

## ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ОПУХОЛЕВЫЕ АЛЛОАНТИГЕНЫ В УСЛОВИЯХ СОКРАЩЕННОГО КЛОНАЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ Т-КЛЕТОК

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

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

Т-клеточный рецептор (TCR), представляющий собой  $\alpha\beta$ -гетеродимер, предназначен для распознавания пептидных антигенов в комплексе с собственными молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC). При этом значительная доля клонотипов T-клеток обладает аллореактивностью, т. е. способностью взаимодействовать с различными аллельными вариантами MHC и ассоциированными с ними пептидами. В настоящее время нет четкой определенности, зависит ли эффективность аллогенного иммунного ответа от широты репертуара TCR. В данной работе использовали мышь с трансгенной экспрессией  $\beta$ -цепи TCR ( $TCR\beta$ ), что позволило экспериментально сузить разнообразие клонотипов T-клеток. Цель работы — проанализировать развитие ответа  $TCR\beta$ -трансгенных мышей на генетической основе CBA/Lac (H-2<sup>k</sup>) *in vivo* для оценки влияния сужения репертуара на аллогенный иммунный ответ. Показано, что у трансгенных мышей развивается слабый иммунный ответ на трансплантируемые антигены с формированием пула цитотоксических T-клеток, в 1,5–1,7 раза сокращенного по сравнению с животными дикого типа. Вследствие этого отторжение аллогенной опухоли становится невозможным, и наступает гибель 100% животных. Полученные данные согласуются с результатами наших ранних исследований с использованием другой  $TCR\beta$ -трансгенной модели и подтверждают, что снижение разнообразия репертуара TCR ухудшает эффективность ответа на аллоантитела и создает условия для избегания опухолью иммунного ответа и ее прогрессирования в аллогенном реципиенте.

**Ключевые слова:** Т-клетка, Т-клеточный рецептор, аллогенный ответ, сокращение клonalного разнообразия

**Финансирование:** работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-15-00342-П (<https://rscf.ru/project/22-15-00342/>).

**Вклад авторов:** М. С. Короткова — проведение экспериментов, анализ результатов; Н. А. Персиянцева — проведение экспериментов, анализ результатов, редактирование; А. А. Калинина — планирование исследования, анализ и интерпретация результатов, анализ литературы, написание статьи, редактирование; Л. М. Хромых — редактирование; Д. Б. Казанский — планирование исследования, анализ и интерпретация результатов, анализ литературы, редактирование.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России (протокол № ЗП-10.06.2022 от 10 июня 2022 г.) и проведено в строгом соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

 **Для корреспонденции:** Дмитрий Борисович Казанский  
Каширское ш., д. 24, стр. 15, г. Москва, 115478, Россия; kazansky1@yandex.ru

**Статья получена:** 06.10.2025 **Статья принята к печати:** 01.11.2025 **Опубликована онлайн:** 14.11.2025

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2025.057

**Авторские права:** © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## FEATURES OF THE IMMUNE RESPONSE TO TUMOR ALLOANTIGENS IN THE CONTEXT OF DECREASED CLONAL DIVERSITY OF T CELLS

Korotkova MS, Persiyantseva NA, Kalinina AA, Khromykh LM, Kazansky DB 

Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

A T cell receptor (TCR), an  $\alpha\beta$  heterodimer, recognizes peptide antigens presented by self molecules of the major histocompatibility complex (MHC). A significant number of T cell clonotypes are alloreactive: they can interact with various allelic variants of MHC and the associated peptides. Currently, it is unclear whether the effectiveness of the allogeneic immune response depends on the diversity of the TCR repertoire. Seeking to experimentally narrow the diversity of T cell clonotypes, we used mice with transgenic expression of the  $\beta$ -chain TCR ( $TCR\beta$ ) in this work. We analyzed how the  $TCR\beta$ -transgenic mice on the CBA/Lac (H-2<sup>k</sup>) background respond to EL-4 (H-2K<sup>d</sup>) lymphoma cells *in vivo* with the aim to assess the effect of a narrower repertoire on the allogeneic immune response. The study has shown that transgenic mice develop a weak immune response to transplant antigens, and the formed pool of cytotoxic T cells is 1.5–1.7-fold smaller than that in wild-type animals. Consequently, the mice failed to reject the allogeneic tumor, leading to 100% mortality rate. The results of this work are consistent with the data from our earlier studies that employed another  $TCR\beta$ -transgenic model. They confirm that the decreased diversity of the TCR repertoire impairs the response to alloantigens, allowing the tumor to evade the immune response and progress in the allogeneic recipient.

**Keywords:** T-cell, T-cell receptor, allogeneic response, decreased clonal diversity

**Funding:** the study was financially supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-15-00342-П (<https://rscf.ru/project/22-15-00342/>).

**Author contribution:** Korotkova MS — experimental work, analysis of the results; Persiyantseva NA — experimental work, analysis of the results, article editing; Kalinina AA — study planning, analysis and interpretation of the results, analysis of the available literature, article authoring and editing; Khromykh LM — article editing; Kazansky DB — study planning, analysis and interpretation of the results, analysis of the available literature, article editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the N.N. Blokhin National Research Medical Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation (Minutes No. 3-П10.06.2022 of June 10, 2022) and conducted in strict accordance with the provisions of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

 **Correspondence should be addressed:** Dmitry B. Kazansky  
Kashirskoe shosse, 24, str. 15, Moscow, 115478, Russia; kazansky1@yandex.ru

**Received:** 06.10.2025 **Accepted:** 01.11.2025 **Published online:** 14.11.2025

**DOI:** 10.24075/brsmu.2025.057

**Copyright:** © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Т-клеточное звено адаптивного иммунитета характеризуется способностью специфически распознавать антигены посредством высокоспециализированного Т-клеточного рецептора (TKR), представляющего собой  $\alpha\beta$ -гетеродимер в доминирующем типе Т-клеток и имеющего уникальную структуру у каждого индивидуального клонотипа. В результате внутритимусного развития и селекции формируется периферический репертуар TKR, способный эффективно взаимодействовать с собственными молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), презентирующими чужеродный пептид или пептид эндогенного мутантного белка [1]. При этом значительная часть, если не все клоны периферических Т-клеток, аллореактивны [2], т. е. могут реагировать на аллогенные молекулы МНС и ассоциированные с ними пептиды [3–5]. В ответ Т-клеточного репертуара реципиента на индивидуальный аллогенный трансплантат может быть вовлечено до 10% Т-клеток [6].

Аллореактивные Т-клетки — ключевые медиаторы транспланационного иммунитета, которые опосредуют острое отторжение аллотрансплантата [7]. На сегодняшний день имеются противоречивые данные о том, определяет ли разнообразие репертуара TKR интенсивность аллогенного ответа [8]. Так, в ряде работ показано, что исходное высокое разнообразие репертуара TKR реципиента создает повышенный риск острого отторжения аллогенного трансплантата [9, 10]. Между тем было установлено, что в отторжение трансплантата вовлекается узкий олигоклональный репертуар [11–13].

