Vol. 14, № 17. .

438. Yuan Z., Pan Y., Yuan H., Gong A. OX40 / OX40L : a new target for tumor immunotherapy and its clinical research progress // Front. Oncol. 2026. Vol. 15, P. 1–16.

439. Zafrilla P., Marhuenda J., Cerdá B., Pérez S., Rius-Pérez S. Macrophage Polarization and Reprogramming in Acute Inflammation: A Redox Perspective // Antioxidants. 2022. Vol. 11, № 7. P. 1394.

440. Zajonc D.M., Girardi E. Recognition of microbial glycolipids by natural killer T cells // Front. Immunol. 2015. Vol. 6, P. 400.

441. Zeng Z., Fu M., Hu Y., Wei Y., Wei X., Luo M. Regulation and signaling pathways in cancer stem cells: implications for targeted therapy for cancer // Mol. Cancer. 2023. Vol. 22, № 1. P. 1–31.

442. Zhang A., Miao K., Sun H., Deng C.X. Tumor heterogeneity reshapes the tumor microenvironment to influence drug resistance // Int. J. Biol. Sci. 2022. Vol. 18, № 7. P. 3019.

443. Zhang C., Hu Y., Shi C. Targeting Natural Killer Cells for Tumor Immunotherapy // Front. Immunol. 2020. Vol. 11, P. 484757.

444. Zhang H., Yang L., Wang T., Li Z. NK cell-based tumor immunotherapy // Bioact. Mater. 2024. Vol. 31, P. 63–86.

445. Zhang J., Zhou X., Hao H. Macrophage phenotype-switching in cancer // Eur. J. Pharmacol. 2022. Vol. 931, P. 175229.

446. Zhang X., Kim T.H., Thauland T.J., Li H., Majedi F.S., Ly C., et al. Unraveling the mechanobiology of immune cells // Curr. Opin. Biotechnol. 2020. Vol. 66, P. 236–245.

447. Zhao L., Zhang W., Liu M., Jia R., Wang J., Wang F., et al. OX40L enhances the immunogenicity of dendritic cells and inhibits tumor metastasis in mice // Microbiol. Immunol. 2023. Vol. 67, № 2. P. 79–89.

448. Zheng Q., Zhang M., Zhou F., Zhang L., Meng X. The Breast Cancer Stem Cells Traits and Drug Resistance // Front. Pharmacol. 2021. Vol. 11, P. 599965.

449. Zhong H., Lai Y., Zhang R., Daoud A., Feng Q., Zhou J., et al. Low Dose Cyclophosphamide Modulates Tumor Microenvironment by TGF-β Signaling Pathway // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21, № 3. P. 957.

450. Zhou X., Xie F., Wang L., Zhang L., Zhang S., Fang M., et al. The function and clinical application of extracellular vesicles in innate immune regulation // Cell. Mol. Immunol. 2020. Vol. 17, P. 323–334.

451. Zhu S., Zhang T., Zheng L., Liu H., Song W., Liu D., et al. Combination strategies to maximize the benefits of cancer immunotherapy // J. Hematol. Oncol. 2021. Vol. 14, № 1. P. 1–33.

452. Zingoni A., Antonangeli F., Sozzani S., Santoni A., Cippitelli M., Soriani A. The senescence journey in cancer immunoediting // Mol. Cancer. 2024. Vol. 23, № 1. P. 1–21.

453. Акинфиева О.В., Бубнова Л.Н., Бессмельцев С.С. NKT-клетки: характерные свойства и функциональная значимость для регуляции иммунного ответа // Онкогематология. 2010. № 4. С. 39–47.

454. Долгова Е.В., Поттер Е.А., Проскурина А.С., Николин В.П., Попова Н.А., Романенко М.В., и др. Оценка эффективности эрадикации стволовых инициирующих раковых клеток на примере линии клеток глиобластомы человека U87 // Вопросы Онкологии. 2019. Т. 65, № 6. С. 904–919.

455. Ефремов Я.Р., Проскурина А.С., Поттер Е.А., Долгова Е.В., Ефремова О.В., Ощепков Д.Ю., и др. Стволовые раковые клетки: «служба спасения» для опухолей в условиях генерализованного клеточного стресса // Математическая Биология и Биоинформатика. 2019. Т. 14, № 1. С. 306–326.

456. Липенгольц А.А., Калашникова Е.В., Скрибицкий В.А., Лобжанидзе Т.К., Смирнова А.В., Васильева В.В., и др. Методика оценки терапевтической эффективности новых лучевых технологий лечения злокачественных новообразований // Лучевая Терапия. 2019. Т. 4, С. 10–15.

457. Лисяный Н.И., Лисяный А.А. Нейтрофилы и онкогенез // Клиническая Онкология. 2018. Т. 8, № 1. С. 40–45.

458. Логинова Е.Н., Лялюкова Е.А., Надей Е.В., Семенова Е.В. Основы иммуноонкологии и иммунотерапии в онкологии // Экспериментальная и Клиническая Гастроэнтерология. 2022. Т. 205, № 9. С. 129–139.

459. Мисюрин В.А. Структура и свойства основных рецепторов и лиганов внешнего пути апоптоза // Российский Биотерапевтический Журнал. 2015. Т. 2, № 14. С. 23–30.

460. Никонова А.А., Хаитов М.Р., Хаитов Р.М. Характеристика и роль различных популяций макрофагов в патогенезе острых и хронических заболеваний легких // Медицинская Иммунология. 2017. Т. 19, № 6. С. 657–672.

461. Поттер Е.А., Риттер Г.С., Долгова, Е.В. Проскурина, А.С. Кисаретова П.Э., Ефремов Я.Р., Николин В.П., Попова Н.А., и др. Оценка эффективности эрадикации стволовых инициирующих раковых клеток на примере асцитной формы гепатокарциномы мыши Г- 29 // Вопросы Онкологии. 2018. Т. 64, № 6. С. 818–829.

462. Филиппов Э.В. Использование метода «ДНК - комет» для детекции и оценки степени повреждений ДНК клеток организмов растений, животных и человека, вызванных факторами окружающей среды (обзор) // НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ. 2014. № 2. С. 72–78.

Приложения

Приложение 1. Экспериментальный дизайн исследования. Представлена последовательность проведенных экспериментов и перечислены методы, используемые в ходе каждого из экспериментов

Эксперимент	**Применяемые методы**	**Краткое описание**	**Время проведения эксперимента (начало эксперимента)**
Часть 1. Совмещение подхода «Каранахан» и in situ вакцинации активатором маркрофагов GcMAF на модели карциномы лёгкого Льюис.			
1) оценка основных параметров подхода «Каранахан» для выбранной экспериментальной модели			
Определение содержания дзОСК в опухоли	1. Мечение ДНК флуоресцентным красителем TAMRA 2. Выделение опухолевых клеток 3. Определение содержания дзОСК в опухоли	На первом шаге проверяется наличие в опухоли ДНК-захватывающих опухолевых стволовых клеток (дзОСК)	-
Анализ репаративного цикла в клетках опухоли	1. Выделение опухолевых клеток 2. Анализ цикла репарации в опухолевых клетках	На втором шаге определяется продолжительность цикла репарции межцепочечных сшивок, индуцированных обработкой кросслинкирующим цитостатиком.	-
Анализ клеточного цикла опухолевых клеток карциномы	1. Выделение опухолевых клеток	На третьем шаге определяется день синхронизации	-

