

© Коллектив авторов, 2025

УДК 615.31,616.03,616.61-006

**Кузеванова А.Ю.<sup>1</sup>, Апанович Н.В.<sup>1</sup>, Халмурзаев О.А.<sup>2</sup>, Макарова Д.М.<sup>1</sup>, Апанович П.В.<sup>1</sup>, Матвеев В.Б.<sup>2</sup>, Логинов В.И.<sup>1,3</sup>, Алимов А.А.<sup>1</sup>****Ингибирование экспрессии гена *LGALS9* активирует Т-клеточно-опосредованную цитотоксичность в опухоли почки**<sup>1</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова», 115522, Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1;<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 24;<sup>3</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Поиск новых подходов иммунотерапии рака почки является актуальной задачей, решение которой будет способствовать улучшению качества лечения и снижению доли больных с иммуноопосредованными нежелательными явлениями. В этой связи разработка новых лекарственных средств на основе механизма РНК-интерференции представляется одним из перспективных направлений для решения поставленной задачи, в частности для расширения спектра терапевтических мишеней с целью подавления молекулярных механизмов ускользания клеток опухоли от действия иммунного надзора. Одной из таких мишеней является ген *LGALS9*. **Цель** исследования – провести анализ уровня экспрессии генов *CD274* и *LGALS9* в образцах ткани рака почки, полученных от российских больных. Оценить потенциальный эффект ингибирования экспрессии гена *LGALS9* в клетках первичной опухоли почки на усиление опосредованного Т-клеточного цитолиза при совместном культивировании.

**Методика.** Оценку уровня экспрессии генов *CD274* и *LGALS9* в парных образцах опухоль/норма проводили с использованием количественной ПЦР. Аутологичные Т-лимфоциты выделяли из цельной крови больного, полученной за 2 ч до начала хирургического лечения. Первичную культуру клеток опухоли получали в течение 2-х ч после хирургического лечения. Липосомальный перенос РНК-дуплексов к генам *LGALS9* и *CD274* проводили за 24 ч до внесения аутологичных Т-лимфоцитов. Цитотоксический эффект оценивали с использованием биосенсорной технологии RTCA xCELLigence (ACEA Biosciences, США) по прошествии 24-х часов совместного культивирования.

**Результаты.** На выборке из 108 парных образцов показано, что повышение уровня экспрессии гена *LGALS9* наблюдается значительно чаще, чем повышение уровня экспрессии гена *CD274*. Разработанные миРНК к генам *LGALS9* и *CD274* обеспечили эффективное подавление экспрессии обоих генов. Применение липосомальных препаратов, на основе разработанных миРНК способствовало активации цитотоксических свойств аутологичных Т-лимфоцитов у пациентов, в опухоли которых имела место повышенная экспрессия гена *LGALS9*. Показано, что опосредованный Т-клеточный цитолиз может быть активирован после внесения в культуру липосомальных комплексов с миРНК к гену *LGALS9*.

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о терапевтическом потенциале подавления экспрессии гена *LGALS9* в клетках опухоли почки для активации цитотоксического действия Т-лимфоцитов.

**Ключевые слова:** РНК-интерференция; миРНК; *LGALS9*; *CD274*; рак почки; Т-лимфоциты; цитолиз

**Для цитирования:** Кузеванова А.Ю., Апанович Н.В., Халмурзаев О.А., Макарова Д.М., Апанович П.В., Матвеев В.Б., Логинов В.И., Алимов А.А. Ингибирование экспрессии гена *LGALS9* активирует Т-клеточно-опосредованную цитотоксичность в опухоли почки. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2025; 69(1): 49–57.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.49-57

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования, общее руководство работой, научное редактирование текста – Алимов А.А.; сбор и описание клинических образцов, клиническая работа с пациентами – Халмурзаев О.А., клиническая работа с пациентами – Матвеев В.Б.; сбор и обработка материала, написание текста – Кузеванова А.Ю., Апанович Н.В.; подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка – Кузеванова А.А., Апанович П.В.; научное редактирование текста – Логинов В.И. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Кузеванова Анна Юрьевна, e-mail: anka.kuzevanka@yandex.ru;

**Алимов Андрей Анатольевич**, e-mail: andrei.alimov2010@yandex.ru

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова».

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

Поступила 21.10.2024

Принята к печати 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Kuzevanova A.Yu.<sup>1</sup>, Apanovich N.V.<sup>1</sup>, Khalmurzaev O.A.<sup>2</sup>, Makarova D.M.<sup>1</sup>, Apanovich P.V.<sup>1</sup>, Matveev V.B.<sup>2</sup>, Loginov V.I.<sup>1,3</sup>, Alimov A.A.<sup>1</sup>

## Inhibition of *LGALS9* gene expression activates T cell-mediated cytotoxicity in renal tumor

<sup>1</sup>Research Center for Medical Genetics, 1 Moskvorechye St., Moscow, 115522, Russian Federation;

<sup>2</sup>Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russian Federation;

<sup>3</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltijskaya St., Moscow, 125315, Russian Federation

The search for new approaches to immunotherapy of renal cancer is an urgent task. Solving this problem will improve the quality of treatment and reduce the proportion of patients with immune-mediated adverse events. Thus, the development of new drugs based on the principles of RNA interference is promising for expanding the range of therapeutic targets to overcome the immune escape of tumors. One of such targets is the *LGALS9* gene. **The aims of the study** were 1) to evaluate the expression levels of *CD274* and *LGALS9* genes in samples of renal cancer tissue from patients in Russia and 2) to determine the potential effect of inhibition of *LGALS9* gene expression in primary renal cancer cells on enhancing T cell-mediated cytolysis during co-culturing. **Methods.** The expression level of *CD274* and *LGALS9* genes in paired tumor/normal samples was assessed using quantitative PCR. Autologous T lymphocytes were isolated from the whole blood obtained two hours before the start of surgery. Primary cancer cell culture was obtained within two hours after surgery. siRNA was delivered to tumor cells 24 hours before the administration of autologous T lymphocytes. The cytotoxic effect was assessed by RTCA xCELLigence biosensor technology (ACEA Biosciences, USA) after 24 hours of co-culturing.