Экспериментальные модели, предполагающие трансплантацию реципиенту опухоли с отличиями по одному транспланционному антигену [14, 15], позволяют исследовать динамику и особенности развития аллогенного иммунного ответа *in vivo*. В результате прямого распознавания аллогенных молекул МНС I класса индуцируется интенсивный цитотоксический CD8<sup>+</sup>-иммунный ответ и происходит быстрое отторжение аллогенной опухоли с формированием иммунологической памяти [14–16]. Для подтверждения ранее полученных нами данных о зависимости эффективности аллогенного иммунного ответа от широты разнообразия репертуара TKP [14] в настоящей работе использовали мышей с трансгенной экспрессией  $\beta$ -цепи TKP (TKP $\beta$ ) гибридомы 7B, описанной ранее [17]. Трансгенез TKP $\beta$  дает возможность экспериментально сокращать разнообразие рецепторов Т-лимфоцитов [14, 18]: в силу правила аллельного исключения экспрессия трансгенной TKP $\beta$  блокирует перестройку генов и, как следствие, экспрессию собственных  $\beta$ -цепей в Т-клетках. В результате доминирующая часть репертуара представлена клонотипами с инвариантной  $\beta$ -цепью, и разнообразие обеспечивается только за счет эндогенных  $\alpha$ -цепей в структуре рецептора.

Цель работы — используя TKP $\beta$ -трансгенную модель, проанализировать развитие иммунного ответа на опухолевые аллоантигены *in vivo* в условиях сокращенного клонального разнообразия Т-клеток.

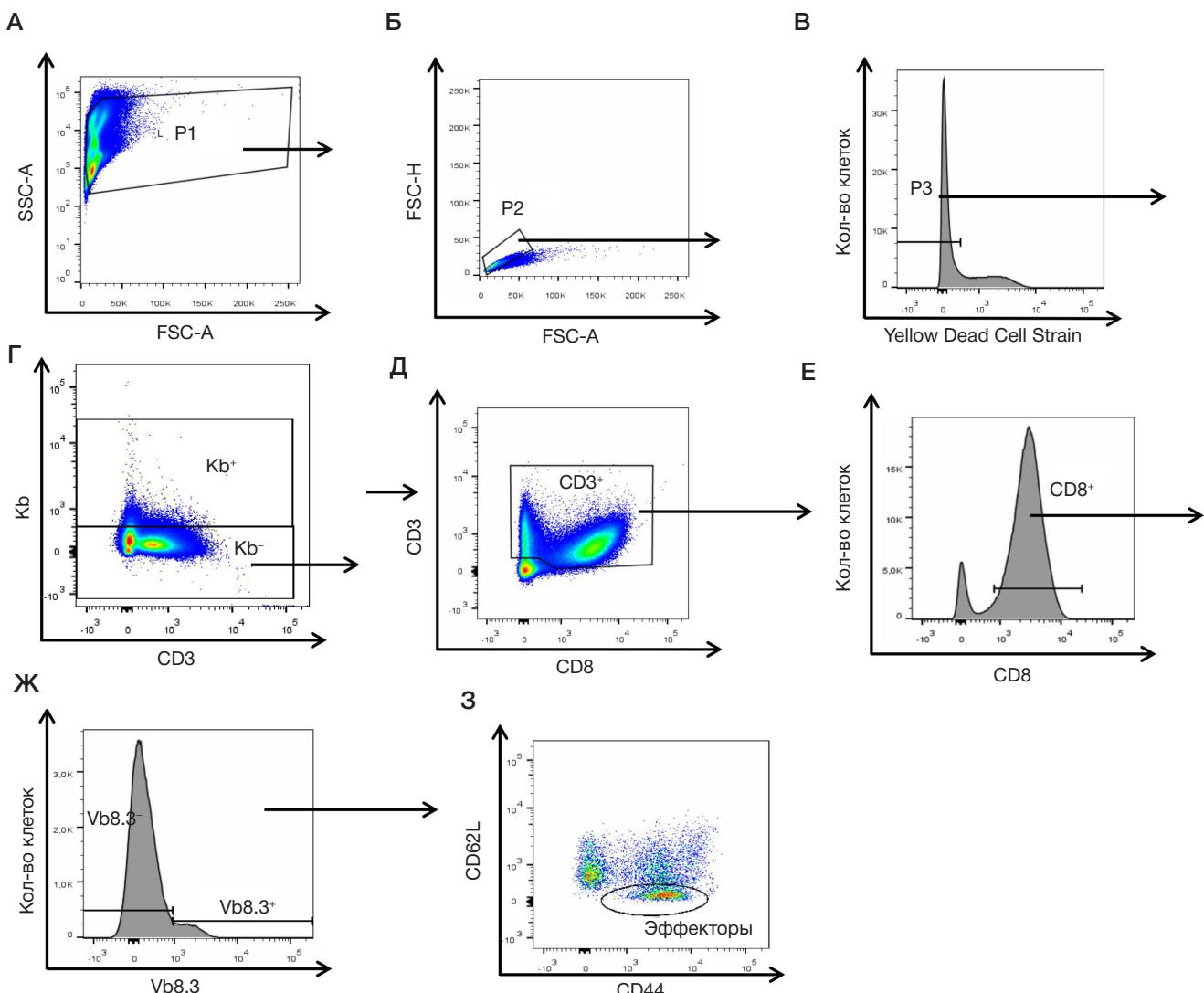
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали самок мышей инбредных линий CBA/Lac (H-2<sup>k</sup>) и C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) (6–8 недель, 18–20 г) и трансгенных мышей 7B из разведения «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России. Трансгенные мыши 7B были получены, как описано ранее [18]. Исходно трансген был переведен на генетическую основу мышей

линии C57BL/6. В связи с ограниченным временем жизни полученных животных, создающим препятствия для их разведения, трансген был переведен на генетическую основу линии CBA/Lac и сохраняется в собственной коллекции лаборатории механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина». Трансгенные мыши 7B характеризуются экспрессией  $\beta$ -цепи TKP, специфичного к мутантной молекуле МНС I класса K<sup>bmt3</sup> и молекуле МНС II класса I-A<sup>b</sup> [17]. Животных содержали при температуре 20–24 °C при 40% относительной влажности, 12-часовом световом режиме и свободном доступе к корму и воде. Трансгенным мышам 7B и контрольным животным (нетрансгенным сибсам, дикий тип) трансплантировали внутрибрюшинно клетки лимфомы EL-4 (H-2K<sup>b</sup>) в дозе  $1 \times 10^6$  клеток/мышь в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) и оценивали продолжительность жизни мышей со сроком наблюдения более 30 дней. Кривые выживаемости Каплана–Майера строили при помощи SRplot [19]. Часть животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации на 12-й день после трансплантации клеток EL-4 и извлекали клетки брюшной полости. Полученные образцы клеток лаважа анализировали методом проточной цитофлуориметрии.

В работе использовали флуоресцентно меченные антитела (BioLegend, США; BD Bioscience, США; BD Horizon, США): CD3 — APC-Cy7, CD8 — Percp-Cy5.5, CD44 — Pacific blue, CD62L — APC, Vb8.3 — PE, Kb — FITC. Пробы клеток ( $0,5\text{--}1 \times 10^6$ ) инкубировали с блокирующими антителами Fc block (клон 2.4G2, BD Pharmingen, США) (10 мин при 4 °C) для предотвращения неспецифического связывания антител, затем окрашивали мечеными антителами (40 мин, 4 °C). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Bioscience) в программе FACSDiva 6.0 (BD Bioscience). Лейкоциты выделяли по показателям прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния с последующим выделением одиночных клеток по показателям FSC-H против FSC-A. Для окрашивания мертвых клеток использовали набор LIVE/DEAD Fixable Yellow Dead Cell Stain (Invitrogen, США). Мертвые клетки исключали из анализа по окрашиванию Yellow Dead Cell Stain и по показателям светорассеяния. Экспрессию поверхностных маркеров оценивали в популяции живых одиночных лейкоцитов. Относительное количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих трансгенную  $\beta$ -цепь TKP, оценивали по окрашиванию анти-Vb8.3 антителами (семейство V $\beta$ , к которому принадлежит трансгенная  $\beta$ -цепь 7B). Относительное количество опухолевых клеток EL-4 в брюшной полости экспериментальных животных определяли по экспрессии молекулы МНС I класса H-2K<sup>b</sup> (Kb). Анализ популяций Т-лимфоцитов проводили после исключения Kb-позитивных клеток. Данные обрабатывали в программе Flow Jo 7.6 (TreeStar Inc., США). Стратегия цитофлуориметрического анализа представлена на рис. 1.

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Статистический анализ проводили с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента, дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорного теста Тьюки (post-hoc Tukey test). Предварительно осуществляли проверку нормальности распределения выборок с использованием теста Колмогорова–Смирнова для подтверждения корректности использования указанных статистических методов. Статистический анализ проводили с использованием онлайн-ресурса SRplot [19]. Различия признавали значимыми при  $p \leq 0,05$ .



**Рис. 1.** Стратегия анализа клеток брюшной полости мышей методом проточного цитофлуориметрии. При анализе проводили последовательное выделение популяций: лейкоцитов по параметрам прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния (П1) (А); одиночных клеток по показателем FSC-H против FSC-A (П2) (Б); живых клеток, негативных по окрашиванию Yellow Dead Cell Stain (П3) (В); клеток EL-4 и лейкоцитов реципиента по анализу ко-экспрессии маркеров Kb и CD3: Kb<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-клетки EL-4 (Kb<sup>+</sup>), Kb<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-клетки реципиента (Kb<sup>-</sup>) (Г). Д. В популяции Kb<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-клеток (Kb<sup>+</sup>) выделяли Т-клетки (CD3<sup>+</sup>) по ко-экспрессии CD3 и CD8 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клетки). Е. В популяции CD3<sup>+</sup>-клеток выделяли цитотоксические CD8<sup>+</sup> T-клетки (CD8<sup>+</sup>). Ж. К. В популяции CD8<sup>+</sup> T-клеток выделяли клетки, экспрессирующие эндогенные β-цепи Т-клеточного рецептора (ТКРβ) (Vb8.3<sup>-</sup>), и клетки с трансгенной ТКРβ (Vb8.3<sup>+</sup>). З. Индивидуально для популяции Vb8.3<sup>-</sup> и Vb8.3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-клеток анализировали ко-экспрессию маркеров CD44 и CD62L и определяли долю (%) эффекторов (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>)

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

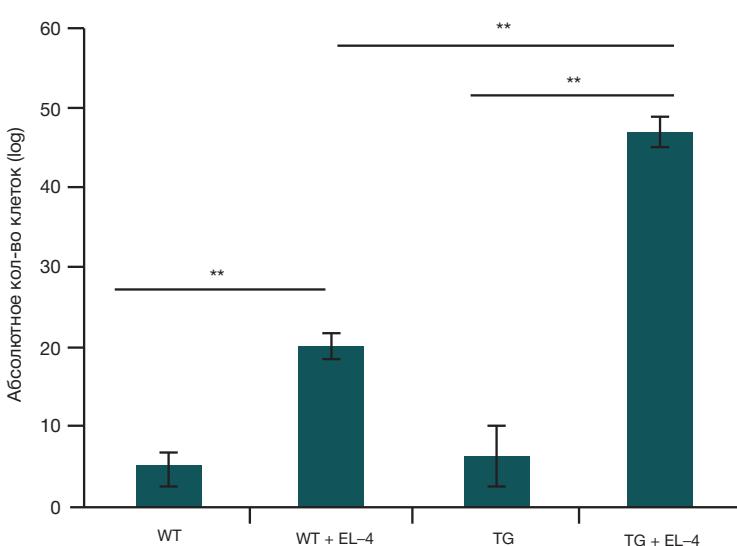
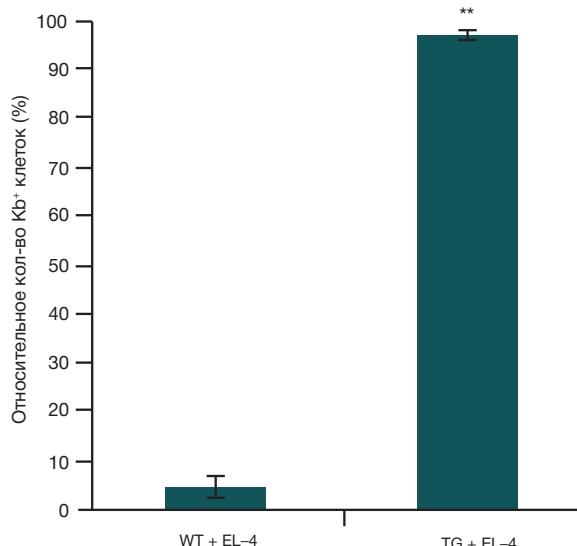
Как было отмечено выше, трансгенез β-цепи ТКР существенно сокращает разнообразие репертуара рецепторов периферических Т-клеток. Для выяснения особенностей функционирования Т-клеточного иммунитета в условиях сниженного разнообразия клонотипов исследовали развитие иммунного ответа трансгенных мышей 7B (H-2<sup>k</sup>) на клетки аллогенной лимфомы EL-4 (H-2K<sup>b</sup>) *in vivo*. Т-лимфоциты по месту локализации опухолевых клеток (в брюшной полости) анализировали на 12-й день после трансплантации EL-4. В норме к этому дню наблюдается пик иммунного ответа цитотоксических Т-клеток на аллоантигены лимфомы EL-4 [14, 16].

В брюшной полости иммунизированных мышей 7B (TG<sup>+</sup>EL-4) было отмечено увеличение абсолютного количества клеток на два порядка по сравнению с интактными (неиммунизированными) трансгенными мышами (TG) и в 20 раз по сравнению с иммунизированными животными дикого типа (WT<sup>+</sup>EL-4) (рис. 2А). Лаваж иммунизированных 7B содержал более 90% клеток EL-4 (Kb<sup>+</sup>), тогда как у

контрольных мышей (WT<sup>+</sup>EL-4) на данном сроке аллогенная опухоль была практически полностью элиминирована, и доля Kb<sup>+</sup>-клеток составила всего 5% (рис. 2Б).

Мыши 7B оказались не способны отторгнуть аллогенную лимфому EL-4, и в среднем через 19 дней наступала гибель 100% трансгенных животных (рис. 3). Стоит при этом отметить, что у 7B наблюдалась более пролонгированная динамика гибели по сравнению с мышами C57BL/6, для которых EL-4 является сингенной и убивает животных за 10–12 дней (рис. 3). Это указывает на то, что у трансгенных мышей 7B ответ на аллогенную лимфому EL-4 проходит через, хоть и недостаточно эффективные, стадии элиминации и равновесия, предшествующие избеганию опухолевыми клетками иммунологического надзора.

Активный иммунный ответ мышей дикого типа на клетки EL-4 (WT<sup>+</sup>EL-4) сопровождался накоплением Т-клеток, относительное количество которых возросло в среднем в 4 раза (рис. 4А, Б), и увеличением доли цитотоксических CD8<sup>+</sup>-клеток в 5 раз по сравнению с интактным контролем (WT) (рис. 4В, Г). Данный эффект не наблюдался у иммунизированных трансгенных мышей

**A****Б**

**Рис. 2.** Особенности развития аллогенной лимфомы EL-4 в трансгенных мышах 7B. Трансгенным мышам 7B ( $H-2^b$ ) трансплантировали внутрибрюшинно клетки аллогенной лимфомы EL-4 ( $H-2K^b$ ) (TG+EL-4). В качестве контроля использовали нетрансгенные сибсов (WT+EL-4). На 12 день после трансплантации EL-4 анализировали клетки брюшной полости методом проточной цитофлуориметрии. **А.** Абсолютное количество (log) клеток. \*\* —  $p \leq 0,01$  (ANOVA, пост-хос-тест Тьюки). **Б.** Относительное количество (%) опухолевых клеток EL-4 ( $Kb^+$ ). \*\* —  $p \leq 0,01$  (непарный  $t$ -критерий Стьюдента). Представлены данные двух независимых экспериментов ( $n = 4-6$ )

(TG+EL-4), и относительное количество Т-лимфоцитов (рис. 4А, Б) и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток (рис. 4В, Г) не было увеличено по сравнению с контрольной группой без иммунизации (TG). Однако стоит отметить, что соотношение CD8<sup>+</sup>-Т-клеток, экспрессирующих трансгенную  $\beta$ -цепь ТКР ( $Vb8.3^+$ ) или эндогенные  $\beta$ -цепи ТКР ( $Vb8.3^-$ ), в брюшной полости иммунизированных 7B (TG+EL-4) составило примерно 1:1 по сравнению с 2:1 в группе контроля (TG) (рис. 4Д, Е), что указывает на вовлечение обеих субпопуляций цитотоксических Т-клеток в ответ на клетки EL-4.

В соответствии с этим у иммунизированных мышей 7B было выявлено увеличение доли эфекторных (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) CD8<sup>+</sup> Т-клеток с трансгенной ТКР $\beta$  в 1,8 раза (рис. 5А, Б) и эфекторных CD8<sup>+</sup> Т-клеток с эндогенными ТКР $\beta$  в 1,5 раза (рис. 5В, Г) по сравнению с соответствующими субпопуляциями CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> Т-клеток интактных трансгенных мышей (TG). Между тем, относительное количество  $Vb8.3^+$  и  $Vb8.3^-$  CD8<sup>+</sup> эфекторов в брюшной полости иммунизированных трансгенных мышей (TG+EL-4) было в 1,5–1,7 раза ниже по сравнению с иммунизированными животными дикого типа (WT+EL-4) (50–56% против 84–86%) (рис. 5).

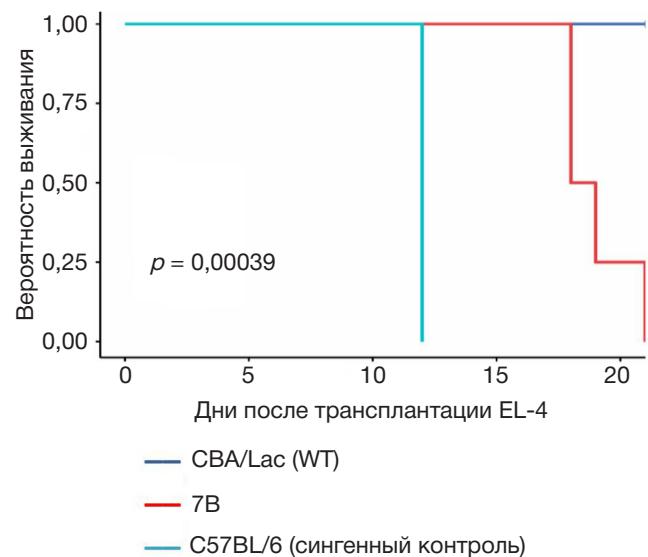
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты настоящего исследования указывают на развитие слабого иммунного ответа *in vivo* на аллоантигены у трансгенных мышей 7B с формированием небольшого пула эфекторных цитотоксических Т-клеток, что согласуется с данными нашей ранней работы с использованием другой ТКР $\beta$ -трансгенной модели [14].

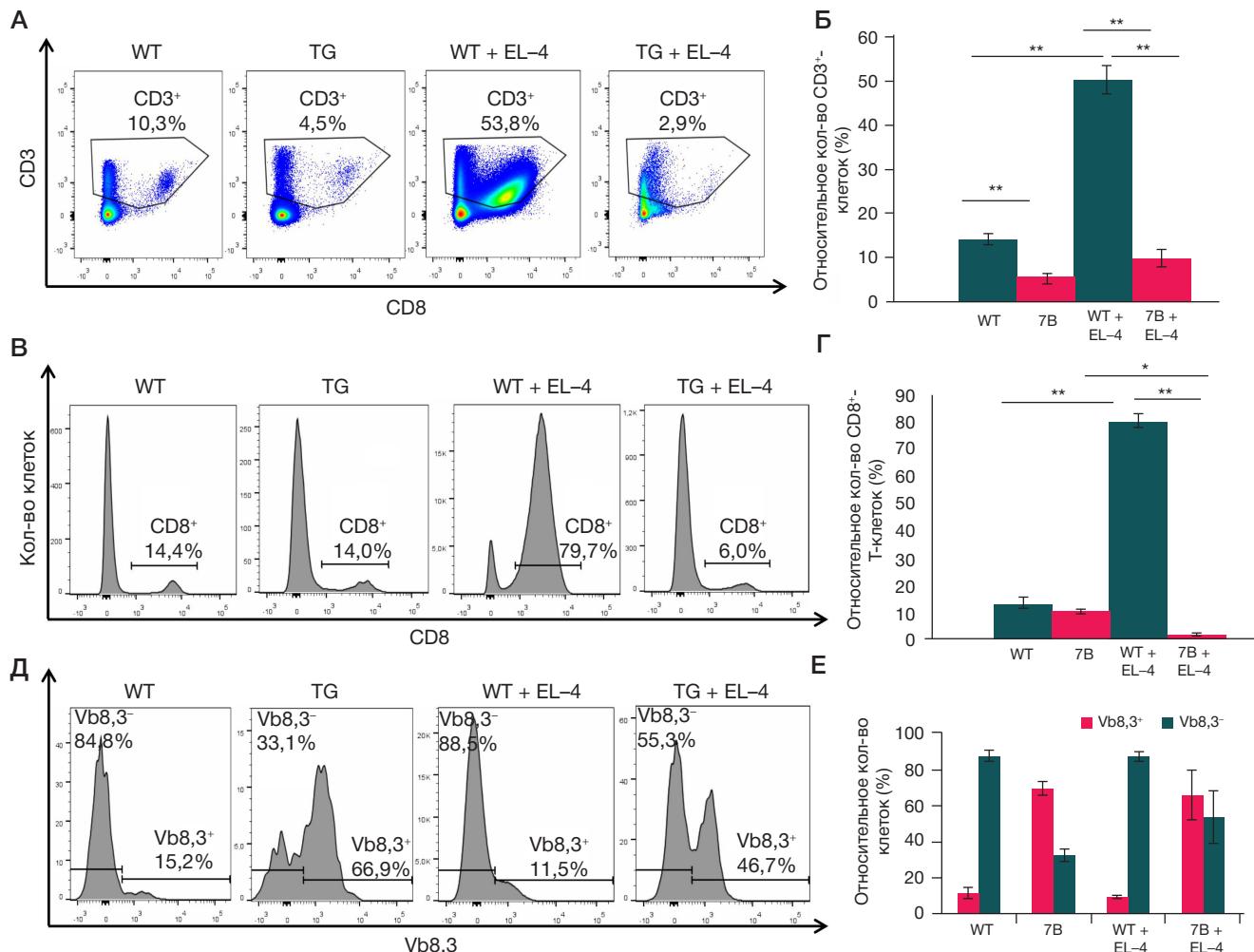
В ряде работ было показано, что ТКР $\beta$ -трансгенные животные сохраняют способность отвечать на различные антигены, в том числе аллогенные молекулы МНС [20, 21]. Это указывает на высокую пластичность репертуара ТКР, позволяющую компенсировать значительное сокращение разнообразия клонотипов, обусловленное экспрессией трансгенной  $\beta$ -цепи [20, 21]. Однако интенсивность иммунного ответа у ТКР $\beta$ -трансгенных мышей снижена

по сравнению с животными дикого типа [14, 20, 21] из-за небольшой частоты отвечающих клонов Т-клеток [20, 22], и, как следствие, у таких животных отмечается замедленная динамика развития Т-клеточных ответов *in vivo* [21]. Важно при этом, что формирующийся цитотоксический CD8<sup>+</sup>-иммунный ответ ТКР $\beta$ -трансгенных мышей на аллогенную молекулу МНС I класса ( $H-2K^b$ ) оказывается недостаточным для отторжения аллогенной опухоли (рис. 4, рис. 5) [14]. Таким образом, ответ даже на сильный трансплантационный антиген становится малоэффективным вследствие сужения разнообразия репертуара ТКР.

В этом отношении распознавание антигенов аллогенной опухоли подчиняется тем же законам, что и распознавание опухолевых антигенов в комплексе с собственными молекулами МНС. Известно, что эффективность



**Рис. 3.** Кривые выживаемости трансгенных мышей 7B после трансплантации лимфомы EL-4. В качестве контроля использовали мышей родительской линии CBA/Lac (WT) и мышей C57BL/6, для которых EL-4 является сингенной опухолью. Представлены данные одного репрезентативного эксперимента ( $n = 4$ )



**Рис. 4.** Анализ иммунного ответа мышей 7B на аллогенную опухоль *in vivo*. Трансгенным мышам 7B (TG+EL-4) и нетрансгенным сибсам (WT+EL-4) трансплантировали внутрибрюшинно клетки аллогенной лимфомы EL-4. На 12 день после трансплантации EL-4 анализировали клетки брюшной полости методом проточной цитофлуориметрии. В качестве контроля использовали интактных (неиммунизированных) животных родительской линии СВА/Lac (WT) и трансгенной линии 7B (TG). **А, Б.** Относительное количество (%) Т-клеток (CD3<sup>+</sup>). **В, Г.** Относительное количество (%) цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток. **Д, Е.** Относительное количество (%) CD8<sup>+</sup> Т-клеток с трансгенной β-цепью Т-клеточного рецептора (ТКРβ) (Vb8.3<sup>+</sup>) и CD8<sup>+</sup> Т-клеток с эндогенно реаранжированными ТКРβ (Vb8.3-). **А, В, Д.** Представлены данные одного однотипного окрашивания. **Б, Г, Е.** Представлены данные двух экспериментов как среднее ± стандартная ошибка среднего ( $n = 4-6$ ). \* —  $p \leq 0,05$ ; \*\* —  $p \leq 0,01$ , ANOVA, post-hoc-тест Тьюки

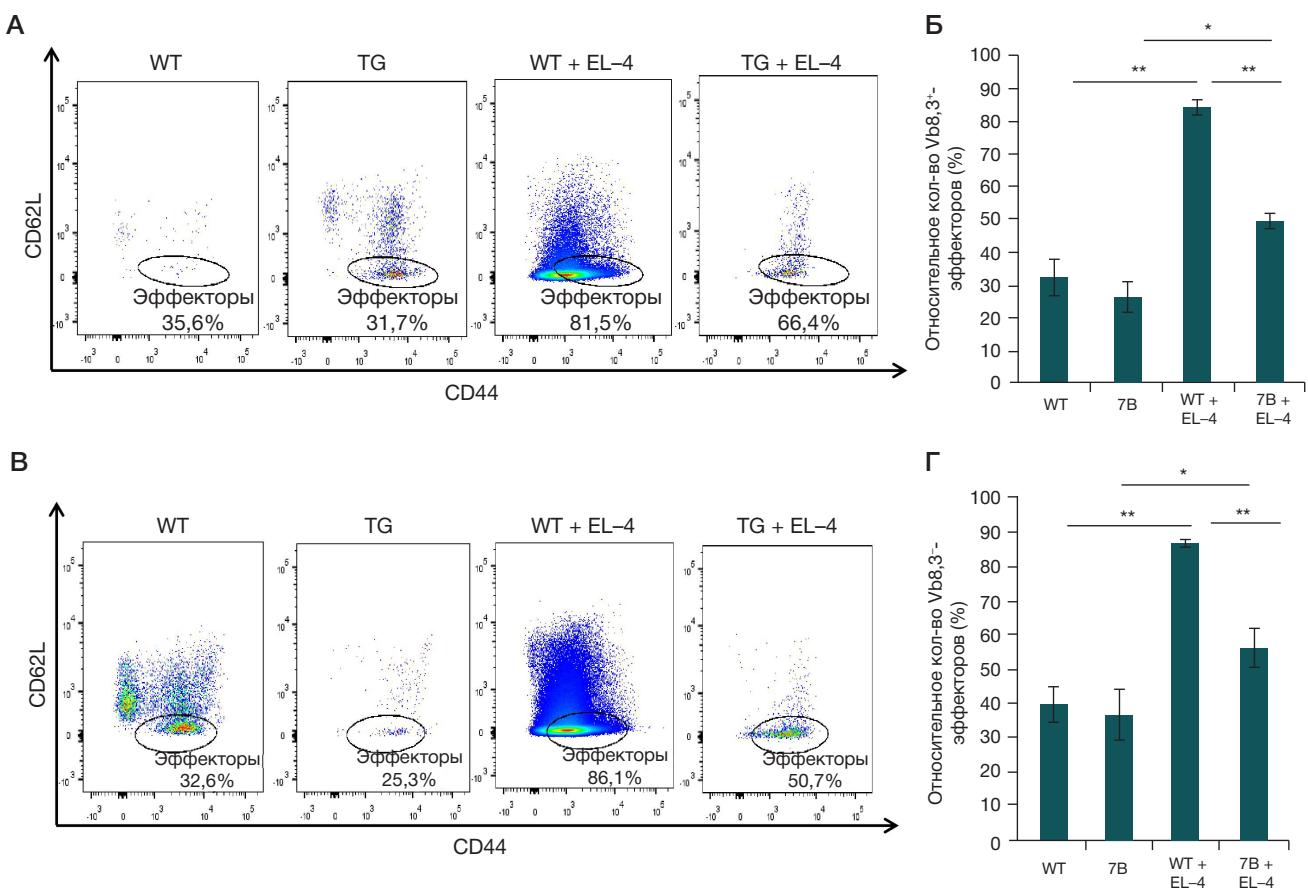
противоопухолевого ответа и, как следствие, устранения трансформированных клеток во многом определяется мутационной нагрузкой опухоли, т. е. ее иммуногенностью [23, 24], и клональным разнообразием Т-клеток, способных распознать опухолевые неоантигены или опухоль-ассоциированные антигены [24, 25]. Было показано, что высокое разнообразие репертуара ТКР рециркулирующих Т-клеток периферической крови служит благоприятным прогностическим фактором, например, при меланоме [26], немелкоклеточном раке легкого [27, 28], раке молочной железы [29], а низкое разнообразие ТКР опухоль-инфилtrирующих Т-клеток ассоциировано с плохим прогнозом при раке желудка и некоторых других типах рака [30–32].

Естественные процессы старения иммунной системы, особенно инволюция тимуса и клональная экспансия клеток памяти на периферии, вызывают сокращение разнообразия репертуара ТКР Т-лимфоцитов [33–35], что обуславливает большую предрасположенность пожилых людей к инфекциям и онкологии [33, 36]. Кроме того в экспериментальной модели было показано, что у мышей в возрасте 12 месяцев снижены ответы на аллоантигены также вследствие возраст-ассоциированного сужения репертуара клонотипов Т-клеток [34, 37].

Полученные в данном исследовании результаты подтверждают установленную ранее [14] прямую зависимость эффективности иммунного ответа на опухолевые аллоантителы от широты репертуара зрелых Т-лимфоцитов.

## ВЫВОДЫ

В настоящей работе показано, что у трансгенных мышей 7B развивается иммунный ответ *in vivo*, недостаточно эффективный, чтобы элиминировать клетки аллогенной опухоли. Из-за экспрессии трансгенной β-цепи ТКР снижаются количество и частота клонотипов цитотоксических Т-клеток, способных распознавать аллогенные молекулы МНС. При этом опухолевый процесс у трансгенных мышей 7B проходит через все стадии иммуноредактирования — от малоэффективных стадий элиминации и равновесия до избегания опухолевыми клетками иммунного ответа. Полученные данные согласуются с результатами наших ранних работ и подтверждают, что вследствие ограничения разнообразия репертуара ТКР не происходит отторжение аллогенной опухоли, а наблюдается ее прогрессирование. В этом случае развивающийся у аллогенного



**Рис. 5.** Анализ пула цитотоксических эффекторных Т-клеток трансгенных мышей 7В в ответе на аллогенную лимфому EL-4 *in vivo*. Анализ эффекторных CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>hi</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток в брюшной полости трансгенных мышей 7В (TG+EL-4) и нетрансгенных сибсов (WT+EL-4) на 12 день после трансплантации EL-4. В качестве контроля использовали интактных (неиммунизированных) животных родительской линии СВА/Lac (WT) и трансгенной линии 7В (TG). **А, Б.** Относительное количество (%) эффекторных Т-клеток с трансгенной ТКРβ (Vb8.3<sup>+</sup>). **В, Г.** Относительное количество (%) эффекторных Т-клеток с эндогенно реаранжированными ТКРβ (Vb8.3<sup>-</sup>). **А, В.** Представлены данные одного репрезентативного окрашивания. **Б, Г.** Представлены данные двух экспериментов как среднее ± стандартная ошибка среднего ( $n = 4-6$ ). \* —  $p \leq 0,05$ ; \*\* —  $p \leq 0,01$ , ANOVA, post-hoc-тест Тьюки

реципиента слабый иммунный ответ способствует селекции наименее иммуногенных злокачественных

клонов, являясь, таким образом, движущим фактором иммуноредактирования опухоли.

## Литература

- Murphy K., Weaver C., Berg L. Janeway's Immunobiology. 10<sup>th</sup> ed. New York: W. W. Norton & Company, Inc, 2022.
- DeWolf S, Grinspun B, Savage T, Lau SP, Obradovic A, Shonts B, et al. Quantifying size and diversity of the human T cell alloresponse. *JCI Insight*. 9; 3 (15): e121256.
- Tian G, Li M, Lv G. Analysis of T-Cell Receptor Repertoire in Transplantation: Fingerprint of T Cell-mediated Alloresponse. *Front Immunol*. 2022; 12: 778559.
- Lin CM, Gill RG. Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016; 21 (1): 40–44.
- Kazansky DB. MHC restriction and allogeneic immune responses. *J Immunotoxicol*. 2008; 5 (4): 369–84.
- D'Orsogna LJ, Roelen DL, Doxiadis II, Claas FH. TCR cross-reactivity and allore cognition: new insights into the immunogenetics of allore cognition. *Immunogenetics*. 2012; 64 (2): 77–85.
- Duneton C, Winterberg PD, Ford ML. Activation and regulation of alloreactive T cell immunity in solid organ transplantation. *Nat Rev Nephrol*. 2022; 18 (10): 663–76.
- Link-Rachner CS, Eugster A, Rücker-Braun E, Heidenreich F, Oelschlägel U, Dahl A, et al. T-cell receptor- $\alpha$  repertoire of CD8<sup>+</sup> T cells following allogeneic stem cell transplantation using next-generation sequencing. *Haematologica*. 2019; 104 (3): 622–31.
- Tian G, Song S, Zhi Y, Qiu W, Chen Y, Sun X, et al. Alloreactive T cells temporarily increased in the peripheral blood of patients before liver allograft rejection. *Liver Transpl*. 2024; 30 (12): 1250–63.
- Mendoza Rojas A, Verhoeven JGHP, de Kuiper R, Clahsen-van Groningen MC, Boer K, Hesselink DA, et al. Alloreactive T cells to Assess Acute Rejection Risk in Kidney Transplant Recipients. *Transplant Direct*. 2023; 9 (5): e1478.
- Kim JY, Lei Z, Maienschein-Cline M, Chlipala GE, Balamurugan A, McDiarmid SV, et al. Longitudinal Analysis of the T-cell Receptor Repertoire in Graft-infiltrating Lymphocytes Following Hand Transplantation. *Transplantation*. 2021; 105 (7): 1502–9.
- Obata F, Yoshida K, Ikeda Y, Ohkubo M, Saito T, Takeuchi Y, et al. Clonality analysis of T cells mediating acute and chronic rejection in kidney allografts. *Transpl Immunol*. 2004; 13 (3): 233–7.
- Zeng G, Huang Y, Huang Y, Lyu Z, Lesniak D, Randhawa P. Antigen-Specificity of T Cell Infiltrates in Biopsies With T Cell-Mediated Rejection and BK Polyomavirus Viremia: Analysis by Next Generation Sequencing. *Am J Transplant*. 2016; 16 (11): 3131–8.
- Silaeva YY, Grinenko TS, Vagida MS, Kalinina AA, Khromykh LM, et al. Immune selection of tumor cells in TCR  $\beta$ -chain transgenic mice. *J Immunotoxicol*. 2014; 11 (4): 393–9.
- Grinenko TS, Pobezinskaya EL, Pobezinskii LA, Baturina IA, Zvezdova ES, Kazanskii DB. Suppression of primary allogenic

- response by CD8+ memory cells. *Bull Exp Biol Med* 2005; 140 (5): 545–9.
16. Zamkova M, Kalinina A, Silaeva Y, Persiyantseva N, Bruter A, Deikin A, et al. Dominant role of the  $\alpha$ -chain in rejection of tumor cells bearing a specific alloantigen in TCR $\alpha$  transgenic mice and in vitro experiments. *Oncotarget*. 2019; 10: 4808–21.
  17. Побезинский Л. А., Побезинская Е. Л., Гриненко Т. С., Червонский А. В., Казанский Д. Б. Периферический пул Т-клеток CD8+ содержит лимфоциты с антигенспецифическими рецепторами, распознающими сингенические молекулы МНС класса II. *Онкогенез*. 2004; 15 (3): 183–9.
  18. Silaeva Y, Kalinina A, Vagida M, Khromykh LM, Deikin AV, Ermolovich TG, et al. Decrease in pool of T lymphocytes with surface phenotypes of effector and central memory cells under influence of TCR transgenic  $\beta$ -chain expression. *Biochemistry (Moscow)*. 2013; 78: 549–59.
  19. Tang D, Chen M, Huang X, Zhang G, Zeng L, Zhang G, et al. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing. *PLoS ONE*. 2023; 18 (11): e0294236.
  20. Listman JA, Rimm IJ, Wang Y, Geller MC, Tang JC, Ho S, et al. Plasticity of the T cell receptor repertoire in TCR beta-chain transgenic mice. *Cell Immunol*. 1996; 167 (1): 44–55.
  21. Ewing C, Allan W, Daly K, Hou S, Cole GA, Doherty PC, et al. Virus-specific CD8+ T-cell responses in mice transgenic for a T-cell receptor beta chain selected at random. *J Virol*. 1994; 68 (5): 3065–70.
  22. Jenkins MK, Moon JJ. The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *J Immunol*. 2012; 88 (9): 4135–40.
  23. Jardim DL, Goodman A, de Melo Gagliato D, Kurzrock R. The Challenges of Tumor Mutational Burden as an Immunotherapy Biomarker. *Cancer Cell*. 2021; 39 (2): 154–73.
  24. Aran A, Garrigós L, Curigliano G, Cortés J, Martí M. Evaluation of the TCR Repertoire as a Predictive and Prognostic Biomarker in Cancer: Diversity or Clonality? *Cancers (Basel)*. 2022; 14 (7): 1771.
  25. Wilczyński JR, Nowak M. Cancer Immunoediting: Elimination, Equilibrium, and Immune Escape in Solid Tumors. In: Klink M., Szulc-Kielbik I, editors. *Interaction of Immune and Cancer Cells. Experientia Supplementum*, vol 113: Springer, 2022.
  26. Charles J, Mouret S, Challende I, Leccia MT, De Fraipont F, Perez S, et al. T-cell receptor diversity as a prognostic biomarker in melanoma patients. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2020; 33 (4): 612–24.
  27. Qian L, Zhaozui Z, Yaping X, Zhentian L, Zhentao L, Qiqi W, et al. Blood T cell diversity associated with the prognosis of advanced non-small cell lung carcinoma treated with first-line pemetrexed based chemotherapy. *Thorac Cancer*. 2021; 12 (7): 997–1005.
  28. Abed A, Beasley AB, Reid AL, Law N, Calapre L, Millward M, et al. Circulating pre-treatment T-cell receptor repertoire as a predictive biomarker in advanced or metastatic non-small-cell lung cancer patients treated with pembrolizumab alone or in combination with chemotherapy. *ESMO Open*. 2023; 8 (6): 102066.
  29. Manuel M, Tredan O, Bachet T, Clapisson G, Courtier A, Parmentier G, et al. Lymphopenia combined with low TCR diversity (divpenia) predicts poor overall survival in metastatic breast cancer patients. *Oncoimmunology*. 2012; 1 (4): 432–40.
  30. Jia Q, Zhou J, Chen G, Shi Y, Yu H, Guan P, et al. Diversity index of mucosal resident T lymphocyte repertoire predicts clinical prognosis in gastric cancer. *Oncoimmunology*. 2015; 4 (4): e1001230.
  31. Jin YB, Luo W, Zhang GY, Lin KR, Cui JH, Chen XP, et al. TCR repertoire profiling of tumors, adjacent normal tissues, and peripheral blood predicts survival in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2018; 67 (11): 1719–30.
  32. Cui JH, Lin KR, Yuan SH, Jin YB, Chen XP, Su XK, et al. TCR Repertoire as a Novel Indicator for Immune Monitoring and Prognosis Assessment of Patients With Cervical Cancer. *Front Immunol*. 2018; 9: 2729.
  33. Fulop T, Larbi A, Pawelec G, Khalil A, Cohen AA, Hirokawa K, et al. Immunology of Aging: the Birth of Inflammaging. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2023; 64 (2): 109–22.
  34. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB, et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol*. 2014; 192 (6): 2689–98.
  35. Шевырев Д. В., Терещенко В. П., Козлов В. А. Гомеостатическая пролиферация: от нормы к патологии. *Российский иммунологический журнал*. 2018; 21 (2): 91–105.
  36. Montégué L, López-Otín C, Kroemer G. Aging and cancer. *Mol Cancer* 2024; 23 (1): 106.
  37. Kalinina AA, Ziganshin RK, Silaeva YY, Sharova NI, Nikonova MF, Persiyantseva NA, et al. Physiological and Functional Effects of Dominant Active TCR $\alpha$  Expression in Transgenic Mice. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (7): 6527.

## References

1. Murphy K., Weaver C., Berg L. *Janeway's Immunobiology*. 10<sup>th</sup> ed. New York: W. W. Norton & Company, Inc, 2022.
2. DeWolf S, Grinshpun B, Savage T, Lau SP, Obradovic A, Shonts B, et al. Quantifying size and diversity of the human T cell alloresponse. *JCI Insight*. 9; 3 (15): e121256.
3. Tian G, Li M, Lv G. Analysis of T-Cell Receptor Repertoire in Transplantation: Fingerprint of T Cell-mediated Alloresponse. *Front Immunol*. 2022; 12: 778559.
4. Lin CM, Gill RG. Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016; 21 (1): 40–44.
5. Kazansky DB. MHC restriction and allogeneic immune responses. *J Immunotoxicol*. 2008; 5 (4): 369–84.
6. D'Orsogna LJ, Roelen DL, Doxiadis II, Claas FH. TCR cross-reactivity and allorecognition: new insights into the immunogenetics of allorecognition. *Immunogenetics*. 2012; 64 (2): 77–85.
7. Duneton C, Winterberg PD, Ford ML. Activation and regulation of alloreactive T cell immunity in solid organ transplantation. *Nat Rev Nephrol*. 2022; 18 (10): 663–76.
8. Link-Rachner CS, Eugster A, Rücker-Braun E, Heidenreich F, Oelschlägel U, Dahl A, et al. T-cell receptor- $\alpha$  repertoire of CD8+ T cells following allogeneic stem cell transplantation using next-generation sequencing. *Haematologica*. 2019; 104 (3): 622–31.
9. Tian G, Song S, Zhi Y, Qiu W, Chen Y, Sun X, et al. Alloreactive T cells temporarily increased in the peripheral blood of patients before liver allograft rejection. *Liver Transpl*. 2024; 30 (12): 1250–63.
10. Mendoza Rojas A, Verhoeven JGHP, de Kuiper R, Clahsen-van Groningen MC, Boer K, Hesselink DA, et al. Alloreactive T cells to Assess Acute Rejection Risk in Kidney Transplant Recipients. *Transplant Direct*. 2023; 9 (5): e1478.
11. Kim JY, Lei Z, Maienschein-Cline M, Chlipala GE, Balaraman A, McDiarmid SV, et al. Longitudinal Analysis of the T-cell Receptor Repertoire in Graft-infiltrating Lymphocytes Following Hand Transplantation. *Transplantation*. 2021; 105 (7): 1502–9.
12. Obata F, Yoshida K, Ikeda Y, Ohkubo M, Saito T, Takeuchi Y, et al. Clonality analysis of T cells mediating acute and chronic rejection in kidney allografts. *Transpl Immunol*. 2004; 13 (3): 233–7.
13. Zeng G, Huang Y, Huang Y, Lyu Z, Lesniak D, Randhawa P. Antigen-Specificity of T Cell Infiltrates in Biopsies With T Cell-Mediated Rejection and BK Polyomavirus Viremia: Analysis by Next Generation Sequencing. *Am J Transplant*. 2016; 16 (11): 3131–8.
14. Silaeva YY, Grinenko TS, Vagida MS, Kalinina AA, Khromykh LM, et al. Immune selection of tumor cells in TCR  $\beta$ -chain transgenic mice. *J Immunotoxicol*. 2014; 11 (4): 393–9.
15. Grinenko TS, Pobezinskaya EL, Pobezinskii LA, Baturina IA, Zvezdova ES, Kazanskii DB. Suppression of primary allogenic response by CD8+ memory cells. *Bull Exp Biol Med* 2005; 140 (5): 545–9.
16. Zamkova M, Kalinina A, Silaeva Y, Persiyantseva N, Bruter A, Deikin A, et al. Dominant role of the  $\alpha$ -chain in rejection of tumor cells bearing a specific alloantigen in TCR $\alpha$  transgenic mice and

- in *in vitro* experiments. *Oncotarget*. 2019; 10: 4808–21.
17. Pobezinskij LA, Pobezinskaya EL, Grinenko TS, Chervonskij AV, Kazanskij DB. Perifericheskij pul T-kletok CD8+ soderzhit limfocity s antigenspecificeskimi receptorami, raspoznayushchimi singennyye molekuly MNS klassa II. *Ontogeneza*. 2004; 35 (3): 183–9.
  18. Silaeva Y, Kalinina A, Vagida M, Khromykh LM, Deikin AV, Ermolkevich TG, et al. Decrease in pool of T lymphocytes with surface phenotypes of effector and central memory cells under influence of TCR transgenic  $\beta$ -chain expression. *Biochemistry (Moscow)*. 2013; 78: 549–59.
  19. Tang D, Chen M, Huang X, Zhang G, Zeng L, Zhang G, et al. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing. *PLoS ONE*. 2023; 18 (11): e0294236.
  20. Listman JA, Rimm IJ, Wang Y, Geller MC, Tang JC, Ho S, et al. Plasticity of the T cell receptor repertoire in TCR beta-chain transgenic mice. *Cell Immunol*. 1996; 167 (1): 44–55.
  21. Ewing C, Allan W, Daly K, Hou S, Cole GA, Doherty PC, et al. Virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses in mice transgenic for a T-cell receptor beta chain selected at random. *J Virol*. 1994; 68 (5): 3065–70.
  22. Jenkins MK, Moon JJ. The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *J Immunol*. 2012; 88 (9): 4135–40.
  23. Jardim DL, Goodman A, de Melo Gagliato D, Kurzrock R. The Challenges of Tumor Mutational Burden as an Immunotherapy Biomarker. *Cancer Cell*. 2021; 39 (2): 154–73.
  24. Aran A, Garrigós L, Curigliano G, Cortés J, Martí M. Evaluation of the TCR Repertoire as a Predictive and Prognostic Biomarker in Cancer: Diversity or Clonality? *Cancers (Basel)*. 2022; 14 (7): 1771.
  25. Wilczyński JR, Nowak M. Cancer Immunoediting: Elimination, Equilibrium, and Immune Escape in Solid Tumors. In: Klink M., Szulc-Kielbik I., editors. *Interaction of Immune and Cancer Cells. Experientia Supplementum*, vol 113: Springer, 2022.
  26. Charles J, Mouret S, Challende I, Leccia MT, De Fraipont F, Perez S, et al. T-cell receptor diversity as a prognostic biomarker in melanoma patients. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2020; 33 (4): 612–24.
  27. Qian L, Zhaojun Z, Yaping X, Zhentian L, Zhentao L, Qiqi W, et al. Blood T cell diversity associated with the prognosis of advanced non-small cell lung carcinoma treated with first-line pemetrexed based chemotherapy. *Thorac Cancer*. 2021; 12 (7): 997–1005.
  28. Abed A, Beasley AB, Reid AL, Law N, Calapre L, Millward M, et al. Circulating pre-treatment T-cell receptor repertoire as a predictive biomarker in advanced or metastatic non-small-cell lung cancer patients treated with pembrolizumab alone or in combination with chemotherapy. *ESMO Open*. 2023; 8 (6): 102066.
  29. Manuel M, Tredan O, Bachet T, Clapisson G, Courtier A, Parmentier G, et al. Lymphopenia combined with low TCR diversity (divpenia) predicts poor overall survival in metastatic breast cancer patients. *Oncoimmunology*. 2012; 1 (4): 432–40.
  30. Jia Q, Zhou J, Chen G, Shi Y, Yu H, Guan P, et al. Diversity index of mucosal resident T lymphocyte repertoire predicts clinical prognosis in gastric cancer. *Oncoimmunology*. 2015; 4 (4): e1001230.
  31. Jin YB, Luo W, Zhang GY, Lin KR, Cui JH, Chen XP, et al. TCR repertoire profiling of tumors, adjacent normal tissues, and peripheral blood predicts survival in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2018; 67 (11): 1719–30.
  32. Cui JH, Lin KR, Yuan SH, Jin YB, Chen XP, Su XK, et al. TCR Repertoire as a Novel Indicator for Immune Monitoring and Prognosis Assessment of Patients With Cervical Cancer. *Front Immunol*. 2018; 9: 2729.
  33. Fulop T, Larbi A, Pawelec G, Khalil A, Cohen AA, Hirokawa K, et al. Immunology of Aging: the Birth of Inflammaging. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2023; 64 (2): 109–22.
  34. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB, et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol*. 2014; 192 (6): 2689–98.
  35. Shevyrev DV, Tereshchenko VP, Kozlov VA. Gomeostaticheskaya proliferaciya: ot normy k patologii. *Rossijskij immunologicheskij zhurnal*. 2018; 21 (2): 91–105. Russian.
  36. Montégut L, López-Otín C, Kroemer G. Aging and cancer. *Mol Cancer* 2024; 23 (1): 106.
  37. Kalinina AA, Ziganshin RK, Silaeva YY, Sharova NI, Nikonova MF, Persiyantseva NA, et al. Physiological and Functional Effects of Dominant Active TCR $\alpha$  Expression in Transgenic Mice. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (7): 6527.