Льюис после трехкратной обработки цитостатиком	2. Определение времени синхронизации опухолевых клеток после трехкратной обработки цитостатиком в режиме, блокирующем выход клеток из репаративного процесса	опухолевых стволовых клеток (ОСК) в чувствительной для обработок фазе клеточного цикла (день финальной эрадицирующей обработки)	
По полученным результатам определяется схема обработки циклофосфамидом (ЦФ) и препаратом dsDNAmix мышей с карциномой Льюис согласно подходу «Каранахан»			
2) характеристика противоопухолевого действия подхода «Каранахан» на выбранной экспериментальной модели			
Эксперимент №1	Лечение экспериментальных животных	Мышам внутримышечно прививают клетки опухоли карциномы Льюис. Экспериментальную группу обрабатывают в соответствии со схемой лечения карциномы Льюис согласно подходу «Каранахан». Контрольная группа получает аналогичные инъекции физиологического раствора.	Май 2019 г.
Эксперимент №2			Май 2020 г.
Эксперимент №3			Март 2019 г.
Эксперимент №4			Ноябрь 2019 г.
3) характеристика противоопухолевого действия *in situ* вакцинации на выбранной экспериментальной модели			

Эксперимент №5	Лечение экспериментальных животных	Мышам внутримышечно прививают клетки опухоли карциномы Льюис. Группу «Каранахан» обрабатывают в соответствии с найденной схемой лечения карциномы Льюис согласно подходу «Каранахан». Группе «GcMAF» ежедневно вводят препарат GcMAF, чередуя по дням внутрибрюшинные и внутриопухолевые инъекции. Группе «Каранахан»+GcMAF (x4) производят инъекции согласно подходу «Каранахан», дополненные внутриопухолевым введением препарата GcMAF сразу после каждой инъекции препарата dsDNAmix. Контрольная группа получает аналогичные инъекции физиологического раствора.	Май 2019 г.

ПМФ+кондиционная среда от В-лимфомы	1. Выделение перитонеальных макрофагов 2. Активация перитонеальных макрофагов 3. Оценка влияния кондиционной среды В-лимфомы на активность перитонеальных макрофагов 4. Анализ активации фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мышей	Для определения причин отсутствия эффективности применения GcMAF в монорежиме (группа «GcMAF») исследуется влияние факторов, секретируемых опухолевыми клетками, на фагоцитарную активность макрофагов.	-
ПМФ+лизаты опухоли мышей, леченных согласно подходу «Каранахан»	1. Выделение перитонеальных макрофагов 2. Активация перитонеальных макрофагов 3. Воздействие на активированные препаратом GcMAF мышиные перитонеальные макрофаги лизатами опухоли Льюис 4. Анализ активации фагоцитарной активности	Для повышения эффективности применения GcMAF в лечении опухоли проводится поиск условий проявления противоопухолевых свойств препарата GcMAF. Анализируют влияние лизатов карциномы Льюис, выделенных из мышей, обработанных согласно подходу «Каранахан», на предварительно активированные	-

	перитонеальных макрофагов мышей	препаратом GcMAF ПМФ. Также оценивают влияние активации ПМФ препатом GcMAF после их инкубации совместно с лизатом опухоли. На основании полученных результатов осуществляется поиск режима, при котором действие лизата спроецировано на подготовленные обработкой GcMAF макрофаги. В результате найденного режима удается избежать индукции анергии фагоцитов и восстановить фагоцитарную (противоопухолевую) активность макрофагов.	
4) оценка аддитивного/синергичного противоопухолевого действия подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации выбранными факторами			
Эксперимент №6	Лечение карциномы лёгкого Льюис, используя подход «Каранахан» в сочетании с *in situ* вакцинацией активатором макрофагов GcMAF	На заключительном этапе исследования оценивают эффективность синергичного противоопухолевого действия подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации GcMAF. Мышам внутримышечно прививают клетки	Май 2020 г.
Эксперимент №7 (пилотный эксперимент, n=1)	1. Лечение карциномы лёгкого Льюис, используя подход		Ноябрь 2020 г.

Эксперимент №8	«Каранахан» в сочетании с *in situ* вакцинацией активатором макрофагов GcMAF 2. Выделение опухолевых клеток, мононуклеаров крови, клеток селезенки, перитонеальных макрофагов 3. Анализ изменения численности популяций иммунных клеток в опухоли, селезёнке, среди мононуклеаров крови и перитонеальных макрофагов 4. МТТ-тест 5. Приготовление мазков опухоли	карциномы Льюис. Группе «Каранахан» проводят инъекции в соответствии с определенной терапевтической схемой лечения карциномы Льюис согласно подходу «Каранахан». Группе «Каранахан»+GcMAF производят аналогичные инъекции, дополненные массированной обработкой опухолевого сайта препаратом GcMAF. Контрольная группа получает аналогичные инъекции физиологического раствора. В рамках экспериментов №7-9 при помощи наборов специфических антител к маркерам иммунных клеток, а также при помощи МТТ-теста, проводят оценку развития иммунного ответа, индуцированного проведенным лечением согласно подходу «Каранахан» и найденному терапевтическому	Февраль 2021 г. (V. Ruzanova et al., 2022)
Эксперимент №9 (статистический эксперимент, n=3)			Май 2021 г.
Эксперимент №10			Ноябрь 2021 г.

		режиму «Каранахан» в сочетании с *in situ* вакцинацией препаратом GcMAF. В рамках эксперимента №10 проводят анализ содержания клеток с фенотипом CD11b+Ly-6C+ в популяции ПМФ у мышей, пролеченных согласно подходу «Каранахан» и найденному терапевтическому режиму «Каранахан» в сочетании с *in situ* вакцинацией препаратом GcMAF.	
Анализ событий, произошедших в популяции клеток опухоль-ассоциированной стромы (ОАС) в результате применения подхода «Каранахан» в монорежиме и в комбинации с GcMAF	1. Активация перитонеальных макрофагов 2. Получение кДНК 3. ПЦР анализ 4. ПЦР в реальном времени	Из образцов опухоли, полученных в ходе экспериментов №7-9, и ПМФ, полученных в ходе эксперимента №10, выделяют суммарную РНК. По матрице кДНК, полученной в результате обратной транскрипции, проводят качественнный и количественный ПЦР анализ для оценки синтеза мРНК TGF-β1, TNF-α, IL-1β, Arg1, IL-12a, IL-10, IDO1, NOS2.	-

		Дополнительно проводят характеристику фенотипа и качественный и количественный ПЦР анализ синтеза специфических мРНК факторов/цитокинов ПМФ, выделенных из интактных мышей, неактивированных и активированных индукторами GcMAF и LPS. В ходе проведенных анализов определяется направление произошедших изменений в ОАС контрольных и экспериментальных мышей, а также возможность рекрутирования фагоцитов, локализованных вне системы циркуляции.	
Часть 2. Совмещение подхода «Каранахан» и in situ вакцинации антителами к OX40R на модели В-клеточной лимфомы А20			
1) оценка основных параметров подхода «Каранахан» для выбранной экспериментальной модели			
Определение содержания дзОСК в культуре опухолевых клеток	1. Мечение ДНК флуоресцентным красителем TAMRA	На первом шаге проверяется наличие среди опухолевых клеток дзОСК	-

	2. Выделение опухолевых клеток 3. Определение содержания дзОСК в опухоли		
Анализ репаративного цикла в опухолевых клетках	1. Выделение опухолевых клеток 2. Анализ цикла реапарации в опухолевых клетках	На втором шаге определяется продолжительность цикла репарации межцепочечных сшивок, индуцированных обработкой кросслинкирующим цитостатиком.	-
Анализ клеточного цикла опухолевых клеток В-клеточной лимфомы А20 после трехкратной обработки цитостатиком	1. Выделение опухолевых клеток 2. Определение времени синхронизации опухолевых клеток после трехкратной обработки цитостатиком в режиме, блокирующем выход клеток из репаративного процесса	На третьем шаге определяется день синхронизации ОСК в чувствительной для обработок фазе клеточного цикла (день финальной эрадицирующей обработки)	-
По полученным результатам определяется схема обработки ЦФ и препаратом dsDNAmix мышей с В-клеточной лимфомой А20 согласно подходу «Каранахан»			
2) характеристика противоопухолевого действия подхода «Каранахан» на выбранной экспериментальной модели			

Эксперимент №1	Лечение экспериментальных животных	Мышам внутримышечно прививают клетки В-клеточной лимфомы А20. Экспериментальную группу обрабатывают в соответствии со схемой лечения В-клеточной лимфомы А20 согласно подходу «Каранахан». Контрольная группа получает аналогичные инъекции физиологического раствора.	Сентябрь 2019 г.
3) характеристика противоопухолевого действия *in situ* вакцинации на выбранной экспериментальной модели			
Эксперимент №1	Лечение экспериментальных животных	Мышам внутримышечно прививают клетки В-клеточной лимфомы А20. Экспериментальную группу обрабатывают CpG и антителами к OX40R внутриопухолево в соответствии с опубликованной терапевтической схемой *in situ* вакцинации (Sagiv-Barfi et al., 2018). Контрольная группа получает аналогичные инъекции физиологического раствора.	Сентябрь 2019 г.