**Results.** The study examined 108 paired clinical samples to assess the expression levels. Overexpression of the *LGALS9* gene was significantly more frequent than overexpression of the *CD274* gene. To investigate gene knockout, siRNAs against *LGALS9* and *CD274* were developed. Cell co-culture experiments showed that T cell-mediated cytolysis could be activated by the addition of siRNA-loaded liposomal complexes to the cell culture.

**Conclusion.** The study results evidenced a therapeutic potential for co-suppression of the *LGALS9* gene expression in renal tumor cells to activate the cytotoxic action of T lymphocytes.

**Keywords:** RNA-interference; siRNA; *LGALS9*; *CD274*; renal cancer; T lymphocytes; cytolysis

**For citation:** Kuzevanova A.Yu., Apanovich N.V., Khalmurzaev O.A., Makarova D.M., Apanovich P.V., Matveev V. B., Loginov V.I., Alimov A.A. Inhibition of *LGALS9* gene expression activates T cell-mediated cytotoxicity in renal tumor. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(1): 49–57. (In Russian).

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.49-57

**Author's contribution:** concept and design of the study, general management of the study, writing the text – Alimov A.A.; collection and description of clinical samples, clinical work with patients – Khalmurzaev O.A., Matveev V.B.; collection and processing of material, writing the text – Kuzevanova A.Yu., Apanovich N.V.; preparation of illustrative material, statistical processing – Kuzevanova A.Yu., Apanovich P.V.; final editing – Loginov V.I. Approval of the final version of the article – all co-authors.

**For correspondence:** **Anna Yu. Kuzevanova**, researcher, Research Center for Medical Genetics, 1 Moskvorech'e St., Moscow, 115522, Russian Federation, e-mail: anka.kuzevanka@yandex.ru;

**Andrei A Alimov**, Ph.D. biol. sciences, PhD, doctor of medicine, associate prof., head of molecular genetics of complex inherited diseases laboratory the Research Center for Medical Genetics, 1 Moskvorech'e St., Moscow, 115522, Russian Federation, e-mail: andrei.alimov2010@yandex.ru

### Information about the authors:

Kuzevanova A.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6156-9725>

Apanovich N.V., <https://orcid.org/0000-0002-9221-115X>

Khalmurzaev O.A., <https://orcid.org/0000-0001-7500-1815>

Apanovich P.V., <https://orcid.org/0000-0001-6576-5512>

Matveev V. B., <https://orcid.org/0000-0001-7748-9527>

Loginov V.I., <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>

Alimov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-8495-7728>

**Financing.** The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for Research Centers for Medical Genetics.

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

Received 21.10.2024

Accepted 30.01.2025

Published 27.03.2025

## Введение

В терапии онкологических заболеваний, наряду с цитостатическими препаратами, низкомолекулярными ингибиторами протеинкиназ и гормональными лекарственными средствами, широкое применение получили ингибиторы иммунных контрольных точек (ИКТИ), в частности, моноклональные антитела (МКА) к белкам *CTLA-4*, *PD-1*, *PD-L1*, которые являются продуктами генов *CTLA4*, *PDCD1* и *CD274* соответственно. Согласно клиническим рекомендациям по лекарственному лечению почечноклеточного рака [1] широкое применение получили ингибиторы киназ (сунитиниб, акситиниб и др.) и ИКТИ (ниволумаб, пембролизумаб и др.), а также их комбинации. Появление в арсенале химиотерапевтов ИКТИ способствовало значительному улучшению эффективности лечения отдельных групп больных. Однако, для значительной части больных, данная тактика лечения является нерезультативной [2]. Кроме того, при применении препаратов данной группы с высокой частотой наблюдаются иммуноопосредованные нежелательные явления 3–4 степени, что способствует инициации исследований по поиску новых терапевтических подходов.

Открытие молекулярных механизмов, лежащих в основе РНК-интерференции, положило начало разработке новых таргетных препаратов, действующим веществом которых являются малые интерферирующие РНК (миРНК). Механизм РНК-интерференции рассматривается в качестве перспективного терапевтического подхода для широкого спектра заболеваний. Начиная с 2018 г., несколько синтетических олигонуклеотидных препаратов (патистиран, гивосиран, лумасиран и инклизисан) одобрены FDA (Food and Drug Administration) [3] для лечения амилоидной полинейропатии, острой печеночной порфирии, первичной гипероксалурии I типа и гиперхолестеринемии, соответственно.

Одним из способов доставки миРНК в клетки является липофекция, основанная на использовании в качестве носителя липидных наночастиц [4]. В настоящее время одобрены более десятка препаратов, содержащих липосомы в качестве системы доставки фармакологических агентов различной химической природы. В частности, создание липосомальных форм противоопухолевых препаратов доксорубин (Doxil) [5], иринотекан (ONIVYDE) [6] и паклитаксел (Lipusu) [7], способствовало снижению токсичности и увеличению максимально переносимой дозы действующих веществ в сравнении с аналогичными химиопрепаратами, применяемыми в растворимой форме.

В настоящее время активно изучаются перспективы использования липосомальной доставки миРНК в клетки опухоли в качестве принципиально новых лекарственных средств. В частности, проводятся клинические испытания липосомальной миРНК *Atu027* для лечения больных на поздних стадиях рака поджелудочной железы, печени, толстой кишки, яичников и меланомы [8].

Одной из потенциальных иммунотерапевтических мишеней при светлоклеточном почечно-клеточном раке (скПКР) является ген *LGALS9*, кодирующий белок галектин-9 (*Gal9*). Экспериментально доказано, что гибель CD8+Т-клеток, инфильтрующей опухоль, может быть инициирована в результате взаимодействия лиганда *Gal9* с рецептором TIM3 активированных Т-клеток [9]. Повышенные уровни экспрессии галектина-9 и его рецептора TIM3 показаны для многих типов опухолей, включая рак молочной железы, рак головы и шеи, рак толстой кишки и другие типы рака [10–14]. При раке почки нередко наблюдается повышенная экспрессия опухолевыми клетками продуктов генов *CD274* и *LGALS9*, что является одной из причин формирования пула антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов, неспособных к цитотоксической функции [15]. Показана ассоциация между высокой экспрессией галектина-9 и худшей общей выживаемостью в группе пациентов скПКР на III–IV стадиях [16].

В настоящей работе проанализированы частоты повышения уровня экспрессии генов *LGALS9* и *CD274* на выборке российских больных раком почки. Проведена оценка возможности активации опосредованного Т-клеточного цитолиза при ингибировании экспрессии генов *LGALS9* и *CD274* в первичной культуре клеток опухоли почки.

## Методика

### Формирование выборки образцов и выделение РНК.

Образцы ткани почки (опухолевая ткань и морфологически нормальная ткань той же почки) были получены и клинически охарактеризованы в «НИИ клинической онкологии» ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Всего было исследовано 108 парных образцов ткани. В выборку вошли 62 мужчин и 46 женщины. Средний возраст больных составил 60,1 года. Согласно патоморфологической оценке, исследуемая выборка состояла из светлоклеточного почечно-клеточного рака ( $n=100$ ), папиллярного рака ( $n=4$ ) и онкоцитомы ( $n=4$ ). Аутологичные Т-лимфоциты выделяли из цельной крови больного, полученной за 2 ч до начала хирургического лечения. Первичную культуру клеток опухоли получа-

ли в течение 2-х ч после хирургического лечения. Исследование проведено с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с принципами Хельсинкской декларации ВМА.

Суммарную фракцию РНК из образцов ткани и культуры клеток линии Рпоч1КК выделяли общепринятым способом с использованием реагента «ExtractRNA» (Евроген, Россия). Образцы дополнительно обрабатывали ДНКазой I, после чего проводили очистку с использованием набора «CleanRNA Standard» (Евроген, Россия). Качество выделенной РНК проверяли при помощи электрофоретического разделения в 1,8% агарозном геле. Концентрацию РНК в водном растворе оценивали спектрофотометрически.

**Количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР).** Синтез комплементарной цепи ДНК осуществляли с использованием набора реагентов «MMLV RT kit» (Евроген, Россия). Относительное определение уровня представленности транскрипта в образце проводили с использованием стандартного оборудования и программного обеспечения компании Applied Biosystems QuantStudio (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве внутреннего контроля использовали ген *GAPDH*. Оценку экспрессии генов *LGALS9* и *CD274* проводили с использованием набора праймеров опубликованных ранее [17]. Все реакции ПЦР повторяли трижды. В качестве отрицательного контроля использовали пробы без кДНК. Данные анализировали с использованием относительной количественной оценки по  $\Delta\Delta Ct$ -методу. Изменения уровня экспрессии менее, чем в 2 раза ( $|\Delta\Delta Ct| \leq 2$ ) рассматривали как отсутствие изменений.

**Получение первичной культуры клеток и фракции Т-клеток.** Первичную культуру опухолевых клеток из ткани опухоли почки получали общепринятым методом с использованием коллагеназы в стандартных стерильных условиях клеточного бокса [18]. Клетки культивировали в ростовой среде RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), 1% инсулина-трансферрина-селенита (ИТС), эпидермальный фактор роста (EGF) (5 мкг/мл) и 1% пенициллина-стрептомицина.

Фракцию Т-клеток периферической крови получали из мононуклеарных клеток с использованием стандартного набора EasySep™ Human T Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Активацию Т-лимфоцитов проводили с помощью антител к CD3 (functional grade, Cat. No. 16-0037-81) и CD28 (functional grade, Cat. No. 16-00289-81) (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя.

Перед постановкой экспериментов, с помощью стандартного набора EasySep™ Dead Cell Removal (Annexin V) Kit (STEMCELL Technologies, США) в строгом соответствии с рекомендациями производителя, осуществляли удаление мертвых клеток из популяции. Оценку количества и жизнеспособности клеток в обогащенной фракции проводили с использованием счетчика Countess II FL (Life Technologies, США), клетки окрашивали раствором трипанового синего (0,4%).

**Загрузка миРНК на липосомальный вектор.** В качестве липосомального вектора использовали катионные липосомы 2x3-DOPE [19]. Загрузку миРНК на липосомы производили непосредственно перед использованием в эксперименте. В частности, приготовленные на бессывороточной среде Opti-MEM™ (Gibco™, Thermo FS, США) растворы дуплексов и липосомальной дисперсии смешивали в равных объемах после чего инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин и вносили в культуру клеток.

**Культивирование и трансфекция клеток линии Рпоч-1КК.** Перевиваемая клеточная линия светлоклеточного рака почки человека Рпоч1КК получена из коллекции опухолевых штаммов человека РОНЦ им. Н.Н. Блохина [20]. Клетки Рпоч1КК культивировали в стандартных условиях в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, 1 нМ пирувата натрия, 1% пенициллина-стрептомицина в клеточном CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Перед трансфекцией клетки перевиваемой линии, а также клетки первичной культуры опухоли почки высевали в планшеты в концентрации  $4,0 \cdot 10^4$  клеток в 1 мл среды за 24 ч до обработки. Перед внесением композиции миРНК и катионного липида питательную среду с 10% сывороткой заменяли на ту же среду с 1% сывороткой без антибиотиков. Конечная концентрация дуплекса, загруженного на липосомальный вектор, в зависимости от задачи эксперимента, составляла 25 нМ или 50 нМ. Через 6 ч после трансфекции меняли среду на RPMI-1640, с содержанием 10% FBS и 1 нМ пирувата натрия (для клеток перевиваемой линии) или 10% FBS, 1 % ИТС, EGF (5 мкг/мл) (для клеток первичной культуры). Эффективность РНК-интерференции оценивали через 24 и 48 ч методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). В качестве контролей сравнения использовали те же клетки без обработки тестируемым препаратом. В экспериментах с МКА был использован авелумаб в конечной концентрации 15 мкг/мл [21]. Последовательно олигонуклеотидов представлены ниже:

миLGALS9-s: rGrGrAUrCUUrGUrGUrGrArArGr-CUrCrAdTdT

миLGALS9-a: UrGrArGrCUUrCrArCrArCrArArGrAUrCrCdTdT

миCD274-s: rGrGrAUrCrCrArGUrCrArCrCUrCUrGrArAdTdT

миCD274-a: UUrCrArGrArGrGUrGrArCUrGrGrAUrCrCdTdT

**Совместное культивирование клеток опухоли почки с активированными аутологичными Т-лимфоцитами.** Через 24 ч после трансфекции клеток первичной культуры опухоли почки в соответствующие лунки вносили активированные аутологичные Т-лимфоциты в количестве 1:1 в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, 1% ИТС, EGF (5 мкг/мл).

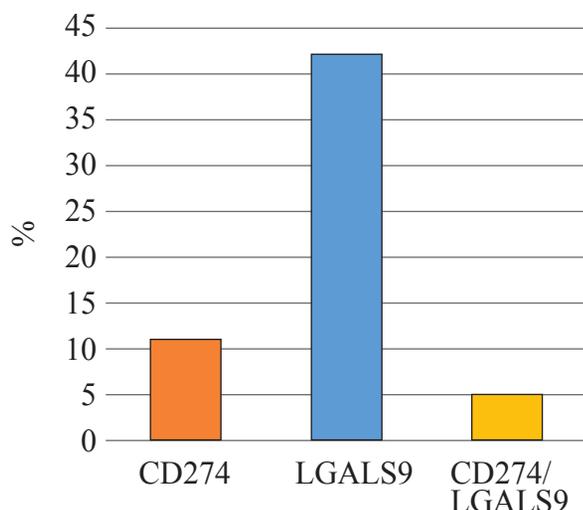
**Оценка опосредованного Т-клеточного цитолиза.** Оценку изменения показателя «клеточный индекс» проводили через 24 ч совместного культивирования опухолевых клеток и Т-лимфоцитов с применением биосенсорной технологии RTCA xCELLigence (ACEA Biosciences, США). Регистрацию сигнала осуществляли с помощью пакета программ RTCA Software Lite v.2.2.5. так, как это было описано ранее [22].

**Статистическая обработка данных.** Для статистической обработки данных использовали пакет программ Microsoft Excel 2019.

## Результаты

### Экспрессия целевых генов у больных раком почки.

Материал для исследования и клинические характери-



**Рис. 1.** Доля образцов опухолевой ткани с повышенным уровнем экспрессии генов *CD274* и *LGALS9* в выборке тканей опухоли почки, полученных от 108 больных.

**Fig. 1.** Percentage of tumor tissue samples with increased expression levels of the *CD274* and *LGALS9* genes in renal tumor tissue obtained from 108 patients.

стики были получены в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Оценили частоты повышенной экспрессии генов *CD274* и *LGALS9* при помощи количественной ОТ-ПЦР. Было исследовано 108 парных образцов (опухоль/норма) ткани почки. Данные по гистологии изучаемых образцов получены из отдела патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ.

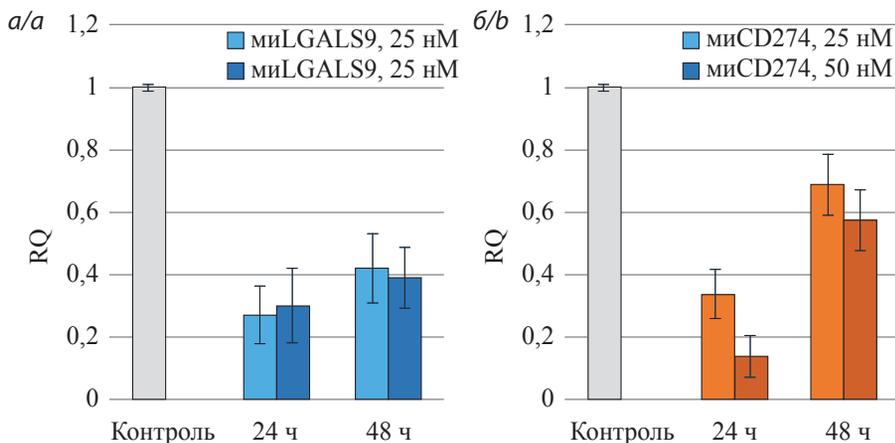
На исследуемой выборке провели анализ уровней экспрессии генов *CD274* и *LGALS9* в опухолевой ткани по сравнению с гистологической нормой. Повышенным считали уровень экспрессии гена в опухоли, отличающийся в 2 и более раз от экспрессии в нормальной ткани. Результаты анализа представлены на **рисунке 1**.

В результате проведенной оценки выявили, что увеличение уровня экспрессии гена *LGALS9* встречается значительно чаще, чем увеличение уровня экспрессии гена *CD274*. Совместная повышенная экспрессия обоих генов составила порядка 5%. Полученные результаты позволяют предположить, что ген *LGALS9* является потенциальной терапевтической мишенью при опухоли почки, что требует экспериментального подтверждения.

### Тестирование миРНК к генам *LGALS9* и *CD274* на модели перевиваемой клеточной линии рака почки.

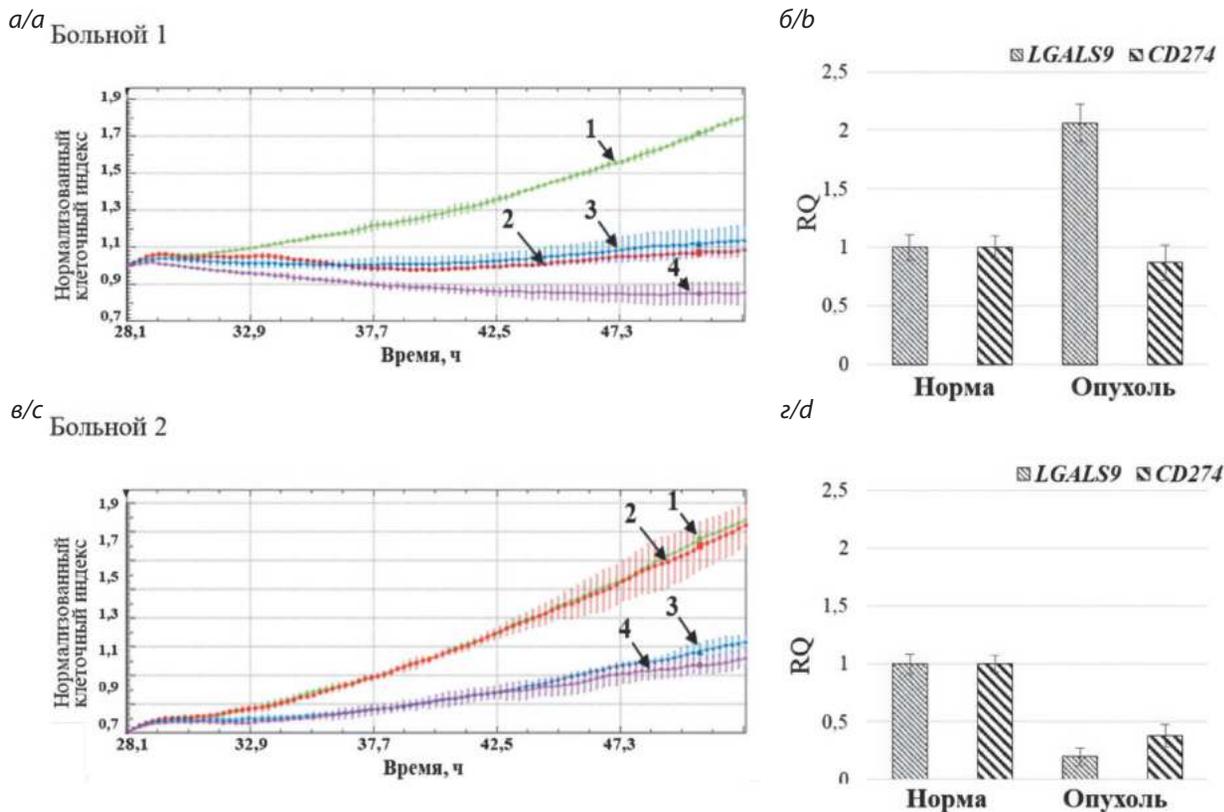
На первом этапе исследования определили концентрацию разработанных миРНК для эффективного подавления экспрессии генов *LGALS9* и *CD274*. Для этого использовали клетки перевиваемой клеточной линии светлоклеточного рака почки человека Рпоч1КК. Эффективность ингибирования оценивали через 24 и 48 ч после проведения трансфекции. Было показано, что увеличение концентрации миРНК с 25 до 50 нМ не приводило к усилению эффективности нокдауна гена *LGALS9* (**рис. 2, а/а**). В то время как для гена *CD274* максимальное ингибирование экспрессии было получено при концентрации миРНК 50 нМ (**рис. 2, б/б**). На основании этого в дальнейших экспериментах с клетками опухоли почки, полученных от больных, использовали для нокдауна гена *LGALS9* миРНК в концентрации 25 нМ, а для гена *CD274* в концентрации 50 нМ.

**Совместное культивирование аутологичных Т-лимфоцитов и клеток опухоли больных после ингибирования генов *LGALS9* и *CD274*.** Опосредованный Т-клеточный цитолиз оценивали по результатам совместного культивирования так, как это было описано ранее [21]. В связи с особенностями используемого в экспериментах биологического материала, оценку уровня экспрессии тестируемых генов в образцах опухоли проводили параллельно с экспериментами по трансфекции.



**Рис. 2.** Относительный уровень экспрессии генов *LGALS9* (a/a) и *CD274* (b/b) в клетках линии Rpoch1KK через 24 и 48 ч после трансфекции миLGALS9 или миCD274 в концентрациях 25 нМ и 50 нМ.

**Fig. 2.** Relative expression level of the *LGALS9* (a/a) and *CD274* (b/b) genes in Rpoch1KK cells 24 and 48 hours after transfection with siLGALS9 or siCD274 at concentrations of 25 nM and 50 nM.



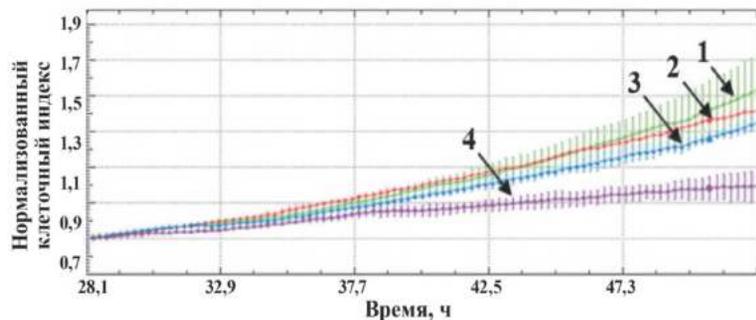
**Рис. 3.** Результаты исследования биоматериала двух больных.

a/a и в/с – опосредованный Т-лимфоцитами цитолиз клеток опухоли почки. 1 – клетки опухоли, 2 – клетки опухоли + активированные Т-лимфоциты (1:1), 3 – клетки опухоли + миLGALS9/миCD274, 4 – клетки опухоли + миLGALS9/миCD274 + активированные Т-лимфоциты (1:1); б/б, z/d – относительный уровень экспрессии генов *LGALS9* и *CD274* в парных образцах ткани почки.

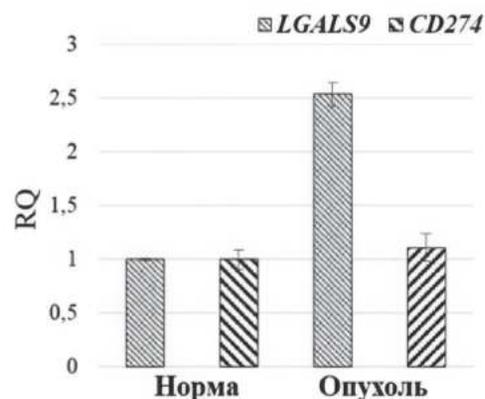
**Fig. 3.** Biomaterial assay data from two patients.

a/a and в/c – T-lymphocyte-mediated cytolysis of renal tumor cells. 1 – tumor cells, 2 – tumor cells + activated T lymphocytes (1:1), 3 – tumor cells + siLGALS9/siCD274, 4 – tumor cells + siLGALS9/siCD274 + activated T lymphocytes (1:1); б/б, z/d – relative expression level of the *LGALS9* and *CD274* genes in paired kidney tissue samples.

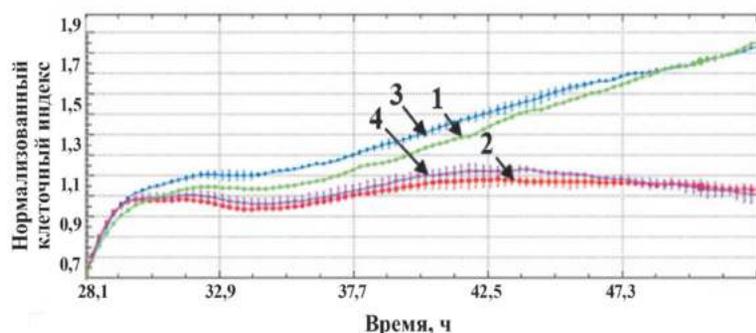
*a/a*  
 Больной 3



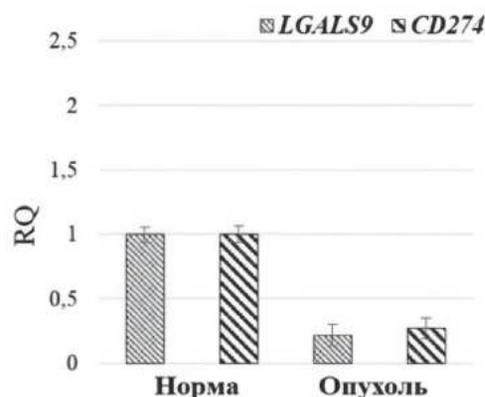
*б/б*



*в/с*  
 Больной 4



*з/д*



**Рис. 4.** Результаты исследования биоматериала двух больных.

*a/a, б/б* – опосредованный Т-лимфоцитами цитолиз клеток опухоли почки в присутствии авелумаба. 1 – клетки опухоли, 2 – клетки опухоли + активированные Т-лимфоциты (1:1), 3 – клетки опухоли + миLGALS9, 4 – клетки опухоли + миLGALS9 + активированные Т-лимфоциты (1:1); *б/б, з/д* – относительный уровень экспрессии генов *LGALS9* и *CD274* в парных образцах ткани почки.

**Fig. 4.** Biomaterial assay data from two patients.

*a/a, в/с* – T-lymphocyte-mediated cytolysis of renal tumor cells in the presence of avelumab. 1 – tumor cells, 2 – tumor cells + activated T lymphocytes (1:1), 3 – tumor cells + siLGALS9, 4 – tumor cells + siLGALS9 + activated T lymphocytes (1:1); *б/б, з/д* – relative expression level of the *LGALS9* and *CD274* genes in paired kidney tissue samples.

При оценке модулирующего действия гена *LGALS9* на аутологичные Т-лимфоциты, дополнительно подавляли экспрессию гена *CD274* с целью оценить потенциально возможный совместный эффект.

Было показано, что трансфекция клеток опухоли комбинацией дуплексов миLGALS9/миCD274 способна активировать Т-клеточную цитотоксичность (рис. 3, *a/a*). В частности, эффект наблюдали при совместном культивировании Т-клеток и клеток опухоли, полученных из ткани рака почки, в которой методом количественной ОТ-ПЦР был зарегистрирован повышенный уровень экспрессии гена *LGALS9* (рис. 3, *б/б*).

В образце сравнения, полученном из ткани с низким уровнем экспрессии целевых генов, при тех же условиях культивирования эффект обнаружен не был (рис. 3 *в/с, з/д*).

В дополнение к полученным результатам было отмечено, что данная комбинация препаратов способствует снижению пролиферативной активности в популяциях клеток первичной опухоли вне зависимости от присутствия Т-клеток. Поэтому в следующей серии экспериментов миРНК к гену *CD274* заменили на МКА против PD-L1 (авелумаб), что позволило снизить цитотоксический эффект при совместном ингибировании обоих лигандов (рис. 4, *a/a, б/б*).

В следующей серии экспериментов трансфекция клеток опухоли дуплексом миLGALS9 осуществлялась в присутствии антител против PD-L1, что способствовало активации Т-клеточной цитотоксичности (рис. 4, а/а). В эксперименте использовали опухолевые клетки, выделенные из ткани рака почки с повышенным уровнем экспрессии гена *LGALS9* (рис. 4, б/б).

В образце сравнения, полученном из ткани с низким уровнем экспрессии целевых генов, при тех же условиях культивирования эффект не наблюдали (рис. 4, в/с, г/д). Следует отметить, что в этом случае, был выявлен цитотоксический эффект аутологических Т-лимфоцитов, не связанный с действием препаратов, что, вероятно, является результатом иммуногенного действия первичной опухоли, инициировавшей специфических иммунный ответ в организме больного до проведения хирургического лечения.

### Заключение

Поиск дополнительных терапевтических мишеней для иммунотерапии опухоли препаратами ИКТИ является актуальной задачей, поскольку цитотоксическое действие Т-клеток может быть обусловлено моделирующим действием не одной, а нескольких молекул, наличие которых на поверхности опухолевой клетки невозможно предсказать. В нашем исследовании показано, что в ткани опухоли почки частота совместной экспрессии генов *LGALS9* и *CD274* составляет 5% случаев. Повышенная экспрессия гена *LGALS9* является преобладающей. В экспериментах при совместном культивировании клеток опухоли, полученных из ткани почки с повышенным уровнем экспрессии гена *LGALS9*, и Т-клеток больного показано, что применение липосомальных комплексов с миРНК к гену *LGALS9* способствует активации цитотоксического действия эффекторных Т-клеток. Полученные данные представляют интерес при планировании дальнейших исследований данной области.

### Литература

(п.п. 2–12; 14–16; 18; 19; 21 см. References)

1. Волкова М.И., Носов Д.А., Алексеев Б.Я., Гладков О.А., Матвеев В.Б. Практические рекомендации по лекарственному лечению почечноклеточного рака. Практические рекомендации RUSSCO, часть 1. *Злокачественные опухоли*. 2023; 13(3s2-1): 609-19. <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2023-13-3s2-1-609-619>
13. Кипкеева Ф.М., Мансорунов Д.Ж., Музаффарова Т.А., Апанович Н.В., Никулин М.П., Алимов А.А. Иммунные контрольные точки PD-1/PD-L1 и TIM-3/Gal-9 и перспективы их совместного ингибирования. *Вопросы онкологии*. 2024; 70(2): 202–11. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2024-70-2-202-211>

17. Апанович Н.В., Апанович П.В., Халмурзаев О.А., Матвеев В.Б., Алимов А.А. Экспрессия генов иммунных контрольных точек при прогрессии рака почки. *Медицинская генетика*. 2023; 22(11): 13-9. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.11.13-19>
20. Лушникова А.А., Морозова Л.Ф., Абрамов И.С., Дубровина Т.С., Балбуцкий А.В. Генетические изменения в линии Рпоч1-КК светлоклеточного рака почки человека. *Успехи молекулярной онкологии*. 2016; 3(3): 81-5. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2016-3-3-81-85>
22. Кузеванова А.Ю., Халмурзаев О.А., Борунова А.А., Апанович Н.В., Заботина Т.Н., Алимов А.А. и др. Анализ действия Т-лимфоцитов периферической крови больного на клетки почечно-клеточного рака в модельных системах. *Онкоурология*. 2022; 18(4): 15-24. <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2022-18-4-15-24>

### References

1. Volkova M.I., Nosov D.A., Alekseev B.Ya., Gladkov O.A., Matveev V.B. Practical recommendations for drug treatment of renal cell cancer. RUSSCO practical recommendations, part 1. *Zlokachestvenny'e opuxoli*. 2023; 13(3s2-1): 609-19. <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2023-13-3s2-1-609-619> (in Russian)
2. Negishi T., Furubayashi N., Nakagawa T., Nishiyama N., Kitamura H., Hori Y., et al. Site-specific Response to Nivolumab in Renal Cell Carcinoma. *Anticancer research*. 2021; 41(3): 1539–45. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14913>
3. Zhang C., Ma Y., Zhang J., Kuo J.C., Zhang Z., Xie H., et al. Modification of Lipid-Based Nanoparticles: An Efficient Delivery System for Nucleic Acid-Based Immunotherapy. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2022; 27(6):1943. <https://doi.org/10.3390/molecules27061943>
4. Albertsen H.C., Kulkarni J.A., Witzigmann D., Lind M., Petersson K., Simonsen J.B. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022; 188, 114416. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114416>
5. Barenholz Y. Doxil® – the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release*. 2012; 160(2): 117-34. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>
6. Paz-Ares L., Spigel D.R., Chen Y., Jove M., Juan-Vidal O., Rich P., et al. RESILIENT part 1: a phase 2 dose-exploration and dose-expansion study of second-line liposomal irinotecan in adults with small cell lung cancer. *Cancer*, 2022; 128(9):1801–1811. <https://doi.org/10.1002/cncr.34123>
7. Zhang J., Pan Y., Shi Q., Zhang G., Jiang L., Dong X., et al. Pacitaxel liposome for injection (Lipusu) plus cisplatin versus gemcitabine plus cisplatin in the first-line treatment of locally advanced or metastatic lung squamous cell carcinoma: A multicenter, randomized, open-label, parallel controlled clinical study. *Cancer Commun (Lond)*, 2022; 42(1): 3–16. <https://doi.org/10.1002/cac2.12225>
8. Schultheis B., Strumberg D., Santel A., Vank C., Gebhardt F., Keil O., et al. First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2014; 32(36): 4141-8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.55.0376>
9. Yang R., Sun L., Li C.F., Wang Y.H., Yao J., Li H., et al. Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. *Nat Commun*. 2021; 12(1): 832. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21099-2>

10. Yasinska I.M., Sakhnevych S.S., Pavlova L., Teo Hansen Selno A., Teuscher Abeleira A.M., Benlaouer O., et al. The Tim-3-Galectin-9 pathway and its regulatory mechanisms in human breast cancer. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1594. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01594>
11. Liu J.F., Wu L., Yang L.L., Deng W.W., Mao L., Wu H., et al. Blockade of TIM3 relieves immunosuppression through reducing regulatory T cells in head and neck cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018; 37(1): 44. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0713-7>
12. Kang C.W., Dutta A., Chang L.Y., Mahalingam J., Lin Y.C., Chiang J.M., et al. Apoptosis of tumor infiltrating effector TIM-3+CD8+ T cells in colon cancer. *Sci Rep.* 2015; 5:15659. <https://doi.org/10.1038/srep15659>
13. Kipkeeva F.M., Mansorunov D.Z., Muzaffarova T.A., Apanovich N.V., Nikulin M.P., Alimov A.A. Immune checkpoints PD-1/PD-L1 and TIM-3/GAL-9 and prospects for their simultaneous inhibition. *Voprosy Onkologii.* 2024; 70(2): 202–11. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2024-70-2-202-211> (in Russian)
14. Lv Y., Ma X., Ma Y., Du Y., Feng J. A new emerging target in cancer immunotherapy: Galectin-9 (LGALS9). *Genes Dis.* 2022; 10(6): 2366–82. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.05.020>
15. Granier C., Vinatier E., Colin E., Mandavit M., Dariane C., Verkarre V., et al. Multiplexed Immunofluorescence Analysis and Quantification of Intratumoral PD-1+Tim-3+CD8+ T Cells. *J. Vis. Exp.* 2018; (132): e56606, <https://doi.org/10.3791/56606>
16. Jikuya R., Kishida T., Sakaguchi M., Yokose T., Yasui M., Hashizume A., et al. Galectin-9 expression as a poor prognostic factor in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2020; 69(10): 2041–51. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02608-6>
17. Apanovich N.V., Apanovich P.V., Khalmurzaev O.A., Matveev V.B., Alimov A.A. Expression of immune checkpoint genes during kidney cancer progression. *Meditinskaya genetika.* 2023; 22(11): 13–9. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.11.13-19> (in Russian)
18. Valente M.J., Henrique R., Costa V.L., Jerónimo C., Carvalho F., Bastos M.L., et al. A rapid and simple procedure for the establishment of human normal and cancer renal primary cell cultures from surgical specimens. *PLoS one.* 2011; 6(5), e19337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019337>
19. Vysochinskaya V., Shishlyannikov S., Zabrodskaya Y., Shmendel E., Klotchenko S., Dobrovolskaya O., et al. Influence of Lipid Composition of Cationic Liposomes 2X3-DOPE on mRNA Delivery into Eukaryotic Cells. *Pharmaceutics.* 2022; 15(1):8. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010008>
20. Lushnikova A.A., Morozova L.F., Abramov I.S., Dubrovina T.S., Balbutskiy A.V. Genetic alterations in the human kidney clear cell carcinoma line Рпоч1-КК. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii.* 2016; 3(3): 81–5. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2016-3-3-81-85> (in Russian)
21. Grenga I., Donahue R.N., Lepone L.M., Richards J., Schlom, J. A fully human IgG1 anti-PD-L1 MAb in an *in vitro* assay enhances antigen-specific T-cell responses. *Clin Transl Immunology.* 2016; 5(5): e83. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.27>
22. Kuzevanova A.Yu., Khalmurzaev O.A., Borunova A.A., Apanovich N.V., Zabolotina T.N., Alimov A.A., et al. Study of the action of peripheral blood T-lymphocytes on renal cell carcinoma cells in model systems. *Onkourologiya.* 2022; 18(4): 15–24. <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2022-18-4-15-24> (in Russian)

**Сведения об авторах:**

**Кузеванова Анна Юрьевна**, науч. сотр. лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова», e-mail: anka.kuzevanka@yandex.ru;

**Апанович Наталья Владимировна**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова»;

**Халмурзаев Ойбек Авазханович**, канд. мед. наук, науч. сотр., врач — онколог, отд. ние онкоурологии ФГБУ «НМИЦ онкологии Н.Н. Блохина» Минздрава России;

**Макарова Дарья Максимовна**, мл. науч. сотр., лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова»;

**Апанович Павел Васильевич**, науч. сотр., лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова»;

**Матвеев Всеволод Борисович**, доктор мед. наук, проф., зам. директора по инновационной деятельности, зав. отд. онкоурологии ФГБУ «НМИЦ онкологии Н.Н. Блохина» Минздрава России, член-кор. РАН;

**Логинов Виталий Игоревич**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова»; вед. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

**Алимов Андрей Анатольевич**, канд. биол. наук, PhD, доцент, зав. лаб. молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова».