

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623304>

Исследование особенностей иммуногенной клеточной смерти, опосредованной фотодинамическим воздействием с применением фотосенсибилизатора из группы тетра(арил)тетрацианофторфоринов с 9-фенантренилом в качестве бокового заместителя

Е.Е. Слепцова^{1*}, Т.С. Редькин¹, М.О. Савюк^{1,2}, Е.В. Кондакова¹, М.В. Ведунова¹,
В.Д. Турубанова¹, Д.В. Крысько¹⁻³

¹ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Российская Федерация;

² Гентский университет, Гент, Бельгия;

³ Институт исследований рака, Гент, Бельгия

АННОТАЦИЯ

На сегодняшний день концепция иммуногенной клеточной смерти подразумевает гибель опухолевых клеток, которая ведёт за собой активацию адаптивного иммунного ответа *in vivo*. Такая смерть обеспечивается двумя ключевыми компонентами: антигенностью и адьювантностью умирающих клеток. Адьювантность реализуется при испускании молекул DAMPs, которые распознаются рецепторами антигенпрезентирующих дендритных клеток (ДК) и приводят к фагоцитозу и созреванию ДК. Они презентуют антигены погибших клеток на своей поверхности Т-клеточной популяции. Антигенность — это возможность сформировать адаптивный иммунитет при вакцинации умирающими клетками на специфический опухолевый паттерн (антиген).

На сегодняшний день фотодинамическую терапию (ФДТ) выделяют в качестве одного из эффективных индукторов иммуногенной гибели клеток. В работе проводили исследование способности ФДТ с применением тетрацианотетра(арил)порфиразинового красителя с 9-фенантренильной группой на периферии порфиразинового макроцикла (pz I) в качестве фотосенсибилизатора запускать иммуногенную клеточную смерть опухолевых клеток. Работы проводились на двух клеточных линиях — мышинной фибросаркомы MCA205 и мышинной глиомы GL261. Для фотоиндукции клетки загружались фотосенсибилизатором в течение 4 часов. После этого среда заменялась на полную, и клетки подвергались облучению световой дозой 20 Дж/см с использованием светодиодного источника света (λ_{ex} 615–635 нм). Во всех последующих работах использовали клетки, инкубируемые 24 часа после фотоиндукции.

Для обеих клеточных линий была подобрана концентрация фотосенсибилизатора, соответствующая 85–90% мёртвых и умирающих клеток через 24 часа после фотоиндукции, что является «золотым стандартом» иммуногенной клеточной гибели.

Для доказательства адьювантности анализировали уровень выброса АТФ и HMGB1 во внеклеточную среду. Уровень АТФ во внеклеточной среде через 24 часа после фотодинамического воздействия многократно превышал значения этого показателя контрольной группы «до ФДТ» для обеих клеточных линий. Аналогичные результаты были показаны при оценке выброса HMGB1.

На следующем этапе исследовали способность ФДТ-убитых клеток индуцировать стойкий иммунный ответ. Мышей линии C57BL/6J единоразово или дважды с разницей в неделю иммунизировали умирающими клетками фибросаркомы MCA205 или глиомы GL261, подвергшимся фотоиндукции с применением pz I. Через 7 дней после последней вакцинации в противоположный бок мышам подкожно вводили жизнеспособные клетки опухолевой клеточной линии.

В случае модели опухоли фибросаркомы MCA205 к 25 дню эксперимента у 90% животных отсутствовал опухолевый очаг. В группе контроля «PBS» (мыши, получившие в качестве иммунизации физиологический раствор) все лабораторные животные имели опухоль к 12 дню наблюдений и полностью погибли к 16 дню. При этом на 16 день эксперимента объём опухолей у контрольной группы в два раза превышал объём опухолей на 25 день эксперимента в группе «pz I».

Рукопись получена: 20.05.2023

Рукопись одобрена: 26.11.2023

Опубликована online: 20.01.2024

В случае иммунизации умирающими клетками глиомы GL261 опухолевый очаг в группе «рз I» к 30 дню эксперимента отсутствовал у 90% лабораторных животных, а объём прививаемой опухоли у группы иммунизированных ФДТ-убитыми клетками был в 10 раз меньше объёма опухоли в контрольной группе «PBS».

Для оценки роли адаптивного иммунитета в реализации противоопухолевого эффекта умирающих ФДТ-индуцированных клеток была проведена иммунизация бестимусных мышей линии Nude. Динамика появления опухолевых очагов и их размеры были схожими и для экспериментальных, и для контрольных групп. Таким образом было показано, что Т-клеточное звено критически важно для формирования противоопухолевого ответа в этой модели, то есть невозможность Т-клеточных популяций в участии адаптивных иммунных реакций приводит к развитию патологического процесса даже при стимулировании иммунитета. Проведение вакцинации фотоиндуцированными клетками фибросаркомы МСА205 иммунодефицитных мышей линии Nude подтвердило значимый вклад адаптивной иммунной системы в реализации противоопухолевого ответа.

Ключевые слова: иммуногенная клеточная смерть; DAMPs; фотодинамическая терапия.

Как цитировать:

Слепцова Е.Е., Редькин Т.С., Савюк М.О., Кондакова Е.В., Ведунова М.В., Турубанова В.Д., Крысько Д.В. Исследование особенностей иммуногенной клеточной смерти, опосредованной фотодинамическим воздействием с применением фотосенсибилизатора из группы тетра(арил)тетрацианофторфоринов с 9-фенантренилом в качестве бокового заместителя // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 4. С. 562–565. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623304>

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-25-00716, <https://rscf.ru/project/22-25-00716/>

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

* Е.Е. Слепцова; адрес: Российская Федерация, 603022, Нижний Новгород, пр-т Гагарина, д. 23; e-mail: ees222@list.ru

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623304>

Investigation of the features of immunogenic cell death caused by photodynamic exposure using a photosensitizer from the tetra(aryl) tetracyanoforrirazines group with 9-phenanthrenyl as a side substituent

E.E. Sleptsova^{1*}, T.S. Redkin¹, M.O. Saviuk^{1,3}, E.V. Kondakova¹, M.V. Vedunova¹, V.D. Turubanova¹, D.V. Krysko^{1–3}

¹ Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

² Cancer Research Institute Ghent Campus University Hospital Ghent, Ghent, Belgium;

³ Ghent University, Ghent, Belgium

ABSTRACT

The concept of immunogenic cell death involves the death of tumor cells, leading to the activation of an adaptive immune response *in vivo*. Such death relies on two significant components: antigenicity and adjuvance of dying cells. The emission of DAMPs achieves adjuvance, which is recognized by antigen-presenting dendritic cell (DC) receptors, resulting in phagocytosis and DC maturation. These cells present antigens of dead cells on their surface to the T-cell population. Antigenicity provides an opportunity to develop adaptive immunity through vaccination with decaying cells targeting a particular tumor pattern (antigen).

Currently, photodynamic therapy (PDT) is recognized as an efficient inducer of immunogenic cell death. In this study, we examined the effectiveness of photodynamic therapy (PDT) using tetracyanotetra(aryl)porphyrine with a 9-phenanthrenyl group on the periphery of the porphyrine macrocycle (pz I) as a photosensitizer for inducing immunogenic cell death in tumor cells. The study was conducted on two cell lines: mouse fibrosarcoma MCA205 and mouse glioma GL261.

For photoinduction, cells were loaded with a photosensitizer for four hours. The medium was then replaced with full medium, and the cells were irradiated with a 20 J/cm light dose using an LED light source with an excitation wavelength of 615–635 nm. In all subsequent experiments, cells incubated for 24 hours after photoinduction were used.

A photosensitizer concentration corresponding to 85–90% of dead and dying cells 24 hours after photoinduction was chosen for both cell lines, as it is considered the standard for immunogenic cell death.

The study analyzed the levels of ATP and HMGB1 that were released into the extracellular medium to confirm adjuvanticity. After photodynamic exposure, the level of ATP in the supernatant 24 hours later was significantly higher than the baseline values in the control group prior to PDT for both cell lines. Similar findings were observed for HMGB1 release.

The study aimed to investigate the potential of PDT-killed cells in inducing a persistent immune response. Dying cells of fibrosarcoma MCA205 or GL261 glioma underwent photoinduction using pz I and were used to immunize C57BL/6J mice once or twice a week. After seven days from the last vaccination, viable tumor cells were subcutaneously injected into the opposite side of the mice for observation.

In the MCA205 fibrosarcoma tumor model, 90% of the animals were tumor-free on day 25 of the experiment. In the control group PBS (which comprised mice that received saline solution as immunization), all of the laboratory animals had a tumor by day 12 of observation, and died by day 16. Additionally, on day 16 of the experiment, the volume of tumors in the control group was double the volume of tumors on day 25 of the experiment in the pz I group.

When experimenting with immunization using dying GL261 glioma cells, the pz I group showed an absence of tumor focus in 90% of laboratory animals by day 30. Furthermore, the tumor volume in the group that was immunized with PDT-killed cells was 10 times less compared to the tumor volume of the control group PBS.

Immunization of the Nude strain of bestimus condyles was conducted to evaluate the contribution of adaptive immunity to the manifestation of the antitumor effects of dying cells induced through photodynamic therapy (PDT). Tumor foci appeared and developed similarly in both the experimental and control groups, indicating no significant impact from immunization. Thus, the study demonstrated the critical importance of the T-cell connection in eliciting an effective anti-tumor response. The evidence indicated that if T-cell populations cannot participate in adaptive immune responses, even

Received: 20.05.2023

Accepted: 26.11.2023

Published online: 20.01.2024

when immunity is stimulated, a pathological process can develop. Vaccination using photoinduced MCA205 fibrosarcoma cells in immunodeficient Nude mice verified the noteworthy role of the adaptive immune system in executing the antitumor response.

Keywords: immunogenic cell death; DAMPs; photodynamic therapy.

To cite this article:

Sleptsova EE, Redkin TS, Saviuk MO, Kondakova EV, Vedunova MV, Turubanova VD, Krysko DV. Investigation of the features of immunogenic cell death caused by photodynamic exposure using a photosensitizer from the tetra(aryl)tetracyanoforirazines group with 9-phenanthrenyl as a side substituent. *Genes & Cells*. 2023;18(4):562–565. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623304>

ADDITIONAL INFORMATION

Funding sources. The study was financed by the Russian Science Foundation, grant No. 22-25-00716, <https://rscf.ru/project/22-25-00716/>

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, and final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

AUTHORS' CONTACT INFO

* E.E. Sleptsova; address: 23 Gagarin avenue, 603022 Nizhny Novgorod, Russian Federation; e-mail: ees222@list.ru