4) оценка аддитивного/синергичного противоопухолевого действия подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации выбранными факторами			
Эксперимент №2	Лечение экспериментальных животных	Проводится пробный (пилотный) эксперимент по объединению подходов. Мышам внутримышечно прививают клетки В-клеточной лимфомы А20. Группу «Каранахан» обрабатывают в соответствии с определенной терапевтической схемой лечения. Группам «Каранахан»+αOX40 производят аналогичные инъекции, дополненные внутриопухолевым введением антител к OX40R либо сразу, либо спустя 5 часов после каждой инъекции препарата dsDNAmix. Контрольная группа получает аналогичные инъекции физиологического раствора. В ходе пилотного эксперимента №2 обнаруживают высокую смертность в одной из	Декабрь 2019 г.
Эксперимент №3	1. Лечение экспериментальных животных 2. Патоморфологический анализ органов мышей		Март 2020 г.

		экспериментальных групп. Для выяснения причин смертности пилотный эксперимент повторяют (эксперимент №3) и проводят патоморфологический анализ органов и тканей. Показано, что проведенные обработки индуцируют системную воспалительную реакцию и полиорганную недостаточность.	
Анализ клеточных популяций крови мышей, обработанных согласно подходу «Каранахан».	1. Анализ изменения численности популяций MDSC среди мононуклеаров крови мышей, получавших лечение согласно подходу «Каранахан» 2. Оценка количества клеток-супрессоров миелоидного происхождения с фенотипом CD11b+Ly-6G+, активированных к нетозу, после применения подхода «Каранахан»	Проводятся эксперименты, направленные на понимание причин, послуживших развитию системного воспаления и гибели животных при обработке мышей согласно подходу «Каранахан» совместно с αOX40, введенными спустя 5 часов после введения препарата dsDNAmix. Для этого мышей с привитой B-клеточной A20 обрабатывают согласно подходу «Каранахан» и в определенные временные	1. Ноябрь 2021 г. и Декабрь 2025 г. 2. Апрель 2023 г. 3. Сентябрь 2023 г. 4. –

	3. Оценка количества клеток миелоидного происхождения, несущих на своей поверхности FcR и OX40R, после терапии согласно подходу «Каранахан» 4. Мечение антител αOX40	точки из них выделяют кровь. Популяция моноуклеаров крови анализируется на присутствие популяций MDSC, нейтрофилов, активированных к нетозу, а также клеток миелоидного происхождения, несущих на своей поверхности FcR и OX40R – как потенциальных участников гибели животных при введении в терапию антител к OX40R.	
Эксперимент №4	Лечение В-клеточной лимфомы A20, используя совмещенный терапевтический режим, объединяющий подход «Каранахан» и *in situ* вакцинацию CpG/αOX40	На последней стадии исследования терапевтический режим введения антител корректируют относительно полученных данных о значениях популяций клеток в крови экспериментальных мышей с потенциальными цитолитическими свойствами и клеток, способных к нетозу.	Ноябрь 2022 г.

Приложение 2. Краткие результаты первой части исследования. Совмещение подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации активатором маркрофагов GcMAF на модели карциномы Льюис

Эксперимент	**Краткий результат**
1) оценка основных параметров подхода «Каранахан» для выбранной экспериментальной модели	
Определение содержания дзОСК в опухоли	В опухоли карциномы Льюис содержится 8% ДНК-захватывающих опухолевых стволовых клеток (дзОСК).
Анализ репаративного цикла в клетках опухоли	Продолжительность репаративного цикла клеток карциномы Льюис после обработки кросслинкирующим цитостатиком составляет 30 часов. Максимальное число двуцепочечных разрывов наблюдается через 18 часов после воздействия кросслинкирующим цитостатиком.
Анализ клеточного цикла опухолевых клеток карциномы Льюис после трехкратной обработки цитостатиком	Синхронизация клеток карциномы Льюис в G2/M фазе клеточного цикла происходит на 4 сутки или спустя 96 ч после первой обработки кросслинкирующим цитостатиком – это время финальной обработки кросслинкирующим цитостатиком
Терапевтическая схема подхода «Каранахан» для карциномы лёгкого Льюис включает в себя три инъекции цитостатика циклофосфамида (ЦФ) с интервалом 28 часов между инъекциями, четвертая финальная обработка цитостатиком проводится на 4 сутки или спустя 96 часов после первой обработки. Препарат dsDNAmix вводится спустя 18 часов после каждой обработки цитостатиком ЦФ.	
2) характеристика противоопухолевого действия подхода «Каранахан» на выбранной экспериментальной модели	
Эксперимент №1	В наиболее показательных экспериментах удалось достичь полной длительной ремиссии 70% (в случае с одной опухолью) и 60% (в случае с двумя опухолями) экспериментальных животных.
Эксперимент №2	
Эксперимент №3	
Эксперимент №4	
3) характеристика противоопухолевого действия *in situ* вакцинации на выбранной экспериментальной модели	

Эксперимент №5	GcMAF, используемый в монорежиме, не в состоянии индуцировать опухоль-реактивное/опухоль-нейтральное состояние клеток опухоль-ассоциированной стромы (ОАС), что выражалось в отсутствии торможения роста экспериментальной опухоли. В пилотном режиме объединения подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации препаратом GcMAF, используя четырехкратные инъекции GcMAF на фоне обработок согласно подходу «Каранахан», удалось увидеть позитивные изменения в терапии карциномы Льюис.
ПМФ+кондиционная среда от В-лимфомы	Активированные GcMAF перитонеальные макрофаги (ПМФ) в результате действия факторов кондиционной среды от культуры клеток В-лимфомы теряют свою фагоцитарную активность.
ПМФ+лизаты опухоли мышей, леченных согласно подходу «Каранахан»	Обработка ПМФ лизатом опухоли после воздействия согласно подходу «Каранахан» приводит к глубокой, необратимой анергии ПМФ мыши. Единичные обработки GcMAF до или после инкубации с лизатом опухоли не в состоянии преодолеть индуцированную анергию макрофагов. Обнаружено, что массированная обработка ПМФ GcMAF позволяет избежать индукции анергии фагоцитов и восстановить фагоцитарную активность макрофагов
4) оценка аддитивного/синергичного противоопухолевого действия подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации выбранными факторами	
Эксперимент №6.	С 15 по 27 сутки после начала обработок согласно подходу «Каранахан» в монорежиме, либо совместно с GcMAF, у отдельных мышей наблюдалось обильное выделение гноя из обработанной лапы. В группе «Каранахан»+GcMAF после выделения гноя наблюдалось полное исчезновение опухоли. В группе «Каранахан» после выделения гноя наблюдалось развитие опухоли, повлекшей за собой гибель животных. Скорость развития графта не отличалась между группами «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF и была в 2 раза ниже скорости развития графта в контрольной группе. До 80 суток в группе «Каранахан» дожили две мыши, а в группе «Каранахан»+GcMAF– четыре мыши. К 100 суткам эксперимента выжило и полностью вылечилось от неизлечимой карциномы Льюис 50% животных в группе «Каранахан»+GcMAF и 40% животных в группе «Каранахан». Средняя

	продолжительность жизни животных составила 43 суток в контрольной группе, 85 суток в группе «Каранахан», 95 суток в группе «Каранахан»+GcMAF. Было показано, что комбинация подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации препаратом GcMAF показала синергию с индексом CI=0,35.
Эксперимент №7. (пилотный)	Все основные, выявленные в пилотном исследовании (эксперимент №7), закономерности, повторились в групповом анализе (эксперимент №9) для всех проанализированных клеточных популяций, за исключением MDSC. Количество хелперных Т-лимфоцитов увеличивается в опухоли и селезенке в группах «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF по сравнению с контрольной группой. Появляется незначительное количество регуляторных Т-лимфоцитов в селезенке в обеих экспериментальных группах. GcMAF стимулирует рост числа цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови и практически все CD3+CD8+ клетки являются цитотоксическими Т-лимфоцитами. Количество NK-клеток увеличивается в мононуклеарной фракции крови в обеих экспериментальных группах, существенное возрастание NK-клеток наблюдается в селезенке в группе «Каранахан»+GcMAF. Количество дендритных клеток снизилось в обеих экспериментальных группах. Для обеих проанализированных популяций MDSC (моноцитарная фракция и гранулоцитарная фракция) в эксперименте №9 детектируется существенная статистически значимая редукция популяций клеток с маркерами CD11b+Ly-6C+ и CD11b+Ly-6G+ в группе «Каранахан»+GcMAF. Этот результат единственный существенно отличающийся от первичной иммунограммы, где количество MDSC увеличивается (Эксперимент №7). ПМФ, выделенные из мышей, обработанных по схеме «Каранахан»+GcMAF, лизируют опухолевые клетки карциномы Льюис. ПМФ, выделенные из мышей обеих экспериментальных групп, в первые сутки после выделения обладают высокой фагоцитирующей активностью, на следующие сутки ПМФ из группы «Каранахан»+GcMAF сохраняют фагоцитирующую активность на прежнем уровне, а ПМФ из группы «Каранахан» теряют активность.
Эксперимент №9. (статистический)	

Эксперимент №10.	Обработки экспериментальных животных согласно подходам «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF стимулируют увеличение числа клеток с маркерами CD11b+Ly-6C+ в популяции ПМФ.
Анализ событий, произошедших в популяции клеток ОАС в результате применения подхода «Каранахан» в монорежиме и в комбинации с GcMAF	В результате обработок по схемам «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF происходят изменения с клетками ОАС с минимальной возможностью хемоаттракции ПМФ в ОАС. В обеих экспериментальных группах произошла М1 реполяризация опухоль-ассоциированных макрофагов. GcMAF обладает аддитивным эффектом, его введение в терапию согласно подходу «Каранахан» приводит к снижению процента клеток с характерным фенотипом CD11b+Ly-6C+, а также к снижению синтеза мРНК генов двух супрессоров TGF-β1 и Arg1 и не отменяет повышенную экспрессию NOS2, что характеризует изменения в ОАС как М1 реполяризацию.

Приложение 3. Краткие результаты второй части исследования. Совмещение подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации антителами к OX40R на модели В-клеточной лимфомы А20

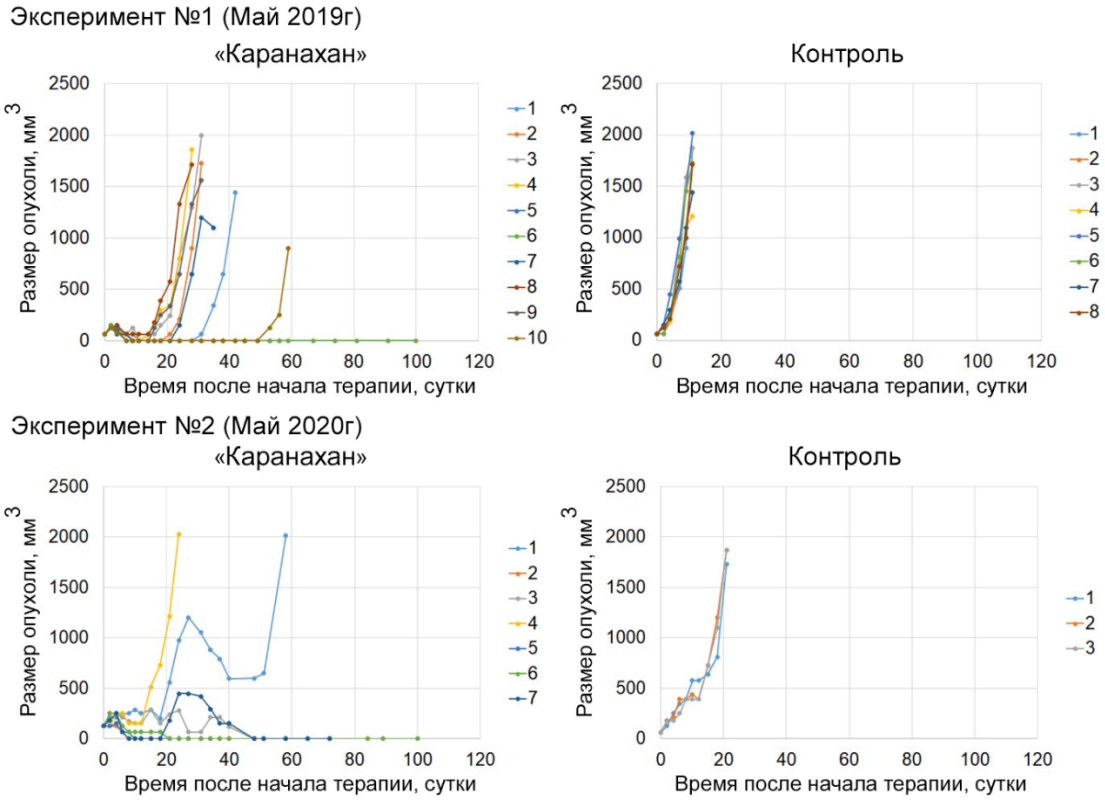
Эксперимент	**Краткий результат**
1) оценка основных параметров подхода «Каранахан» для выбранной экспериментальной модели	
Определение содержания дзОСК в культуре опухолевых клеток	В опухоли В-клеточной лимфомы А20 содержится 0,4% дзОСК
Анализ репаративного цикла в опухолевых клетках	Продолжительность репаративного цикла клеток В-клеточной лимфомы А20 после обработки кросслинкирующим цитостатиком составляет 54 часа. Максимальное число двуцепочечных разрывов наблюдается через 48 часов после воздействия кросслинкирующим цитостатиком.
Анализ клеточного цикла опухолевых клеток В-клеточной лимфомы А20 после трехкратной обработки цитостатиком	Синхронизация клеток В-клеточной лимфомы А20 в G2/M фазе клеточного цикла происходит на 7 сутки или спустя 168 ч после первой обработки кросслинкирующим цитостатиком – это время финальной обработки кросслинкирующим цитостатиком
Терапевтическая схема согласно подходу «Каранахан» для В-клеточной лимфомы А20 включает в себя три инъекции цитостатика ЦФ с интервалом 54 часа между инъекциями, четвертая финальная обработка цитостатиком проводится на 7 сутки или спустя 168 часов после первой обработки. Препарат dsDNAmix вводится спустя 48 часов после каждой обработки цитостатиком ЦФ.	
2) характеристика противоопухолевого действия подхода «Каранахан» на выбранной экспериментальной модели	
Эксперимент №1	В группе «Каранахан» наблюдалась полная регрессия развивающихся трансплантатов на 5 сутки от начала терапии. На 33-40 сутки у 60%

	животных наблюдалось развитие рецидивов, отмечалась в среднем 6-кратная задержка роста как обработанной опухоли, так и необработанного удаленного трансплантата по сравнению с контрольной группой. На 80-е сутки от начала терапии у 20% выживших животных опухоли в любой форме не обнаруживалось. Средняя продолжительность жизни составила 23 и 61 суток в контрольной и экспериментальной группах, соответственно. Был сделан вывод как о развитии локального врожденного иммунитета или прямой цитотоксичности проведенной обработки, так и о развитии адаптивного иммунного ответа.
3) характеристика противоопухолевого действия *in situ* вакцинации на выбранной экспериментальной модели	
Эксперимент №1	В группе «αOX40+CpG» наблюдалась высокая эффективность терапии только для обработанных опухолей. Опухоли полностью регрессировали и не вызывали рецидивов в 100% случаев. Удаленный необработанный трансплантат показал двукратную задержку темпов роста по сравнению с контрольной группой. Средняя продолжительность жизни животных из группы «αOX40+CpG» была почти в два раза выше по сравнению с контрольной группой. Был сделан вывод о развитии локального врожденного иммунного ответа, полной активации адаптивного иммунитета не произошло.
4) оценка аддитивного/синергичного противоопухолевого действия подхода «Каранахан» и *in situ* вакцинации выбранными факторами	
Эксперимент №2 Эксперимент №3	В группах «Каранахан» и «Каранахан»+αOX40 (0ч) наблюдалась полная регрессия развивающихся трансплантатов на 7-10 сутки от начала терапии. На 28-34 сутки наблюдалось развитие рецидивов. В конечной точке эксперимента у 70% животных развились рецидивы. При этом в среднем скорость развития необработанного графта в экспериментальных группах была в 7-8 раз ниже скорости развития графта в контрольной группе. Средняя продолжительность жизни животных из групп «Каранахан» и «Каранахан»+αOX40 (0ч) была в 2,3 и 2 раза выше по сравнению с контрольной группой, соответственно. В группе «Каранахан»+αOX40 (5ч) к 8 суткам эксперимента у 90% животных наблюдалась полная регрессия развивающихся трансплантатов, однако на 10-11 сутки все животные пали практически

	одновременно. Причиной массовой смерти была индукция системной воспалительной реакции и полиорганной недостаточности.
Анализ клеточных популяций крови мышей, обработанных согласно подходу «Каранахан».	Спустя 5 часов после первой, второй и четвертой обработок препаратом dsDNAmix согласно подходу «Каранахан» наблюдался выброс в кровь клеток миелоидного ряда CD11b+Ly-6C+/Ly-6G+. Минимальное количество клеток миелоидного ряда CD11b+Ly-6C+/Ly-6G+ детектировалось после третьей обработки препаратом dsDNAmix и находилось на уровне единичных клеток. 100% CD11b+Ly-6C+/ CD11b+Ly-6G+ клеток несут на своей поверхности FcR. При обработке мышей согласно подходу «Каранахан» значительно возрастает процентное содержание CD11b+Ly-6C+/ CD11b+Ly-6G+ клеток, несущих на своей поверхности OX40R. CD11b+Ly-6C+OX40R+: 3% – в крови интактных мышей, 1,2% – в крови контрольных мышей и 20% – в крови мышей, обработанных согласно подходу «Каранахан»; CD11b+Ly-6G+OX40R+: 5,4% – в крови интактных мышей, 2,9% – в крови контрольных мышей и 21,7% – в крови мышей, обработанных согласно подходу «Каранахан». После первой обработки согласно подходу «Каранахан» количество клеток CD11b+Ly-6G+, формирующих нейтрофильные ловушки, увеличивается в 5 раз, а после четвертой обработки – в 2,2 раза по сравнению с контрольными мышами.
Эксперимент №4	Была выбрана терапевтическая схема, где αOX40 вводились в третью временную точку (167 часов), в которой детектировалось минимальное количество клеток, способных активровать CBP, и во временнную точку предсказанного минимума клеток – 335 часов (спустя 114 часов после 4-ой обработки, по аналогии с наступлением минимума спустя 114 часов после 1-ой обработки). При обработке мышей согласно подходу «Каранахан» в режиме монотерапии наблюдалась полная регрессия опухолей на 5 сутки от начала терапии. Затем начиная с 18 суток наблюдалось развитие рецидивов у 83% мышей. При обработке мышей согласно подходу «Каранахан» совместно с антителами αOX40 наблюдалась полная регрессия опухолей на 12 сутки от начала терапии. Затем начиная с 25 суток наблюдалось развитие рецидивов у 37% мышей.

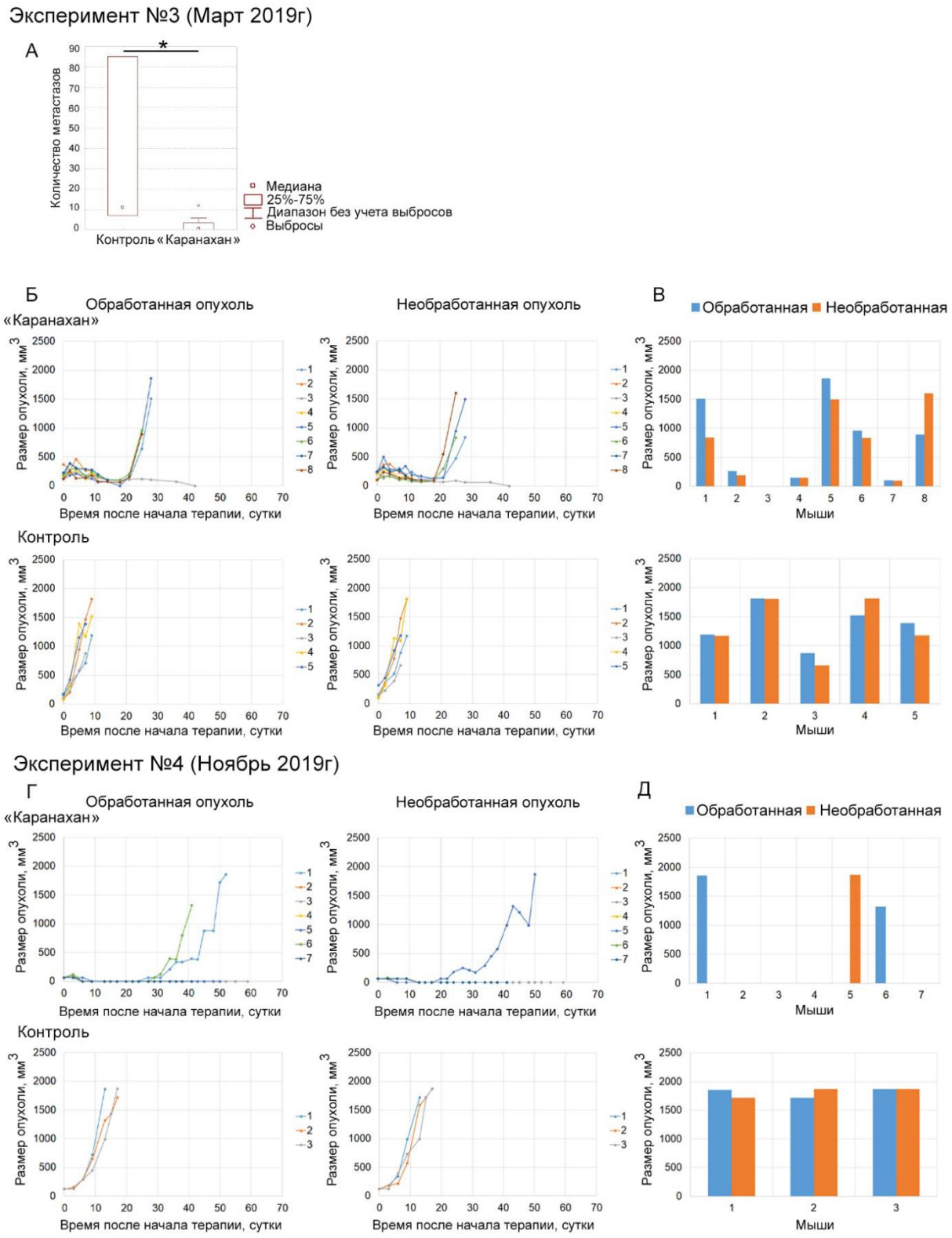
	Средняя продолжительность жизни животных, обработанных согласно подходу «Каранахан» совместно с антителами αOX40, составляла 75 суток, что в 3,4 раза больше, чем в контрольной группе, и в 1,2 раза больше, чем в группе, обработанной согласно подходу «Каранахан» в режиме монотерапии. К 100 суткам эксперимента выжило и полностью вылечилось от В-клеточной лимфомы 50% животных в группе «Каранахан»+αOX40 и 17% животных в группе «Каранахан». В среднем скорость развития графта в экспериментальных группах была в 5 раз ниже скорости развития графта в контрольной группе.

Приложение 4. Оценка эффективности подхода «Каранахан» на модели карциномы Льюис с прививкой графта в одну лапу. Эксперименты №1 и №2



Оценка эффективности подхода «Каранахан» на модели карциномы Льюис с прививкой графта внутримышечно в одну заднюю лапу в мае 2019 г. и мае 2020 г. На графиках представлена динамика роста опухолей индивидуально по мышам.

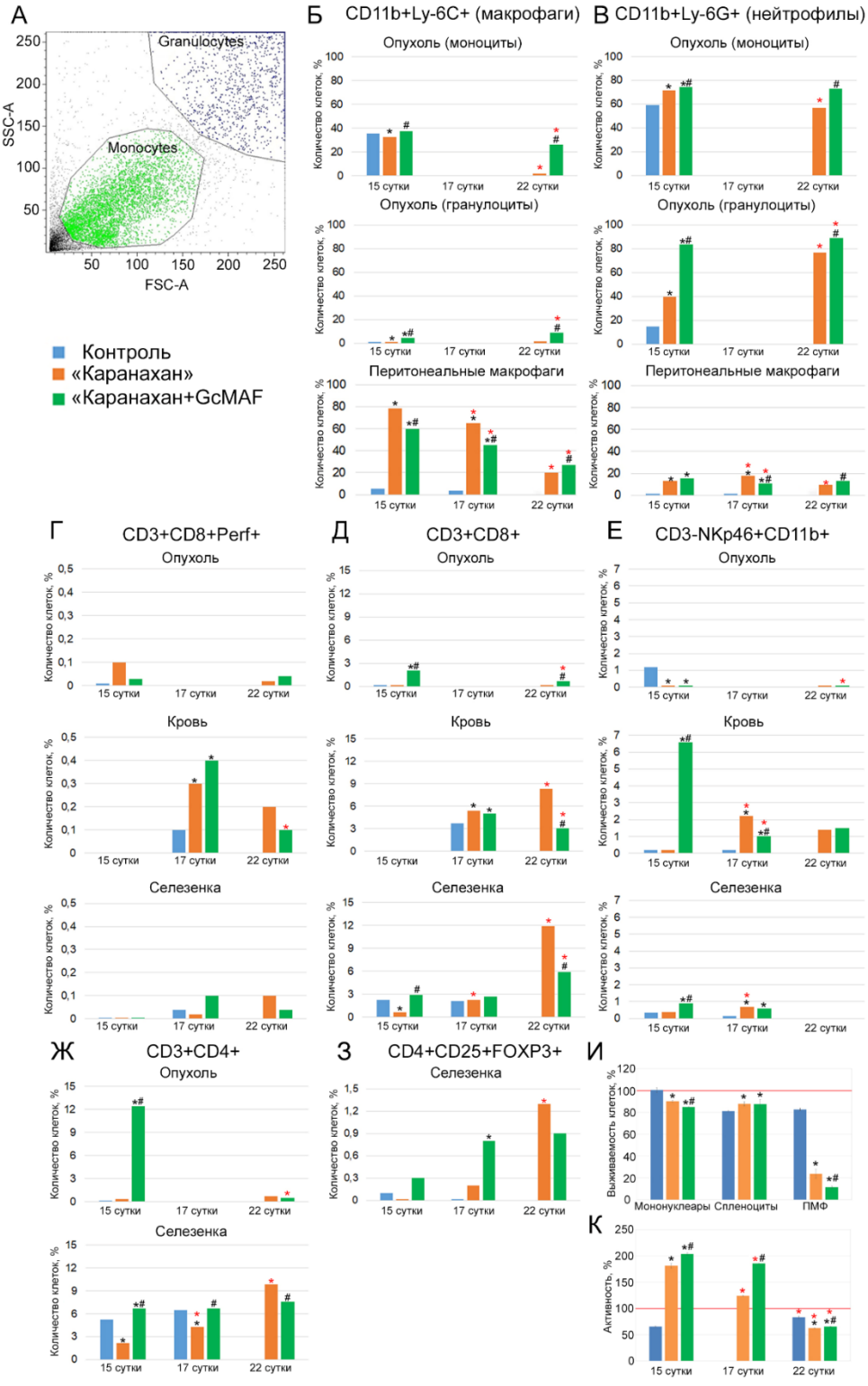
Приложение 5. Оценка эффективности подхода «Каранахан» на модели карциномы Льюис с прививкой графта в две лапы. Эксперименты №3 и №4



Оценка эффективности подхода «Каранахан» на модели карциномы Льюис на мышах с прививкой графта внутримышечно в обе задние лапы. А) Количество метастазов в контрольной и экспериментальной группах. * – разница между экспериментальной группой (группа

«Каранахан») и контрольной группой статистически значима, $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни). Б и Г) Динамика роста обработанных и необработанных опухолей индивидуально по мышам в экспериментальной и контрольной группах. В и Д) Сравнение размера обработанной и необработанной опухолей в конечной точке эксперимента индивидуально по мышам в каждой группе.

Приложение 6. Оценка развития иммунного ответа, индуцированного проведенным лечением согласно подходу «Каранахан» и согласно подходу «Каранахан» в сочетании с *in situ* вакцинацией препаратом GcMAF у мышей с карциномой Льюис. Пилотное исследование. Эксперимент №7



Оценка развития иммунного ответа, индуцированного проведенным лечением согласно подходу «Каранахан» и согласно подходу «Каранахан» в сочетании с *in situ* вакцинацией

препаратом GcMAF, у мышей с карциномой лёгкого Льюис. Мыши с привитой опухолью Льюис были обработаны согласно подходу «Каранахан» в монорежиме и в сочетании с препаратом GcMAF – «Каранахан»+GcMAF. На 15, 17 и 22 сутки после начала терапии, используя наборы специфических антител, проводили анализ клеток опухоль-ассоциированной стромы, популяций иммунных клеток селезенки, мононуклеаров крови и перитонеальных макрофагов (ПМФ). На 15 и 22 сутки из обеих групп отбирались мыши с остаточными детектируемыми опухолями. На 17 сутки из обеих экспериментальных групп отбирались мыши с полностью редуцированными опухолями, поэтому анализ опухоль-ассоциированной стромы в этой точке не проводился. На 31 сутки был проведен анализ активности перитонеальных макрофагов. В примененном подходе главной задачей было определение направления иммунного ответа. Одновременно анализировались 6 клеточных популяций по 11 специфическим маркерам. В связи с технической сложностью исследования (в случае первичной иммунограммы) в каждой временной точке в анализ были взяты по одному животному из каждой группы. Анализ данных, полученных в исследовании, был проведен по следующей логической схеме. Было проведено сравнение: 1) между популяциями клеток в группах (отличие леченных мышей от нелеченных, леченных с использованием различных подходов); 2) одной и той же популяции в разных временных точках в одной группе и в сравнении между группами (изменение активности анализируемой популяции клеток на временном интервале); 3) одной и той же популяции клеток в разных анализируемых анатомических структурах (опухоль vs селезенка; опухоль vs перитонеальные макрофаги) в одной группе и в сравнении между группами; 4) в отдельных экспериментах была оценена цитолитическая противоопухолевая (против клеток карциномы Льюис) активность мононуклеаров крови, спленоцитов, перитонеальных макрофагов; 5) был проведен анализ состояния клеточных популяций в зависимости от наличия или отсутствия остаточной опухолевой ткани. В этой части анализа было выявлено, что остаточная опухоль не влияет на динамику изменений в анализируемых популяциях. Главным фактором видимых изменений является время после проведения терапии. A-B) ***MDSC.*** В опухоли были четко представлены моноцитарная и гранулоцитарная субпопуляции клеток. *Опухоль, моноцитарная фракция.* На 15 сутки от начала эксперимента количество CD11b+Ly-6C+ макрофагов одинаково в обеих экспериментальных группах и контрольной группе и составляет ~35%. На 22 сутки в группе «Каранахан» количество клеток с указанным фенотипом резко падает до минимального 1%. Количество клеток с фенотипом CD11b+Ly-6G+ также сократилось, но менее существенно, с 72% до 58%. В группе «Каранахан»+GcMAF на 22 сутки количество клеток с фенотипом CD11b+Ly-6C+ незначительно снижается до ~28%. Количество CD11b+Ly-6G+ клеток в анализируемой субпопуляции практически не изменилось и составило ~75%. *Опухоль, гранулоцитарная фракция.* Количество обеих популяций превышает значения в контрольной

группе. Для CD11b+Ly-6C+ в группе «Каранахан» за время наблюдения происходит увеличение значения с 0,5% до 1,75%, для CD11b+Ly-6G+ с 40% до практически 80%. Для группы «Каранахан»+GcMAF макрофагальное звено CD11b+Ly-6C+ резко возрастает с 4,2% до 9%. Популяция CD11b+Ly-6G+ нейтрофилов в первый день измерения уже достигает 85% и дополнительно возрастает до 90% при измерении на 22 сутки. Резко выросшее количество нейтрофилов, как предполагается, свидетельствует о выраженном хемотаксисе этих клеток к опухолевому очагу. По-видимому, именно это явление проявилось в нагноении очага опухоли, отхода некротических опухолевых масс и полной резорбции опухоли для группы «Каранахан»+GcMAF (но не в случае монотерапии «Каранахан»), как это было отмечено в витральных тестах. В проведенном эксперименте полученные результаты свидетельствуют, что GcMAF последовательно увеличивает количество гранулоцитов популяции CD11b+Ly-6C+ клеток в двух временных точках. Субопуляция гранулоцитов в популяции нейтрофилов CD11b+Ly-6G+ уже на 15 сутки достигает в группе «Каранахан» ~ 40% и группе «Каранахан»+GcMAF 85% против 10% в контрольной группе, и дополнительно увеличивается к 22 дню до 78% в группе «Каранахан» и 90% в группе «Каранахан»+GcMAF. Этот факт и данные по характеру лизиса опухоли предполагают, что GcMAF может индуцировать масштабное появление в опухоли опухоль-реактивных нейтрофилов. *Перитонеальные макрофаги.* Отдельно были проанализированы перитонеальные макрофаги как популяция клеток, образующая иммунный барьер вне системы циркуляции. Распределение поверхностных маркеров в популяции перитонеальных клеток выглядит следующим образом. На 15 сутки от начала эксперимента количество перитонеальных макрофагов CD11b+Ly-6C+ у леченых мышей составляет 80% и 60% и постепенно снижается до 65% и 48% на 17 сутки и 20% и 28% на 22 сутки эксперимента для групп «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF, соответственно. В контроле эти клетки составляют ~5% на 15-17 сутки и совсем не детектируются на 22 сутки. Относительное содержание перитонеальных CD11b+Ly-6G+ нейтрофилов в контрольной группе было минимальным. Тогда как в экспериментальных группах субпопуляция CD11b+Ly-6G+ нейтрофилов среди перитонеальных клеток находится на уровне 10-20% и практически не меняется в динамике наблюдения. Г-Д) ***CD8+Perf+ цитотоксические Т- лимфоциты.*** Количество CD3+CD8+Perf+ клеток в опухоли в группе «Каранахан» составляло ~0,1% против 0,01% в контрольной группе, в популяции мононуклеаров эта популяция клеток была оценена на 17 сутки и составила 0,3% против 0,1% в контрольной группе и в селезенке 0,02% против 0,04% в контрольной группе. На 22 сутки в опухоли процентное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов в анализируемой группе снизилось до 0,01%; во фракции мононуклеаров содержание CD3+CD8+Perf+ клеток снизилось до 0,2% и в селезенке выросло до 0,1%. Для группы «Каранахан»+GcMAF были получены следующие значения. Количество

CD3+CD8+Perf+ клеток в опухоли на 15 сутки эксперимента составляло ~0,03% против 0,01% в контрольной группе. В популяции мононуклеаров эта популяция клеток была оценена на 17 сутки и составила 0,4% против 0,1% в контрольной группе. В селезенке произошло резкое увеличение числа клеток этой популяции до 0,1% против 0,04% в контрольной группе. На 22 сутки в опухоли процентное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов увеличилось до 0,04%; во фракции мононуклеаров содержание CD3+CD8+Perf+ клеток снизилось до 0,1%, и в селезенке также произошло снижение значения показателя до 0,04%. Анализ между экспериментальными группами свидетельствует о разнонаправленной динамике изменения содержания цитотоксических Т-лимфоцитов в опухоли и селезенке и однонаправленной динамике изменения в популяции мононуклеаров крови. В опухоли на 15 сутки высокое значение для группы «Каранахан» падает на 22 сутки эксперимента. В группе «Каранахан»+GcMAF происходит увеличение CD3+CD8+Perf+ клеток к 22 суткам. В селезенке наоборот, в группе «Каранахан» происходит пятикратное увеличение показателя от 17 суток до 22 суток от начала эксперимента. Для группы «Каранахан»+GcMAF, наоборот, содержание клеток существенно падает к 22 суткам. Такие изменения свидетельствуют, что скорость формирования киллерных клеток в опухоли в группе «Каранахан» более высокая по сравнению с группой «Каранахан»+GcMAF. В селезенке, наоборот, в группе «Каранахан»+GcMAF на 17 сутки наблюдается более высокий процент CD3+CD8+Perf+ клеток, чем в группе «Каранахан», что свидетельствует о более раннем начале развития адаптивного иммунитета. Можно полагать, что определенное незначительное количество CD3+CD8+Perf+ клеток возникает в опухоли в процессе *in situ* обработки и распространяется с кровью, достигает селезенки и других структур организма. Динамика изменения показателя во фракции мононуклеаров крови для обеих экспериментальных групп свидетельствует о том, что ко второй временной точке цитотоксические Т-лимфоциты формируются и активно распространяются. Представляет интерес анализ количества клеток популяции CD3+CD8+ лимфоцитов. Это наивные цитотоксические Т-лимфоциты и их количество также характеризует развивающийся адаптивный иммунитет. На 15 сутки незрелые CD3+CD8+ клетки в опухоли присутствуют в одинаковом количестве как в контрольной группе, так и у экспериментального животного группы «Каранахан», и составляют ~ 0,2%. Количество клеток не изменяется на протяжении 7 суток эксперимента. В крови количество клеток с указанными маркерами составляет 6% против 4% в контрольной группе во второй временной точке и возрастает до 9% в третьей временной точке. В селезенке наблюдается следующая картина распределения указанной популяции клеток. На 15 сутки от начала эксперимента она составляет 0,6% против 2,2% в контрольной группе, на 17 сутки – 2,1% против 2,2% в контрольной группе и на 22 сутки – 12%. Для группы «Каранахан»+GcMAF на 15 сутки количество CD3+CD8+ лимфоцитов в опухоли составляет 2%, что в 10 раз больше, чем в

контрольной группе и в группе «Каранахан». К 22 дню показатель падает до 0,7%. В крови количество клеток с указанными маркерами на 17 сутки составляет 5% против ~ 4% в контрольной группе и снижается на 22 сутки до 3%. В селезенке идет постепенное увеличение значения показателя и к 22 дню достигает 6%. Следуя полученным данным, можно полагать, что для группы «Каранахан» основное количество праймированных CD3+CD8+ клеток возникает не в опухоли, а, по-видимому, классическим путем, после миграции активированных дендритных клеток в лимфатические узлы. Для группы «Каранахан»+GcMAF в опухоли присутствует 2% незрелых CD8+ Т-лимфоцитов. Можно предположить, что GcMAF индуцирует макрофаги к секреции хемокинов, в результате чего Т-клетки рекрутируются в очаг опухолевого роста, где праймируются *in situ* активированными дендритными клетками. После праймирования незрелые CD3+CD8+ клетки мигрируют в селезенку к 22 суткам от начала эксперимента, где их количество возрастает в 20 раз до 12% для группы «Каранахан» и в 2 раза до 6% для группы «Каранахан»+GcMAF. Этот факт является основным признаком становления адаптивного иммунного ответа при обработке согласно подходу «Каранахан», который не разрушается добавлением в терапию препарата GcMAF. Е) ***Натуральные киллеры.*** В очаге опухолевого роста леченных мышей эта популяции клеток практически отсутствует, при этом в контрольной группе содержание CD3-NKp46+CD11b+ натуральных киллеров составляет 1,2% (как предполагается, анергированные клетки). В популяции мононуклеаров крови в группе «Каранахан» содержание натуральных киллеров от 0,2% на 15 сутки возрастает до 2% на 17 сутки и несколько снижается (до 1%) на 22 сутки эксперимента. В популяции спленоцитов количество зрелых натуральных киллеров увеличивается с 0,4% до 0,6% на 15 и 17 сутки, соответственно. Для группы «Каранахан»+GcMAF характерно значительное увеличение натуральных киллеров в периферической крови до 7% на 15 сутки с последующим снижением до ~1% на 17 и 22 сутки. В селезенке количество натуральных киллеров достигает 0,9% на 15 сутки и снижается до 0,6% на 17 сутки эксперимента. Высокий процент натуральных киллеров в крови предполагает их активное противоопухолевое действие на диссеминирующие опухолевые клетки. Ж) ***Хелперные Т-лимфоциты.*** Для группы «Каранахан» в опухоли достоверного изменения количеств клеток указанной популяции не наблюдается на 15 и 22 дни эксперимента и составляет 0,9% (15 сутки) и 2,7% (22 сутки) против 0,5% в контрольной группе на 15 сутки эксперимента. В селезенке наблюдается последовательное увеличение количества CD3+CD4+ клеток от ~2% (15 сутки), ~4% (17 сутки), и до ~11% на 22 сутки от начала эксперимента. Для группы «Каранахан»+GcMAF на 15 сутки в опухоли процент клеток этого типа достигает 12% и падает до 1,4% на 22 сутки. В селезенке значительных изменений параметра не происходит. Процент клеток находится между 5% и 7%. Этот тип клеток отвечает за вторичную активацию и созревание эффекторных клеток. Значительное увеличение этой популяции в опухоли в группе с введением GcMAF может

свидетельствовать об активации опухоль-ассоциированных макрофагов, которые, получив антиген, индуцируют развитие и амплификацию хелперных Т-лимфоцитов. З) ***регуляторные Т-лимфоциты.*** В очаге опухолевого роста в группе «Каранахан» CD4+CD25+FOXP3+ клетки не обнаруживаются на протяжении всего времени наблюдения. В селезенке мышей группы «Каранахан» указанная популяция клеток появляется на 17 сутки эксперимента (0,01%) и возрастает до 1,2% к 22 дню. В контрольной группе определяется количество клеток на уровне погрешности прибора. Для группы «Каранахан»+GcMAF ситуация отличается. В опухоли на 22 сутки эксперимента появляются незначительное количество (0,06%) CD4+CD25+FOXP3+ клеток. В селезенке этот тип клеток определяется в возрастающем количестве на 15, 17 и 22 сутки: 0,3%, 0,7% и 0,9%, соответственно. Факт появления регуляторных Т-лимфоцитов в селезенке свидетельствует о включении механизмов feed-back контроля, блокирующих чрезмерную эскалацию активированных иммунных реакций в обеих экспериментальных групп. Черная * – различие с контролем; красная * – различие с предыдущим или последующим днем забора образцов; # – различия между экспериментальными группами «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF. Все отмеченные сравнения являются статистически значимыми, $p \leq 0{,}001$ (χ^2-тест). И) ***Оценка цитолитической активности популяций клеток мононуклеаров крови, спленоцитов, перитонеальных макрофагов (ПМФ) против клеток карциномы Льюис в МТТ-тесте.*** На 17 сутки клетки анализируемых популяций и таргетные клетки опухоли Льюис смешивали в соотношении 1/2 и инкубировали в течение 24 часов. Показано, что мононуклеары крови и спленоциты обладают незначительной цитолитической активностью по отношению к опухолевым клеткам-мишеням и лизируют 10% и 20% опухолевых клеток, соответственно, для группы «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF. Было найдено ярко выраженное противоопухолевое действие перитонеальных макрофагов обеих экспериментальных групп мышей. Через 6 суток после полной обработки согласно подходу «Каранахан» около 80% опухолевых клеток лизировались согласно результатам МТТ-теста. Наиболее выраженное противоопухолевое действие было выявлено у фагоцитов, выделенных из мыши группы «Каранахан»+GcMAF. 90% опухолевых клеток было лизировано согласно результатам МТТ-теста. На 31 сутки после полной обработки согласно подходу «Каранахан» противоопухолевая активность у перитонеальных макрофагов не детектируется. В группе «Каранахан»+GcMAF сохраняется частичное цитолитическое действие против клеток карциномы Льюис. Полученные результаты, совместно с данными о ярко выраженном увеличении процента CD11b+Ly-6C+ и CD11b+Ly-6G+ клеток в популяции перитонеальных клеток, свидетельствует о высокой литической активности этих клеток против клеток опухоли Льюис. Это предполагает: 1) эффективную противоопухолевую защиту этим звеном иммунитета; 2) фенотипы CD11b+Ly-6C+ и CD11b+Ly-6G+, маркирующие MDSC, не обязательно характеризуют клетки с супрессорной

проопухолевой активностью. Выживаемость клеток опухоли Льюис (без обработок) принята за 100% и обозначена красной линией. Приведено среднее значение ± стандартное отклонение. * – различие с контролем; # – различия между экспериментальными группами «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF. Указанные различия являются статистически значимыми, $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни). К) ***Динамика изменения активности перитонеальных макрофагов (ПМФ).*** Используя МТТ-тест, было определено активированное состояние перитонеальных макрофагов (активность захвата МТТ реагента). Оценивалось изменение способности захватывать МТТ реагент (фагоцитирующая активность) макрофагами в трех контрольных точках. Поскольку перитонеальные макрофаги не делятся, отмеченное увеличение поглощенного МТТ субстрата связано с увеличением поглощающей способности клеток. В контрольной группе не произошло существенного значимого изменения в активности перитонеальных макрофагов. В обеих экспериментальных группах обнаруживается последовательное снижение способности перитонеальных макрофагов захватывать МТТ субстрат. На 31 сутки от начала эксперимента МТТ активность макрофагов падает до активности перитонеальных макрофагов интактных мышей. Активность клеток захватывать МТТ субстрат коррелирует с противоопухолевой цитолитической активностью перитонеальных макрофагов. Активность перитонеальных макрофагов интактного животного без опухоли принята за 100%. Приведено среднее значение ± стандартное отклонение. Черная * – различие с контролем; красная * – различие с предыдущим или последующим днем забора образцов; # – различия между экспериментальными группами «Каранахан» и «Каранахан»+GcMAF. Указанные различия являются статистически значимыми, $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни).