



## Оценка изменений субпопуляционного состава клеточного иммунного инфильтрата сингенного колоректального рака МС38 на фоне курсового применения глутамил-триптофана: экспериментальное исследование

Савельев С.А.<sup>1</sup>, Муразов Я.Г.<sup>2</sup>, Бельтюков П.П.<sup>3</sup>, Барышникова Н.В.<sup>4</sup>, Петленко С.В.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> АО «Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед», (4-я линия В.О., д. 11, Санкт-Петербург, 199004, Россия)

<sup>2</sup> АО «Научно-производственное объединение «Дом Фармации», (Заводская ул., д. 3, корп.245, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., 188663, Россия)

<sup>3</sup> ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, (Заводская ул., д. 6/2, корп.93, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., 188663, Россия)

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, (Литовская ул., д. 2, Санкт-Петербург, 194100, Россия)

<sup>5</sup> ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. акад. С.Н. Голикова» ФМБА России, (ул. Бехтерева, д. 1, Санкт-Петербург, 192019, Россия)

**Для цитирования:** Савельев С.А., Муразов Я.Г., Бельтюков П.П., Барышникова Н.В., Петленко С.В. Оценка изменений субпопуляционного состава клеточного иммунного инфильтрата сингенного колоректального рака МС38 на фоне курсового применения глутамил-триптофана: экспериментальное исследование. Экспериментальная клиническая гастроэнтерология. 2025;(12):163–176 doi:10.31146/1682-8658-ecg-244-12-163-176

✉ **Для переписки:** Савельев Сергей Александрович, к.б.н.  
**Савельев** Муразов Ярослав Геннадьевич, к.б.н.  
**Сергей** Бельтюков Петр Петрович, к.м.н., доцент  
**Александрович** Барышникова Наталья Владимировна, к.м.н., доцент  
ssavelyev@cytomed.ru Петленко Сергей Викторович, д.м.н., ведущий научный сотрудник

### Резюме

Несмотря на успехи в области скрининга и лечения рака желудка, актуальной остается проблема поиска и изучения эффективных методов лечения и профилактики предопухолевых заболеваний, включая хронический атрофический гастрит. Особое место среди стратегий профилактики злокачественных новообразований занимает иммунопрофилактика рака.

**Цель работы** – оценить изменения субпопуляционного состава иммунного инфильтрата сингенной опухоли на фоне курсового применения глутамил-триптофана у мышей.

**Материалы и методы.** Источником опухолевого материала служили клетки сингенного колоректального рака МС38, трансплантированные интрамаммарно. Экспериментальные животные получали глутамил-триптофан (0,02 мг/кг); контрольные – физиологический раствор. Введения были многократные, начиная за 14 дней до трансплантации и до 14-го или 21-го дня после трансплантации опухоли. Оценивали кинетику роста опухоли и субпопуляционный состав клеточного инфильтрата опухоли методом проточной цитометрии.

**Результаты.** Введение глутамил-триптофана не оказало влияния на рост опухоли, но повлияло на клеточный состав иммунного инфильтрата на втором сроке исследования в виде снижения CD45<sup>+</sup>, повышения CD3<sup>+</sup>, снижения M2-подобных макрофагов с высоким уровнем экспрессии МНС. Оценка субпопуляций DN-клеток между двумя сроками анализа свидетельствует о росте DN в обеих группах. В контроле DN NK<sup>+</sup> снижались в 2 раза, чего не наблюдалось в опытной группе. Снижение уровней CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> и NK1.1<sup>+</sup> в обеих группах подтверждает прогрессирование опухоли. В контроле, в отличие от опытной группы, наблюдали резкое снижение CD3<sup>+</sup>, МНС II low CD206<sup>+</sup> и DN NK1.1<sup>+</sup>, что можно рассматривать как переход опухолевого микроокружения в иммуносупрессивное состояние.

EDN: WTSWSE



**Заключение.** Впервые на модели трансплантируемой сингенной опухоли у иммунокомпетентных животных проведена оценка изменений состава иммунного инфильтрата на фоне применения глутамил-триптофана. Установлены возможные эффекторные клетки, ответственные за реализацию иммуноопосредованного надзора за промоцией и прогрессией трансплантированной опухоли в условиях эксперимента *in vivo*.

**Ключевые слова:** глутамил-триптофан, сингенная опухоль MC38, иммунный инфильтрат, противоопухолевый иммунитет, регастим гастро, атрофический гастрит

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

---

---

## Assesment of changes in the pattern of immune cell infiltrate subpopulation in syngeneic MC38 colorectal cancer during course administration of glutamyl-tryptophan: an experimental study

S.A. Savelyev<sup>1</sup>, Ya.G. Murazov<sup>2</sup>, P.P. Beltiukov<sup>3</sup>, N.V. Baryshnikova<sup>4</sup>, S.V. Petlenko<sup>5</sup>

<sup>1</sup> JSCo Cytomed (11, 4 line of Vasilievsky Island, St. Petersburg, 199004, Russia)

<sup>2</sup> Scientific Production Association "Home of Pharmacy" (3, Zavodskaya Str., 245, Kuzmolovsky, Leningrad oblast, 188663, Russia)

<sup>3</sup> Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology (6/2, Zavodskaya Str., 93, Kuzmolovsky, Leningrad oblast, 188663, Russia)

<sup>4</sup> St. Petersburg State Pediatric Medical University (2, Litovskaya Str., St. Petersburg, 194100, Russia)

<sup>5</sup> S.N. Golikov Research Clinical Center of Toxicology (1, Bechtereva Str., St. Petersburg, 192019, Russia)

---

**For citation:** Savelyev S.A., Murazov Ya.G., Beltiukov P.P., Baryshnikova N.V., Petlenko S.V. Assesment of changes in the pattern of immune cell infiltrate subpopulation in syngeneic MC38 colorectal cancer during course administration of glutamyl-tryptophan: an experimental study. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2025;(12): 163–176. (In Russ.) doi: 10.31146/1682-8658-ecg-244-12-163-176

---

✉ **Corresponding**

**author:**

**Sergey A. Savelyev**

ssavelyev@cytomed.ru

**Sergey A. Savelyev**, PhD (Biol.)

**Yaroslav G. Murazov**, PhD (Biol.)

**Petr P. Beltiukov**, PhD (Med.), associate professor

**Natalia V. Baryshnikova**, PhD (Med.), associate professor

**Sergey V. Petlenko**, DSc (Med.), leading researcher

### Summary

Despite advances in gastric cancer screening and therapy, the search for effective methods for treating and preventing precancerous conditions, including chronic atrophic gastritis, remains an important challenge. Immunoprevention of cancer occupies a special place among strategies aimed at reducing the incidence of malignant neoplasms.

**The aim** of this study was to assess changes in the subpopulation composition of the immune infiltrate in a syngeneic tumor model during course administration of glutamyl-tryptophan in mice.

**Materials and Methods.** Tumor material was obtained from syngeneic MC38 colorectal cancer cells, transplanted intramammarily. Experimental animals received glutamyl-tryptophan (0.02 mg/kg), while control animals received saline. Repeated administrations were performed starting 14 days prior to tumor transplantation and continued until day 14 or day 21 after transplantation. Tumor growth kinetics and the subpopulation composition of the tumor immune infiltrate were assessed using flow cytometry.

**Results.** Glutamyl-tryptophan administration did not affect tumor growth, but altered the cellular composition of the immune infiltrate at the second time point, manifested as a decrease in CD45<sup>+</sup> cells, an increase in CD3<sup>+</sup> cells, and a reduction in M2-like macrophages with high MHC expression. Analysis of DN-cell subpopulations at both time points demonstrated an increase in DN cells in both groups. In controls, DN NK<sup>+</sup> cells decreased twofold, whereas no such decrease was observed in the experimental group. Reduced levels of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and NK1.1<sup>+</sup> cells in both groups confirmed tumor progression. In contrast to the experimental group, the control group exhibited a pronounced decline in CD3<sup>+</sup>, MHC II low CD206<sup>+</sup>, and DN NK1.1<sup>+</sup> cells, which may indicate a transition of the tumor microenvironment toward an immunosuppressive state.

**Conclusion.** For the first time, changes in the composition of the immune infiltrate were evaluated in a model of a transplantable syngeneic tumor in immunocompetent animals treated with glutamyl-tryptophan. The study identified

potential effector cell populations responsible for mediating immunosurveillance of tumor promotion and progression under in vivo experimental conditions.

**Keywords:** glutamyl-tryptophan, syngeneic MC38, immune infiltrate, antitumor immunity, regastim gastro, atrophic gastritis

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

## Введение

Хронический атрофический гастрит – распространенное предопухоловое состояние слизистой оболочки желудка, которое является важным фактором риска развития злокачественных новообразований (ЗНО) данной локализации [1, 2]. По данным GLOBOCAN в 2022 году было зарегистрировано более 968 000 новых случаев рака желудка и около 660 000 смертей от этого заболевания, что соответствует пятому ранговому месту в структуре онкологической заболеваемости и смертности в мире [3]. Кроме того, появляется все больше сведений о том, что атрофия слизистой оболочки желудка может быть ассоциирована с повышенной частотой появления полипов в кишечнике, что позволяет рассматривать атрофию желудка как фактор риска, повышающий вероятность развития колоректального рака [4]. Поиск эффективных и безопасных средств профилактики ЗНО желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) у пациентов с хроническим атрофическим гастритом является актуальной задачей современной гастроэнтерологии.

Единственный зарегистрированный оригинальный отечественный лекарственный препарат для лечения хронического атрофического гастрита – «Регастим Гастро» (действующее вещество: альфа-глутамил-триптофан) – продемонстрировал свою эффективность в ходе проведенного мультицентрового рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого клинического исследования в качестве фармакологического средства, способного не только сдерживать прогрессирование атрофических явлений в слизистой желудка, но и обеспечивающего регресс атрофии [5] за счет уменьшения хронического воспаления и стимуляции репаративных процессов. Согласно проведенным исследованиям, Регастим Гастро увеличивает количество желудочных желез, восстанавливая их морфологическую (клеточную) структуру и секреторную функцию с улучшением кислотопродукции [6]. Указанные эффекты позволяют предложить к обсуждению вопрос о дополнительном изучении препарата Регастим Гастро в качестве средства фармакологической коррекции предопухоловых состояний желудка и сочетанной профилактики ЗНО ЖКТ, что можно рассматривать как профилактику рака желудка [7].

Надзорная функция иммунной системы играет важную роль в эндогенной профилактике опухолей. Согласно гипотезе иммуноредактирования ЗНО, динамический процесс взаимодействия опухоли с компонентами иммунной системы организма-хозяина происходит в сложной многокомпонентной среде, называемой микроокружением опухоли [8]. Противоопухольевый иммунный ответ определяется балансом между основными эффекторными клетками (CD8<sup>+</sup> цитотоксическими Т-лимфоцитами) и иммуносупрессивными клетками, такими как M2-подобные макрофаги и регуляторные Т-клетки. Известно, например, что инфильтрация опухоли CD8<sup>+</sup> Т-клетками ассоциирована с благоприятным прогнозом, тогда как накопление

## Introduction

Chronic atrophic gastritis is a widespread precancerous condition of the gastric mucosa and a significant risk factor for the development of malignant neoplasms at this localization [1, 2]. According to GLOBOCAN, more than 968,000 new cases of gastric cancer and approximately 660,000 related deaths were recorded in 2022, placing gastric cancer fifth in global cancer incidence and mortality [3]. Furthermore, emerging evidence indicates that gastric mucosal atrophy may be associated with an increased frequency of intestinal polyps, suggesting that gastric atrophy may serve as a risk factor for colorectal cancer development [4]. The search for effective and safe approaches to preventing malignant neoplasms of the gastrointestinal tract (GIT) in patients with chronic atrophic gastritis therefore remains an important issue in modern gastroenterology.

The only original domestic pharmaceutical agent registered for the treatment of chronic atrophic gastritis – Regastim Gastro (active ingredient:  $\alpha$ -glutamyl-tryptophan) – has demonstrated efficacy in a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. It has been shown to not only inhibit the progression of atrophic changes in the gastric mucosa but also induce regression of atrophy [5] by reducing chronic inflammation and stimulating reparative processes. According to the conducted studies, Regastim Gastro increases the number of gastric glands, restoring their morphological (cellular) structure and secretory function, leading to improved acid production [6]. These effects provide a rationale for further investigation of Regastim Gastro as a pharmacological agent for correcting precancerous gastric conditions and for combined prevention of GIT malignancies, potentially contributing to gastric cancer prevention [7].

The surveillance function of the immune system plays a crucial role in endogenous tumor prevention. According to the cancer immunoeediting hypothesis, the dynamic interaction between a developing tumor and components of the host immune system occurs within a complex, multicomponent environment known as the tumor microenvironment [8]. Antitumor immune responses are determined by the balance between key effector cells (CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes) and immunosuppressive cells such as M2-like macrophages and regulatory T cells. For example, tumor infiltration by CD8<sup>+</sup> T cells is associated with favorable prognosis,

M2-макрофагов способствует усилению иммуносупрессии, ангиогенеза и росту опухоли [9].

Ранее было показано, что глутамил-триптофан участвует в механизмах формирования адаптивного иммунитета путем стимуляции Т-лимфоцитов, экспрессирующих дифференцировочные антигены CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> у пациентов с различными иммунодефицитными состояниями [10]. Учитывая эти иммуномодулирующие свойства препарата, а также тот факт, что иммунная система может как стимулировать (например, при хроническом воспалении), так и ингибировать процессы канцерогенеза, перспективной видится оценка влияния глутамил-триптофана на состав клеточного иммунного инфильтрата при моделировании опухолевого роста в эксперименте *in vivo*. Выбранная для исследования сингенная клеточная линия MC38 широко используется в экспериментальной иммуноонкологии, в частности для оценки состава иммунного инфильтрата опухоли под действием иммуотропных средств.

**Цель исследования** – оценить изменение субпопуляционного состава иммунного инфильтрата сингенной опухоли MC38, трансплантированной интрамаммарно, на фоне курсового применения глутамил-триптофана у иммунокомпетентных самок мышей C57BL/6.

## Материалы и методы

Исследование проведено на 25 половозрелых мышках-самках линии C57BL/6 SPF-категории (Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН, г. Пущино, Московская обл.), которые были разделены на две группы: группа № 1 (контрольная, n = 12) и группа № 2 (опытная, n = 13). Животных содержали в соответствии с Директивой 2010/63/EU [11] в контролируемых условиях окружающей среды. В период карантина, адаптации и основного эксперимента животные находились в индивидуально вентилируемых клетках (ИВК). Исследование было одобрено для проведения на заседании биоэтической комиссии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (заключение БЭК № 1.10/25). В качестве источника опухолевого материала использовали сингенную клеточную линию MC38 (колоректальный рак) (Kerafast, США). Культивирование клеток проводили в соответствии с паспортом клеточной линии.

Клеточную суспензию  $1 \times 10^7$  /мл трансплантировали мышам опытной и контрольной групп интрамаммарно (в жировую клетчатку правой брюшной молочной железы) в объеме 100 мкл на животное.

Активная фармацевтическая субстанция «Тимоген натрий» (альфа-глутамил-триптофан натрия) серии 1020425 (АО «МБНПК «Цитомед», Россия), разведенная в 0,9% растворе натрия хлорида, вводилась внутривентриально в дозе 0,02 мг/кг. Введения были многократные, через день, начиная за 14 дней до трансплантации MC38 и до 14-го или 21-го дня после трансплантации опухоли. Контрольные животные получали 0,9% стерильный раствор натрия хлорида в объеме 10 мл/кг по аналогичной схеме.

У животных регистрировали динамику массы тела, энграфмент (степень приживления) и сроки появления измеряемых опухолей. Измерения линейных размеров опухоли проводили с помощью цифрового

whereas accumulation of M2 macrophages promotes immunosuppression, angiogenesis, and tumor progression [9].

Previous studies have shown that glutamyl-tryptophan is involved in mechanisms of adaptive immunity, stimulating T lymphocytes expressing CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> differentiation antigens in patients with various immunodeficiency conditions [10]. Given these immunomodulatory properties, and considering that the immune system may either promote (e.g., through chronic inflammation) or inhibit carcinogenesis, evaluating the impact of glutamyl-tryptophan on the cellular composition of tumor immune infiltrates in an *in vivo* tumor growth model is of particular interest. The syngeneic MC38 cell line selected for this study is widely used in experimental immuno-oncology, particularly for assessing tumor immune infiltrates under the influence of immunotropic agents.

**The aim of the study** was to evaluate changes in the subpopulation composition of the immune infiltrate in intramammary-transplanted syngeneic MC38 tumors following repeated administration of glutamyl-tryptophan in immunocompetent female C57BL/6 mice.

## Materials and methods

The study was conducted on 25 adult female C57BL/6 mice of SPF category (Laboratory Animal Breeding Facility of the Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Pushchino, Moscow Region). The animals were divided into two groups: Group 1 (control, n = 12) and Group 2 (experimental, n = 13). The animals were housed under controlled environmental conditions in accordance with Directive 2010/63/EU [11]. During the quarantine, acclimatization, and main experimental periods, the animals were kept in individually ventilated cages (IVCs). The study was approved by the Bioethics Committee of JSC “SPA “Home of Pharmacy” (Bioethics Committee approval No. 1.10/25).

A syngeneic cell line MC38 (colorectal carcinoma) (Kerafast, USA) was used as the source of tumor material. Cell culture procedures were performed according to the cell line certificate. A cell suspension ( $1 \times 10^7$  cells/mL) was transplanted intramammarily (into the adipose tissue of the right abdominal mammary gland) at a volume of 100  $\mu$ L per animal in both the experimental and control groups.

The active pharmaceutical substance “Timogen sodium” ( $\alpha$ -glutamyl-tryptophan sodium), batch 1020425 (JSC Cytomed, Russia), diluted in 0.9% sodium chloride solution, was administered intraperitoneally at a dose of 0.02 mg/kg. The administrations were repeated every other day, starting 14 days before MC38 transplantation and continuing until day 14 or day 21 after tumor transplantation. Control animals received 0.9% sterile sodium chloride solution at a dose of 10 mL/kg following the same schedule.

Body weight dynamics, engraftment (implant survival rate), and the time of appearance of measurable tumors were recorded. Linear tumor

штангенциркуля SHAN (Китай). Объем опухоли на каждой временной точке определяли по формуле:

$$V = \frac{A \times B^2}{2}$$

где  $V$  – объем опухоли,  $\text{мм}^3$ ;  $A$  – наибольший диаметр опухоли,  $\text{мм}$ ;  $B$  – перпендикулярный ему диаметр,  $\text{мм}$ .

Через сутки после последнего введения препарата животные подвергались эвтаназии: половина животных из контрольной и опытной групп на день 15, другая половина – на день 20. Опухолевый узел, а также селезенка извлекались для определения их массы и массового коэффициента. Фрагменты опухолевой ткани использовались для дальнейшего цитометрического анализа иммунного инфильтрата опухоли и включали определение клеток с иммунофенотипами: CD3+ T-клетки, CD4+ T-клетки, CD8+ T-клетки, CD45+ иммунные клетки, CD11b+ миелоидные клетки, NK1.1+ NK-клетки, CD19+ B-клетки, макрофаги F4/80+, F4/80- миелоидные клетки, M2-подобные макрофаги CD206+, MHC II high и low макрофаги, а также MHC II low CD206+ M2-like и MHC II high CD206+ M2-like. Проточную цитометрию выполняли с использованием цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США) в конфигурации V5-B5-R3. Клетки обрабатывали флуоресцентно меченными антителами, предварительно блокировав Fc-рецепторы при помощи 5% термоинактивированной сывороткой крови крыс. Использовали антитела: APC/Cy7 anti-mouse CD45, Brilliant Violet 510™ anti-mouse/human CD11b, FITC anti-mouse NK-1.1, APC anti-mouse CD3, PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD4, PE/Cy7 anti-mouse CD8a, Brilliant Violet 510™ anti-mouse CD19, PE anti-mouse F4/80, APC anti-CD206, Alexa Fluor MHC II (BioLegend, США). Подготовленную суспензию меченных антителами клеток вносили в планшет и проводили анализ. Селекцию субпопуляций выполняли при помощи последовательного гейтирования записанных событий с учетом результатов прямого и бокового светорассеяния и данных регистрации флуоресценции. Определяли одиночные события, различные клеточные популяции дифференцировали с использованием программного обеспечения CytExpert (Beckman Coulter).

Субпопуляции клеток идентифицировали на основе одновременной экспрессии нескольких маркеров. Стандартизацию по количеству клеток выполняли по маркеру CD45 на основе регистрации не менее 10000 событий. Маркер CD45 экспрессируется на большинстве иммунных клеток, за исключением натуральных киллеров (NK-клеток), которые определяли с использованием специфических антител к антигену NK 1.1 непосредственно из популяции всех одиночных клеток.

Лимфоциты и клетки миелоидного ряда дифференцировали по наличию одного из трёх антигенов: CD3 для T-клеток, CD19 для B-клеток и CD11b для миелоидных клеток. Внутри субпопуляции CD3+ T-лимфоцитов определяли общую субпопуляцию CD3+CD8+ T-клеток (включающую T-цитотоксические, регуляторные и T-клетки памяти), во вторую субпопуляцию T-клеток (CD3+CD4+) входят Th1 и Th2 клетки, а также CD4+ T-клетки памяти, регуляторные (CD4+ Treg) и наивные CD4+ T-клетки. В общей популяции CD45+CD3+ клеток также выявляются клетки, у которых нет ни CD4, ни CD8 маркеров.

dimensions were measured with a digital caliper (SHAN, China). Tumor volume at each time point was calculated using the formula:

where  $V$  – tumor volume ( $\text{mm}^3$ ),  $A$  – largest tumor diameter ( $\text{mm}$ ),  $B$  – perpendicular diameter ( $\text{mm}$ ).

Twenty-four hours after the final administration of the drug, the animals were euthanized: half of the animals from the control and experimental groups on day 15, and the other half on day 20. The tumor node and spleen were excised for determining their mass and mass coefficients. Tumor tissue fragments were used for subsequent flow cytometric analysis of the tumor immune infiltrate. The analysis included identification of cells with the following immunophenotypes: CD3+ T-cells, CD4+ T-cells, CD8+ T-cells, CD45+ immune cells, CD11b+ myeloid cells, NK1.1+ NK cells, CD19+ B-cells, F4/80+ macrophages, F4/80- myeloid cells, CD206+ M2-like macrophages, MHC II high and MHC II low macrophages, as well as MHC II low CD206+ and MHC II high CD206+ M2-like subsets.

Flow cytometry was performed using a CytoFLEX cytometer (Beckman Coulter, USA), configuration V5-B5-R3. Before staining, cells were incubated with 5% heat-inactivated rat serum to block Fc receptors. The following fluorochrome-labeled antibodies were used: APC/Cy7 anti-mouse CD45, Brilliant Violet 510™ anti-mouse/human CD11b, FITC anti-mouse NK1.1, APC anti-mouse CD3, PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD4, PE/Cy7 anti-mouse CD8a, Brilliant Violet 510™ anti-mouse CD19, PE anti-mouse F4/80, APC anti-mouse CD206, Alexa Fluor MHC II (BioLegend, USA).

Prepared antibody-stained cell suspensions were plated into a 96-well plate and analyzed. Subpopulation selection was performed by sequential gating of recorded events, taking into account forward and side scatter parameters and fluorescence signals. Single events were identified, and different cell populations were differentiated using CytExpert software (Beckman Coulter).

Subpopulations were identified based on co-expression of several markers. Standardization by cell number was performed using CD45+ cells, with at least 10,000 events recorded. The CD45 marker is expressed by most immune cells except natural killer (NK) cells, which were identified using specific anti-NK1.1 antibodies directly from the population of all single cells.

Lymphocytes and myeloid cells were differentiated based on expression of one of three antigens: CD3 for T-cells, CD19 for B-cells, and CD11b for myeloid cells. Within the CD3+ T-cell population, the CD3+CD8+ subset (including cytotoxic, regulatory, and memory T-cells) and the CD3+CD4+ subset (Th1, Th2, CD4+ memory T-cells, regulatory CD4+ Treg, and naïve CD4+ T-cells) were analyzed. In the total CD45+CD3+ population, cells lacking both CD4 and CD8 markers were also present.

В-клетки выделяли из популяции CD45+ клеток панели В на основании подтверждения совместной экспрессии маркеров CD19 и МНСII. Таким образом, фенотип В-клеточной популяции – CD45+CD19+МНСII+. Для определения рецепторов МНС II класса использовали антитела Alexa Fluor® 488 anti-mouse I-A/I-E antibody, обладающие реактивностью в отношении молекул главного комплекса гистосовместимости II класса, характерных для мышей C57BL.

В субпопуляции миелоидных клеток выделяли группу макрофагов (по наличию специфического антигена F4/80+) и других миелоидных клеток (F4/80-). Среди макрофагов определяли также M2-подобные макрофаги, имеющие маркер CD206 и M1 макрофаги (F4/80+CD206-). Внутри M1 и M2 субпопуляций макрофагов определяли также МНСII low и МНСII high клетки по уровню флуоресценции при использовании антител Alexa Fluor® 488 anti-mouse I-A/I-E antibody.

Статистическую обработку выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism версии 9.1.1 (GraphPad Software, США). Если не указано иного, количественные данные представлены в виде Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>), где Me – медиана, Q<sub>1</sub> и Q<sub>3</sub> – первый и третий квартили, соответственно. Для определения степени отличия распределения от нормального использовали критерий Шапиро-Уилка. Межгрупповые сравнения осуществляли при помощи t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни. Все критерии двусторонние, достигнутое р-значение < 0,05 считали статистически значимым.

## Результаты

Динамика массы тела животных статистически не отличалась между экспериментальной группой и контролем в оба наблюдаемых периода ( $t_{(23)} = 0,95$ ;  $p = 0,35$ ).

Энграфтмент клеток МС38 в экспериментальной и контрольной группах составил 100%. Измеряемые опухоли появились на 6 день после интрамаммарной трансплантации. Динамика роста МС38 у мышей, получавших глутамил-триптофан статистически не отличалась от контрольной группы в реперных точках исследования: на 15-й ( $t_{(23)} = 1,67$ ;  $p = 0,100$ ) и на 20-й ( $t_{(11)} = 0,39$ ;  $p = 0,701$ ) день эксперимента (рис. 1 и 2).

B-cells were identified within the CD45+ population of Panel B based on the co-expression of CD19 and MHC II markers. Thus, the B-cell phenotype was CD45+CD19+MHCII+. For detecting MHC class II receptors, Alexa Fluor® 488 anti-mouse I-A/I-E antibodies were used, specific for major histocompatibility complex class II molecules of C57BL mice.

Within the myeloid cell population, macrophages were identified by expression of F4/80+, and other myeloid cells by F4/80-. Among macrophages, M2-like macrophages expressing CD206 and M1 macrophages (F4/80+CD206-) were distinguished. Within the M1 and M2 subpopulations, MHC II low and MHC II high cells were identified based on fluorescence intensity using Alexa Fluor® 488 anti-mouse I-A/I-E antibodies.

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 9.1.1 (GraphPad Software, USA). Unless stated otherwise, quantitative data are presented as Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>), where Me is the median, and Q<sub>1</sub> and Q<sub>3</sub> are the first and third quartiles, respectively. The Shapiro-Wilk test was used to assess deviation from normal distribution. Intergroup comparisons were carried out using Student's *t*-test or the Mann-Whitney *U*-test. All tests were two-sided, and a *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

Body weight dynamics did not differ statistically between the experimental and control groups during either observation period ( $t(23) = 0.95$ ;  $p = 0.35$ ).

The engraftment of MC38 cells in the experimental and control groups was 100%. Measurable tumors appeared on day 6 after intramammary transplantation. Tumor growth dynamics in mice receiving glutamyl-tryptophan did not differ statistically from the control group at the key time points of the study: day 15 ( $t(23) = 1.67$ ;  $p = 0.100$ ) and day 20 ( $t(11) = 0.39$ ;  $p = 0.701$ ) (figs. 1 and 2).

Рисунок 1.

Динамика роста колоректальной сингенной опухоли МС38, трансплантированной интрамаммарно. Данные представлены в виде Mean ± SEM.

Обозначения:

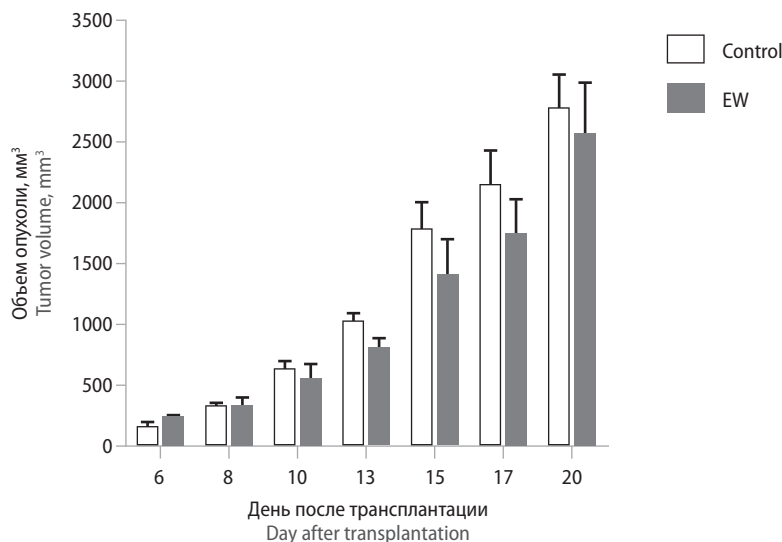
Control – контрольная группа, EW – экспериментальная группа (глутамил-триптофан)

Figure 1.

Growth dynamics of the syngeneic colorectal tumor MC38 transplanted intramammarily. Data are presented as Mean ± SEM.

Designations:

Control – control group, EW – experimental group (glutamyl-tryptophan).

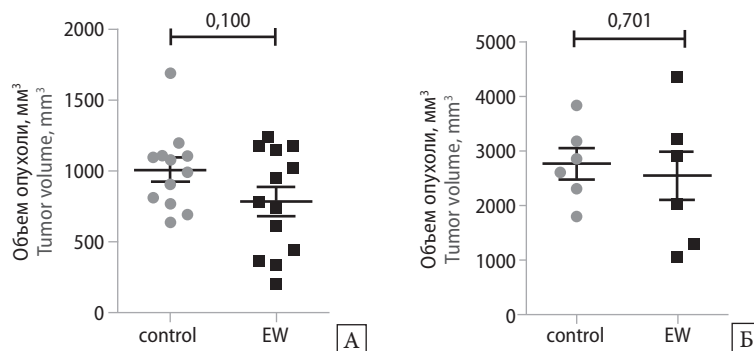


**Рисунок 2.** Графики распределения индивидуальных значений объема опухоли МС38, трансплантированной интрамаммарно, на двух точках эвтаназии: на 15 день (А) и на 20 день (Б). Данные представлены в виде Mean ± SEM.

**Обозначения:** Control – контрольная группа, EW – экспериментальная группа (глутамил-триптофан)

**Figure 2.** Distribution plots of individual tumor volume values for intramammarily transplanted MC38 tumors at two euthanasia time points: day 15 (A) and day 20 (B). Data are presented as Mean ± SEM.

**Designations:** Control – control group, EW – experimental group (glutamyl-tryptophan).

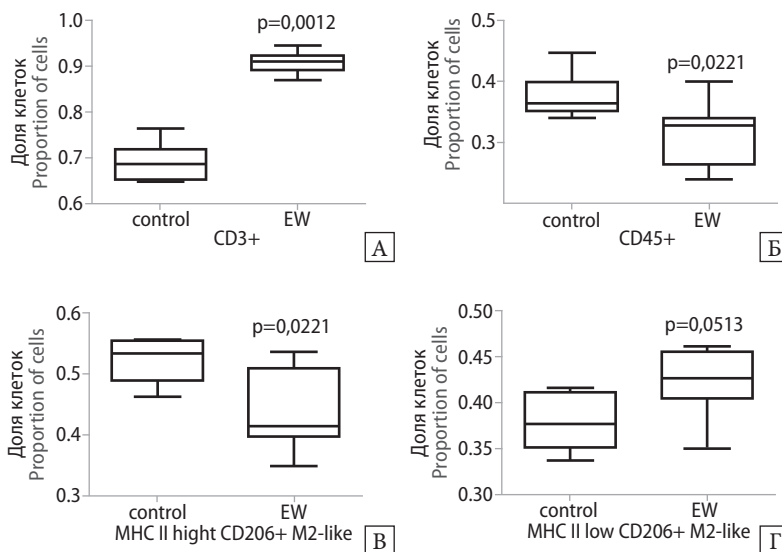


**Рисунок 3.** Изменения доли клеток каждой субпопуляции иммунного инфильтрата на финальном сроке исследования (день 20).

**Обозначения:** Control – контрольная группа, EW – экспериментальная группа (глутамил-триптофан).

**Figure 3.** Changes in the proportion of cells in each subpopulation of the immune infiltrate at the final study time point (day 20).

**Designations:** Control – control group, EW – experimental group (glutamyl-tryptophan).



### Результаты цитометрического анализа

По результатам сравнительной оценки субпопуляционного состава клеток иммунного инфильтрата на первом сроке исследования (день 15) статистически достоверной разницы между исследуемыми группами животных выявлено не было. Однако на финальном сроке исследования (день 20) были выявлены статистически значимые различия между экспериментальной группой и контролем по ряду популяций и субпопуляций клеток иммунного инфильтрата. Так, в группе, получавшей глутамил-триптофан, доля клеток с иммунофенотипом CD45+ была снижена ( $U: 5.000; p = 0,022$ ), а доля Т-клеток с экспрессией CD3+ (TCR), наоборот, повышена ( $U: 0.000; p = 0,001$ ) в сравнении с контролем (рис. 3). Сравнение субпопуляций макрофагов в иммунном инфильтрате показало, что в группе, получавшей глутамил-триптофан, доля субпопуляции M2-подобных макрофагов с высоким уровнем экспрессии МНС была несколько снижена ( $U: 5.000; p = 0,022$ ), в то время как доля субпопуляции M2-подобных макрофагов с низким уровнем экспрессии МНС имела тенденцию к увеличению ( $U: 7.000; p = 0,051$ ).

Стандартный подход к гейтированию субпопуляций не позволил провести объективную оценку изменений субпопуляций клеток, экспрессирующих маркеры CD45 и CD3, но не имеющих достаточного количества рецепторов CD4 и CD8. Трудность интерпретации связана с тем, что часть этих клеток экспрессирует дифференцировочный кластер естественных киллеров NK1.1, но, при этом, функционально натуральными киллерами не является. Это так называемые «двойные негативные»

### Flow cytometry results

According to a comparative evaluation of immune infiltrate subpopulations on the first observation point (day 15), no statistically significant differences between the study groups were detected. However, at the final observation point (day 20), statistically significant differences between the experimental and control groups were observed for several populations and subpopulations of the immune infiltrate. Specifically, in the glutamyl-tryptophan group, the proportion of CD45+ cells was reduced ( $U = 5.000; p = 0.022$ ), whereas the proportion of CD3+ (TCR+) T-cells was increased ( $U = 0.000; p = 0.001$ ) relative to the control (fig. 3). Comparison of macrophage subpopulations revealed that in the glutamyl-tryptophan group, the proportion of M2-like macrophages with high MHC expression was somewhat reduced ( $U = 5.000; p = 0.022$ ), while the proportion of M2-like macrophages with low MHC expression showed a trend toward increase ( $U = 7.000; p = 0.051$ ).

A standard gating approach did not allow objective assessment of changes in subpopulations of cells expressing CD45 and CD3 but lacking sufficient levels of CD4 and CD8. Interpretation is complicated by the fact that some of these cells express the natural killer differentiation marker NK1.1, but functionally are not true NK cells. These are the so-called double-negative

(DN) клетки, среди которых могут присутствовать NKT-клетки с фенотипом CD45+CD3+CD4-CD8-NK1.1+, а также DN клетки с фенотипами CD45+CD3+CD4-CD8-NK1.1-. Происхождение этих клеток может быть связано с «незрелостью» Т-клеток или с утратой (снижением способности к экспрессии или shedding) дифференцировочных кластеров маркеров CD4 или CD 8 [12]. В субпопуляции DN Т-клеток, которая в опухолевой ткани может становиться значительной, присутствуют Т-клетки памяти и Treg (вариант CD17) клетки негативные по CD4 и CD8, а также NK Т-клетки (имеющие у человека фенотип CD3+CD16+CD56+CD45+), которые могут активироваться ксеноантигенами и приводить к лизису аутологических клеток иммунной системы [13].

Учитывая ограничения, связанные с применяемым в исследовании набором антител, сложно дать однозначную развернутую характеристику и оценку динамики микроокружения очага опухолевого роста, учитывая всю возможную разнообразие клеточных маркеров этих клеток. Однако доля таких DN Т-клеток в опухолевом инфильтрате намного более значительна, чем в периферической крови, поэтому оценивали изменения, связанные с этими клетками в процессе роста сингенной опухоли в отсутствие иммуномодулятора и при его внутрибрюшинном введении. С этой целью при гейтировании в панели А выделяли CD4- и CD8- клетки в популяциях, имеющих маркеры CD45 и CD3. Внутри популяции Т-лимфоцитов оценивали доли клеток, экспрессирующих маркер NK1.1 (NK1.1+) и не имеющих такого маркера (NK1.1-).

Первичный отбор осуществлялся по единичным клеткам с исключением дуплетов, затем по маркеру CD45 выделяли популяцию CD45+ иммунных клеток и в данной популяции оценивали распределение лимфоцитов с экспрессией NK1.1+ и NK1.1-. В результате такого подхода были получены данные о количестве «истинных» NK-клеток и клеток, позитивных по антигенам NK1.1 и CD45. В популяции Т-клеток выделяли дочерние субпопуляции CD4+ и CD8+, а в субпопуляциях CD4- и CD8-, в свою очередь, выделяли клетки, позитивные и негативные по маркеру NK1.1. В результате во всех группах образцов были выделены субпопуляции DN NK+ и DN NK-, которые наиболее интересны с точки зрения характеристики клеточного иммунного инфильтрата, вследствие их выраженной автономной противоопухолевой активности.

Сравнение между группами в реперных точках исследования не выявило статистически значимых различий содержания данных популяций клеток. Однако следует отметить, что доля DN Т-клеток в клеточном инфильтрате довольно велика и это может свидетельствовать о значительном вкладе этих клеток в угнетение презентации опухолевых антигенов в процессе роста трансплантированной сингенной опухоли, поскольку для DN Т-клеток характерна функция подавления иммунного ответа.

Сравнение результатов цитометрического анализа в день 15 и в день 20 подтверждают прогрессирование опухоли в динамике – об этом свидетельствуют снижение уровней CD3+CD8+ и NK1.1+ в обеих группах (рис. 4 В, 3). Иными словами, глутамил-триптофан не сдерживал развитие опухоли. С другой стороны, в контрольной группе идет резкое снижение со временем таких показателей как CD3+ ( $U = 1.000$ ;  $p = 0,004$ ), MHC II low CD206+ ( $U = 3.000$ ;  $p = 0,015$ ) и DN NK1.1+ ( $U = 3.000$ ;  $p = 0,015$ ), что можно рассматривать как переход опухолевого микроокружения в иммуносупрессивное состояние, типичное

(DN) cells, which may include NKT cells with the phenotype CD45+CD3+CD4-CD8-NK1.1+, as well as DN cells with the phenotypes CD45+CD3+CD4-CD8-NK1.1-. Their origin may be associated with T-cell “immaturity” or with loss (reduced ability to express or shedding) of CD4 or CD8 markers [12]. The DN T-cell subpopulation – which can become substantial in tumor tissue – may include memory T-cells and CD17-variant Tregs lacking CD4 and CD8, as well as NK T-cells (in humans expressing CD3+CD16+CD56+CD45+), which can be activated by xenoantigens and induce lysis of autologous immune cells [13].

Given the limitations associated with the antibody panel used in the study, it is difficult to provide an unambiguous and comprehensive characterization of the tumor microenvironment dynamics capturing the full diversity of potential cellular markers. However, the proportion of such DN T-cells in the tumor infiltrate is substantially higher than in peripheral blood; therefore, we assessed changes related to these cells during syngeneic tumor growth in the absence or presence of the immunomodulator. For this purpose, during gating in Panel A, CD4-CD8- cells were identified within CD45+CD3+ populations. Within the T-cell population, we then evaluated the fractions of NK1.1+ and NK1.1- cells.

Initial gating was performed on singlets with exclusion of doublets. CD45+ immune cells were then identified, and within this population the distribution of NK1.1+ and NK1.1- lymphocytes was assessed. This approach yielded quantitative data on “true” NK cells and cells positive for NK1.1 and CD45 antigens. Within the T-cell population, CD4+ and CD8+ subsets were identified, and within each of these subsets we further distinguished NK1.1+ and NK1.1- cells. As a result, DN NK+ and DN NK- subpopulations were identified in all sample groups – of particular interest due to their pronounced autonomous antitumor activity.

Comparison between groups at the study time points did not reveal statistically significant differences in the abundance of these populations. However, the proportion of DN T-cells in the infiltrate was notably high, which may indicate a substantial contribution of these cells to suppression of tumor antigen presentation during the growth of the transplanted syngeneic tumor, since DN T-cells are known to suppress immune responses.

A comparison of flow cytometry data between day 15 and day 20 confirmed dynamic tumor progression – indicated by a decrease in CD3+CD8+ and NK1.1+ levels in both groups (fig. 4B, 4Z). In other words, glutamyl-tryptophan did not inhibit tumor development. On the other hand, in the control group a pronounced decrease over time was observed in CD3+ ( $U = 1.000$ ;  $p = 0.004$ ), MHC II low CD206+ ( $U = 3.000$ ;  $p = 0.015$ ), and DN NK1.1+ cells ( $U = 3.000$ ;  $p = 0.015$ ), which can be interpreted as a transition of the tumor microenvironment toward an immunosuppressive

Рисунок 4.

Оценка динамических изменений состава иммунных клеток, инфильтрующих опухоль.

Обозначения:

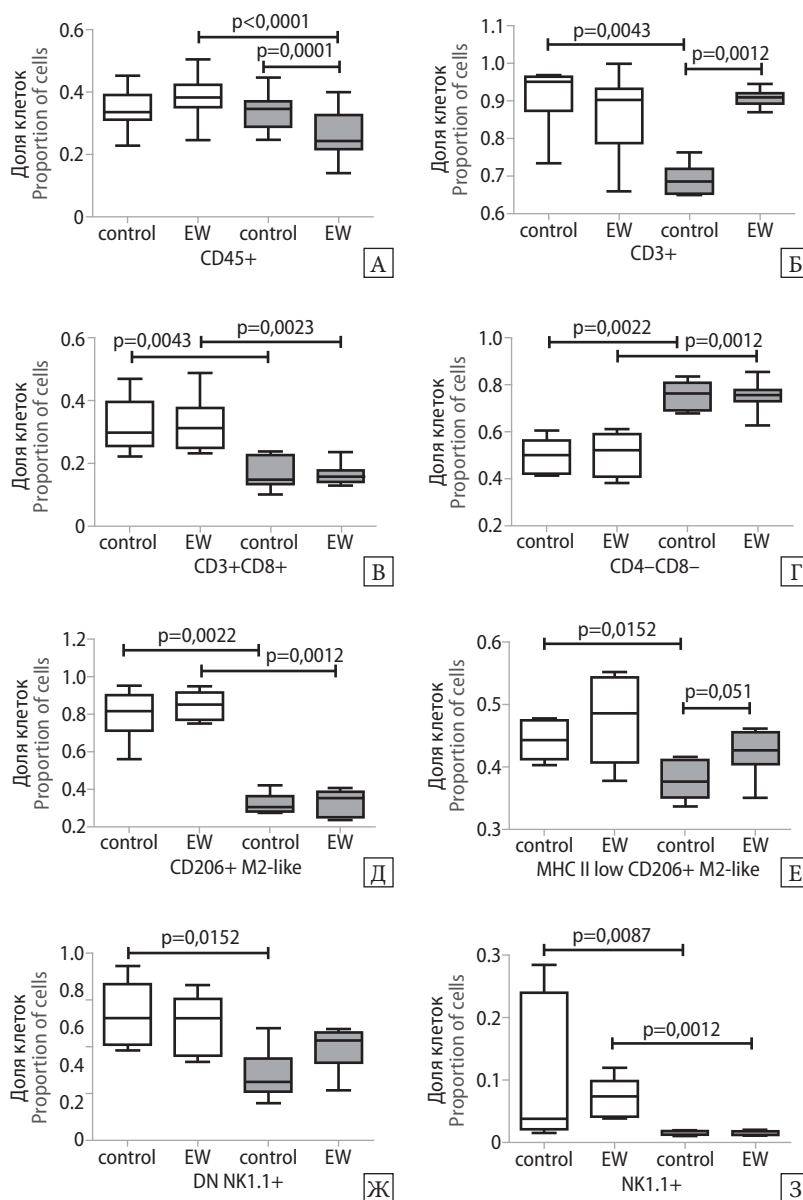
Control – контрольная группа, EW – экспериментальная группа (глутамил-триптофан); box-plot белого цвета соответствует дню 15, серого цвета – дню 20 эксперимента.

Figure 4.

Assessment of dynamic changes in the composition of immune cells infiltrating the tumor.

Designations:

Control – control group, EW – experimental group (glutamyl-tryptophan); the white box plot corresponds to day 15, and the gray box plot corresponds to day 20 of the experiment.



для прогрессирующих опухолей (рис. 4 Б, Е и Ж). Однако, в группе, получавшей глутамил-триптофан, такого снижения не наблюдалось. Вероятно, препарат каким-то образом «сдерживал» истощение иммунной системы в опухолевом инфильтрате.

state typical of progressing tumors (fig. 4B, 4E, 4G). However, in the group receiving glutamyl-tryptophan, no such decline was observed. The compound likely “buffered” or mitigated immune exhaustion within the tumor infiltrate.

## Обсуждение

Гипотеза иммуноредактирования злокачественных новообразований постулирует, что иммунная система контролирует не только рост опухоли, но и ее качественный состав [14]. Концепция предполагает наличие трех фаз взаимоотношений опухоли и иммунной системы: элиминация (до набора опухолью «критической массы»), равновесие (в период достижения «критической массы») и уклонение из-под иммунологического надзора (избегание – при больших размерах опухоли). В фазе элиминации трансформированные клетки погибают под действием противоопухолевых иммунных эффекторных механизмов. Некоторые из этих клеток могут выжить и при дальнейшей пролиферации войти в фазу

## Discussion

The hypothesis of cancer immunoeediting posits that the immune system controls not only tumor growth but also its qualitative composition [14]. This concept assumes the existence of three phases in tumor – immune system interactions: elimination (prior to the tumor reaching a “critical mass”), equilibrium (during the attainment of this “critical mass”), and escape from immunological surveillance (immune evasion at larger tumor sizes). In the elimination phase, transformed cells die under the action of antitumor immune effector mechanisms. Some of these cells may survive and, upon further proliferation, enter

равновесия, в которой образуются варианты опухолевых клеток, способные избегать иммунной атаки. В фазе избегания опухоль прогрессивно растет из-за усиления локальной иммуносупрессии и, возможно, отсутствия экспрессии антигенных детерминант, способных активизировать иммунокомпетентные клетки, что позволяет уклоняться от противоопухолевого иммунного ответа. Перспективным направлением в борьбе с злокачественными новообразованиями является иммунопрофилактика и иммунотерапия онкологических заболеваний. Геномная нестабильность является отличительной чертой рака и связана с иммунным ответом. Нестабильные геномы опухолевых клеток располагают к развитию множества мутационных изменений, которые производят опухолеспецифические антигены (ТААs), уникальные для опухолевого генома и которые используются в качестве мишеней для иммунной системы [15]. Иммунопрофилактика активизирует распознавание и ответ иммунной системы на опухолеспецифические антигены с целью предотвращения возникновения опухоли или злокачественной трансформации клеток, а также их дезинтеграцию клетками иммунной системы путем развития цитотоксичности и последующего фагоцитоза. Фармацевтическая промышленность в настоящее время проявляет интерес к изучению и разработке средств иммунопрофилактики и иммунного «перехвата» злокачественных новообразований. Новая стратегия включает усиление иммунологического надзора за процессами канцерогенеза с помощью фармакологических средств, одним из перспективных классов которых могут выступать пептиды с иммуномодуляторными и антиангиогенными свойствами [16].

Известно, что глутамил-триптофана способен тормозить спонтанный и индуцированный канцерогенез в экспериментах *in vivo* [17, 18]. Например, имеются данные о снижении частоты и множественности опухолей головного мозга, почек и пищевода [19], гемобластозов и лимфом [20] на фоне его применения. Считается, что этот дипептид обладает не только иммуномодулирующими, но и антиангиогенными свойствами, реализуемыми через ингибирование фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) – одного из главных регуляторов ангиогенеза [18, 21, 22]. Это свойство рассматривается как желательное для всех потенциальных медикаментозных средств, используемых в терапии онкологических заболеваний, и особенно агентов пептидной природы [16]. Однако описанные в литературе механизмы антиангиогенного действия глутамил-триптофана носят противоречивый характер. Так, согласно исследованию S. Khedr с соавторами [23] глутамил-триптофан оказывает слабое ингибирующее влияние на VEGF, однако в работе A. Ferrario с соавторами этот эффект не подтвердился [22]. При проведении клинического исследования фазы II терапия глутамил-триптофаном приводила к снижению уровня VEGF в плазме крови пациентов, страдающих метастатическим почечноклеточным раком [21]. С другой стороны, известно, что глутамил-триптофан оказывал стимулирующее влияние на спонтанный уровень ICAM-1 (CD54) в мононуклеарах [24, 25], а VEGF обычно тоже усиливает экспрессию ICAM-1 и повышает адгезию лейкоцитов к эндотелию сосудов [26]. Поэтому точные механизмы действия глутамил-триптофана в отношении VEGF-сигналинга остаются неизвестными.

Изучение иммуноопосредованных эффектов глутамил-триптофана у мышей с трансплантированной

the equilibrium phase, during which variants of tumor cells arise that are capable of avoiding immune attack. In the escape phase, the tumor grows progressively due to enhanced local immunosuppression and possibly a lack of expression of antigenic determinants able to activate immunocompetent cells, allowing it to evade antitumor immune responses.

A promising direction in combating malignant neoplasms is immunoprevention and immunotherapy of cancer. Genomic instability is a hallmark of cancer and is associated with immune responses. Unstable tumor genomes predispose to the development of numerous mutational alterations that give rise to tumor-associated antigens (TAAs), which are unique to the tumor genome and serve as targets for the immune system [15]. Immunoprevention enhances the recognition of and immune response to tumor-specific antigens in order to prevent tumor initiation or malignant transformation of cells, as well as to promote their disintegration by immune effector cells through cytotoxicity followed by phagocytosis. The pharmaceutical industry has shown increasing interest in the development of agents for immunoprevention and immune “interception” of malignant neoplasms. The new strategy includes strengthening immunological surveillance over carcinogenesis using pharmacological agents, among which peptides with immunomodulatory and antiangiogenic properties may represent a promising class [16].

It is known that glutamyl-tryptophan is capable of inhibiting spontaneous and induced carcinogenesis in *in vivo* experiments [17, 18]. For example, there is evidence for reduced incidence and multiplicity of brain, renal, and esophageal tumors [19], as well as of hemoblastoses and lymphomas [20] upon its administration. This dipeptide is thought to possess not only immunomodulatory but also antiangiogenic properties mediated through inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), one of the key regulators of angiogenesis [18, 21, 22]. This feature is considered desirable for all potential therapeutic agents used in oncology, particularly those of peptide origin [16]. However, the mechanisms of the antiangiogenic activity of glutamyl-tryptophan described in the literature are contradictory. For instance, according to the study by S. Khedr et al. [23], glutamyl-tryptophan exerts a weak inhibitory effect on VEGF, whereas the work of A. Ferrario et al. did not confirm this finding [22]. In a phase II clinical trial, therapy with glutamyl-tryptophan reduced plasma VEGF levels in patients with metastatic renal cell carcinoma [21]. On the other hand, glutamyl-tryptophan has been shown to stimulate spontaneous ICAM-1 (CD54) expression in mononuclear cells [24, 25], and VEGF typically also enhances ICAM-1 expression and increases leukocyte adhesion to vascular endothelium [26]. Therefore, the exact mechanisms of glutamyl-tryptophan action on VEGF signaling remain unknown.

The study of immuno-mediated effects of glutamyl-tryptophan in mice bearing

интрамаммарно сингенной линией колоректального рака MC38 показало, что препарат не оказывает заметного влияния на рост трансплантированной опухоли. Такие показатели как объем опухоли, масса опухолевого узла и массовый коэффициент опухоли на момент окончания наблюдений статистически не различались между группами. При этом признаки прогрессии опухоли по анализу клеточного опухолевого инфильтрата – снижение NK1.1+ и CD3+CD8+ наблюдались как в контроле, так и в группе, получавшей глутамил-триптофан. Необходимо отметить, что данная сингенная опухоль характеризуется быстрым агрессивным ростом, кроме того, в исследовании изучено влияние курсового введения глутамил-триптофана на состав иммунного инфильтрата «готовой» сингенной опухоли, трансплантированной интрамаммарно, минуя этап инициации и промоции канцерогенеза. Для полного понимания места исследуемого препарата в функционировании противоопухолевого иммунитета, необходимо проведение исследования на аутохтонных (спонтанных) моделях (канцероген-индуцированных или используя генетически-модифицированные линии животных). Однако большинство исследователей все же сходятся на том, что глутамил-триптофан в целом не приводит к клиническим улучшениям при терапии различных форм ЗНО (саркома Капоши, почечноклеточный рак, рак яичников, перитонеальный рак) [27] и не рекомендован для монотерапии онкологических заболеваний [21]. Тем не менее в проведенном эксперименте, применение глутамил-триптофана несколько замедляло динамику роста опухоли на уровне статистической тенденции в определенных реперных точках (рис. 2 А).

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что препарат способен позитивно воздействовать на клеточное микроокружение опухолевого инфильтрата, что выразилось, в первую очередь, в уменьшении общего пула CD45+ клеток при одновременном увеличении содержания CD3+ лимфоцитов. Этот факт согласуется с литературными данными, согласно которым глутамил-триптофан способен увеличивать количество лимфоцитов, экспрессирующих TCR – CD3+, например, у пациентов с клинической формой ВИЧ-инфекции, при перитоните, хроническом бронхите, пиодермии, а также при сочетанных поражениях бронхолегочной системы инфильтративным туберкулезом [10]. Однако при интерпретации этих данных, необходимо иметь в виду, что для CD3+ клеток родительской являлась популяция CD45+, для которой наблюдалось значительное снижение в группе животных, получавших глутамил-триптофан.

Другой важный зарегистрированный эффект заключался в статистически значимом снижении содержания в клеточном инфильтрате опухоли иммуносупрессивных M2-подобных (CD206+) макрофагов с высокой экспрессией MHC II при одновременной тенденции к повышению M2-подобных (CD206+) макрофагов с низкой экспрессией MHC II. Следует отметить, что родительская популяция M2-like Мф (CD206+) для макрофагов (MHC II low CD206+ и MHC II high CD206+) была снижена практически на 60% в обеих исследуемых группах (рис. 4 Д), поэтому интерпретация полученных данных требует аккуратного и критичного осмысления.

Известно, что M2-подобные (CD206+) макрофаги, как правило, ответственны за поддержание роста опухоли, подавление T-клеточного иммунитета, стимуляцию ангиогенеза и ремоделирование межклеточного матрикса [28] и снижение его содержания может означать смещение

intramammary transplanted syngeneic MC38 colorectal carcinoma revealed that the drug does not exert a noticeable effect on tumor growth. Tumor volume, tumor nodule mass, and tumor mass coefficient did not differ statistically between groups at the end of observation. Signs of tumor progression based on analysis of tumor-infiltrating cells – namely, decreased NK1.1+ and CD3+CD8+ populations – were observed in both control and treated groups. It is important to note that this syngeneic tumor is characterized by rapid aggressive growth. Moreover, the study addressed the effects of a course of glutamyl-tryptophan administration on the immune infiltrate of an already established intramammary-transplanted syngeneic tumor, bypassing the stages of carcinogenesis initiation and promotion. To fully understand the role of the studied compound in antitumor immunity, experiments on autochthonous (spontaneous) tumor models (carcinogen-induced or genetically modified animal lines) are required. Nevertheless, most researchers agree that glutamyl-tryptophan does not lead to clinical improvement in the treatment of various malignancies (Kaposi sarcoma, renal cell carcinoma, ovarian cancer, peritoneal cancer) [27] and is not recommended for monotherapy of oncological diseases [21]. However, in the present experiment, glutamyl-tryptophan slightly slowed tumor growth dynamics, reaching statistical trend levels at certain time points (fig. 2A).

The results of the study indicate that the compound can positively modulate the cellular microenvironment of the tumor infiltrate, primarily through reducing the overall pool of CD45+ cells while simultaneously increasing CD3+ lymphocyte content. This finding is consistent with published data showing that glutamyl-tryptophan can increase the proportion of TCR-expressing CD3+ lymphocytes, for example, in patients with HIV infection, peritonitis, chronic bronchitis, pyoderma, and combined bronchopulmonary disorders with infiltrative tuberculosis [10]. However, in interpreting these data, it is important to note that CD3+ cells originate from the CD45+ population, which was significantly reduced in the glutamyl-tryptophan group.

Another important observed effect was the statistically significant decrease in the content of immunosuppressive M2-like (CD206+) macrophages with high MHC II expression in the tumor infiltrate, accompanied by a trend toward increased M2-like (CD206+) macrophages with low MHC II expression. Notably, the parent M2-like macrophage (CD206+) population for both MHC II low CD206+ and MHC II high CD206+ subsets decreased by nearly 60% in both study groups (fig. 4D), requiring careful and critical interpretation.

M2-like (CD206+) macrophages are generally responsible for supporting tumor growth, suppressing T-cell immunity, stimulating angiogenesis, and remodeling the extracellular matrix [28]. Therefore, a reduction in their levels may

макрофагальной поляризации в сторону менее иммуносупрессивного фенотипа клеток (M1) и потенциального улучшения противоопухолевого иммунитета. Однако это утверждение требует дальнейшего изучения, так как субпопуляции регуляторных макрофагов могут обладать смешанным фенотипом. Перечисленные изменения содержания клеток в опухолевом инфильтрате происходили на фоне отсутствия выраженных изменений в содержании CD4, CD8 и В-клеток, что может свидетельствовать о достаточно высоком селективном действии препарата на паратуморальный рекрутинг Т-лимфоцитов и макрофагов, преимущественно с поляризацией M1, а не глобально на все клеточные линии и внеклеточные параметры иммунной системы.

Рост доли «двойных негативных» CD4-CD8-(DN) Т-клеток (на 44,2% на втором сроке анализа по сравнению с первым) может отражать или компенсаторный цитотоксический ответ (если это  $\gamma\delta$  Т-клетки), или иммуносупрессию (если это DN Tregs). Доля DN NK1.1+ Т-клеток (CD3+) клеток в иммунном инфильтрате на втором сроке анализа, в отличие от контрольной группы, не снижался в группе, получавшей глутамил-триптофан. Таким образом исследуемый препарат предотвращает (или компенсирует) опухоль-индуцированное снижение доли DN NK+ Т-клеток, т.е. оказывает иммунозащитное действие на эту популяцию. Однако без дополнительного фенотипирования трактовать эти результаты однозначно не представляется возможным. В любом случае, изменение вектора дифференцировки с M2- на M1-подобные макрофаги является ключевым моментом в восстановлении нормальной структуры ткани при альтерации, что может оказаться важным для понимания тонких механизмов регенераторно-гастропротекторного действия лекарственного препарата «Регастим Гастро» [5].

Таким образом, в условиях моделирования сингенной опухоли глутамил-триптофан способствовал «реформатированию» опухолевого микроокружения из иммуносупрессивного состояния в «Т-клеточно-доминантное» и «макрофагально-регуляторно-восстановительное». При этом наблюдаемый иммунологический сдвиг можно трактовать как «иммунное репрограммирование микроокружения опухоли», что является важным моментом современных противоопухолевых схем терапии. Играть ли эти иммунотропные эффекты какую-либо роль в процессах ангиогенеза, сказать сложно, нужны дальнейшие исследования. Однако учитывая роль M2-макрофагов как источника ангиогенных факторов и медиаторов иммуносупрессии, уменьшение их числа на фоне применения глутамил-триптофана потенциально может способствовать снижению ангиогенной активности. В этой связи наблюдаемое повышение уровня CD3+ Т-клеток и снижение уровня CD45+ в опухолевом инфильтрате может косвенно свидетельствовать о подавлении процессов ангиогенеза, поскольку блокада VEGF восстанавливает адгезию и способствует трафику CD3+ клеток [29, 30].

В контексте хронического атрофического гастрита, ассоциированного с повышенным риском развития аденокарциномы и колоректальных полипов, глутамил-триптофан может рассматриваться как средство вторичной иммунопрофилактики данных заболеваний. Его способность усиливать Т-клеточный ответ и снижать долю иммуносупрессивных клеток потенциально позволяет усиливать иммунный надзор, тем самым уменьшая

указывать на сдвиг в макрофагальной поляризации в сторону менее иммуносупрессивного (M1-подобного) фенотипа и потенциального улучшения противоопухолевого иммунитета. Однако, это предположение требует дальнейшего изучения, так как субпопуляции регуляторных макрофагов могут обладать смешанным фенотипом. Описанные изменения в составе клеток инфильтрата опухоли происходили на фоне отсутствия выраженных изменений в содержании CD4, CD8, и В-клеток, что может указывать на достаточно селективное действие препарата на паратуморальный рекрутинг Т-лимфоцитов и макрофагов – преимущественно способствующий поляризации M1 – а не глобальное воздействие на все клеточные линии и внеклеточные параметры иммунной системы.

Увеличение доли «двойно-негативных» CD4-CD8-(DN) Т-клеток (на 44,2% на втором сроке анализа по сравнению с первым) может отражать либо компенсаторный цитотоксический ответ (если это  $\gamma\delta$  Т-клетки) или иммуносупрессию (если это DN Tregs). Доля DN NK1.1+ Т-клеток (CD3+) в опухолевом инфильтрате на втором сроке анализа, в отличие от контрольной группы, не снижалась в группе, получавшей глутамил-триптофан. Таким образом препарат предотвращает (или компенсирует) опухоль-индуцированное снижение доли DN NK+ Т-клеток, т.е. оказывает иммунозащитное действие на эту популяцию. Однако без дополнительного фенотипирования трактовать эти результаты однозначно не представляется возможным. В любом случае, сдвиг вектора дифференцировки с M2- на M1-подобные макрофаги является ключевым моментом в восстановлении нормальной структуры ткани при альтерации, что может оказаться важным для понимания тонких механизмов регенераторно-гастропротекторного действия лекарственного препарата «Регастим Гастро» [5].

Таким образом, в условиях моделирования сингенной опухоли глутамил-триптофан способствовал «реформатированию» опухолевого микроокружения из иммуносупрессивного состояния в «Т-клеточно-доминантное» и «макрофагально-регуляторно-восстановительное». При этом наблюдаемый иммунологический сдвиг можно трактовать как «иммунное репрограммирование микроокружения опухоли», что является важным моментом современных противоопухолевых схем терапии. Играть ли эти иммунотропные эффекты какую-либо роль в процессах ангиогенеза, сказать сложно, нужны дальнейшие исследования. Однако учитывая роль M2 макрофагов как источников ангиогенных факторов и медиаторов иммуносупрессии, уменьшение их числа на фоне применения глутамил-триптофана потенциально может способствовать снижению ангиогенной активности. В этой связи наблюдаемое повышение уровня CD3+ Т-клеток и снижение уровня CD45+ клеток в опухолевом инфильтрате может косвенно свидетельствовать о подавлении процессов ангиогенеза, поскольку блокада VEGF восстанавливает адгезию и способствует трафику CD3+ клеток [29, 30].

В контексте хронического атрофического гастрита, ассоциированного с повышенным риском развития аденокарциномы и колоректальных полипов, глутамил-триптофан может рассматриваться как средство вторичной иммунопрофилактики данных заболеваний. Его способность усиливать Т-клеточный ответ и снижать долю иммуносупрессивных клеток потенциально позволяет усиливать иммунный надзор, тем самым уменьшая

риск развития неоплазии желудочно-кишечного тракта у пациентов с атрофией слизистой желудка. В этой связи применение препарата «Регастим Гастро» в качестве средства вторичной иммунопрофилактики неоплазий (канцеропревенции) пациентами с атрофическим гастритом, представляется перспективным и целесообразным. Тем не менее, с целью проверки гипотез и установления точных механизмов действия любого фармакофора, после выполнения экспериментальной работы требуется проведение соответствующих клинических исследований.

## Заключение

Впервые на модели трансплантируемой сингенной опухоли у иммунокомпетентных животных проведена оценка изменений состава иммунного клеточного инфильтрата на фоне применения глутамил-триптофана. Установлены возможные эффекторские клетки, ответственные за реализацию иммуноопосредованного надзора за промоцией и прогрессией трансплантированной опухоли в условиях эксперимента *in vivo*.

Результаты проведенного исследования позволяют выдвинуть ряд гипотез, требующих дальнейшего подтверждения:

1. Увеличение субпопуляции CD3+ Т-клеток указывает на привлечение Т-лимфоцитов в опухоль. Более высокое присутствие CD3+/CD8+ ассоциировано с лучшим противоопухолевым контролем (Т-клеточная цитотоксичность);
2. Снижение субпопуляции CD45+ при одновременном увеличении CD3+ может означать селективную перестройку клеточного состава опухолевого инфильтрата в сторону усиления иммунологического надзора за опухолью;
3. Снижение M2-подобных макрофагов свидетельствует о смещении макрофагальной популяции от проопухолевого и провоспалительного фенотипа M2 к противоопухолевому, противовоспалительному и цитотоксическому фенотипу M1;
4. Помимо иммуномодулирующих эффектов нельзя исключить возможных эффектов тестируемого объекта на VEGF-сигналинг в опухоли.

Результаты проведенного исследования могут служить экспериментальным обоснованием для дальнейшего неклинического и клинического изучения курсового применения препарата Регастим Гастро в качестве невакцинальной стратегии (иммуно)профилактики в первую очередь лиц с высоким риском развития ЗНО желудка и предопухолевыми состояниями (пациенты с хроническим атрофическим гастритом).

## Литература | References

1. Miao Q., Qin B., Piao S., Ma C. Global research trends on the association between gastric cancer and chronic atrophic gastritis: a bibliometric analysis. *Discov Oncol.* 2025;16(1):1603. doi: 10.1007/s12672-025-03392-4.
2. Sui Z., Chen J., Li P., Shao L. et al. Risk for gastric cancer in patients with gastric atrophy: a systematic review and meta-analysis. *Transl Cancer Res.* 2020;9(3): 1618–1624. doi: 10.21037/tcr.2020.01.54.
3. Bray F., Laversanne M., Sung H. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality

lowering the risk of gastrointestinal neoplasia in patients with gastric mucosal atrophy. In this regard, the use of Regastim Gastro as a secondary immunopreventive (cancer-preventive) agent in patients with atrophic gastritis appears promising and justified. Nevertheless, to test these hypotheses and establish precise mechanisms of action for any pharmacophore, appropriate clinical studies are required following experimental research.

## Conclusion

For the first time in a model of a transplantable syngeneic tumor in immunocompetent animals, an assessment of changes in the composition of the immune cell infiltrate during administration of glutamyl-tryptophan was carried out. Potential effector cell populations responsible for the implementation of immune-mediated surveillance of tumor promotion and progression under *in vivo* experimental conditions were identified.

The results of the study allow several hypotheses to be proposed, which require further verification:

1. An increase in the CD3+ T-cell subpopulation indicates enhanced recruitment of T lymphocytes into the tumor. A higher presence of CD3+/CD8+ cells is associated with improved antitumor control (T-cell cytotoxicity).
2. A reduction in CD45+ cells combined with an increase in CD3+ cells may reflect a selective restructuring of the cellular composition of the tumor infiltrate toward enhanced immunological surveillance of the tumor.
3. A decrease in M2-like macrophages suggests a shift in macrophage polarization from a pro-tumorigenic and anti-inflammatory M2 phenotype toward an antitumor, pro-inflammatory, and cytotoxic M1 phenotype.
4. In addition to immunomodulatory effects, potential effects of the tested compound on VEGF signaling within the tumor cannot be excluded.

The findings of this study may serve as an experimental basis for further nonclinical and clinical investigations of the course-based use of Regastim Gastro as a non-vaccine (immuno) preventive strategy, particularly for individuals at high risk of gastric malignancies and those with precancerous conditions (e.g., patients with chronic atrophic gastritis).

worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229–263. doi: 10.3322/caac.21834.

4. Shao-hua Z., Lin-lin R., Shen S., Yun-he T. et al. Atrophic gastritis rather than *Helicobacter pylori* infection can be an independent risk factor of colorectal polyps: a retrospective study in China. *BMC Gastroenterology.* 2023;23:213. doi: 10.1186/s12876-023-02764-w.
5. Baryshnikova N.V., Uspensky Y.P., Kalinina E.Y., Krasnov A.A. et al. Efficacy of alpha-glutamyl-tryptophan in inflammation resolution in patients with chronic atrophic

- gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection. *Russian J of Evidence-based Gastroenterology*. 2022;11 (4):15–21. (in Russ.) doi: 10.17116/dokgastro2022110311.
- Барышникова Н.В., Успенский Ю.П., Калинина Е.Ю., Краснов А.А. и соавт. Эффективность альфа-глутамил-триптофана в купировании воспаления у больных хроническим атрофическим гастритом, ассоциированным с *Helicobacter pylori*. *Доказательная гастроэнтерология*. 2022;11 (4):15–21. doi: 10.17116/dokgastro2022110311.
6. Uspensky Y.P., Baryshnikova N.V., Krasnov A.A., Petlenko S.V. et al. Effects of Regastim Gastro on the restoration of gastric acid secretion according to 24-hour pH monitoring in patients with chronic atrophic gastritis. *Exper and clin gastroenterology*. 2022;198 (2):40–47. (in Russ.) doi: 10.31146/1682–8658-ecg-198–2–40–47.  
Успенский Ю.П., Барышникова Н.В., Краснов А.А., Петленко С.В. и соавт. Влияние Регастим Гастро на восстановление кислотопродукции в желудке по данным суточной рН-метрии у больных хроническим атрофическим гастритом. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2022;198 (2):40–47. doi: 10.31146/1682–8658-ecg-198–2–40–47.
  7. Uspensky Y.P., Baryshnikova N.V., Krasnov A.A., Petlenko S.V. et al. Current issues in gastric cancer prevention. *Consilium medicum*. 2022;24(5): 358–364. (in Russ.) doi: 10.26442/20751753.2022.5.201922.  
Успенский Ю.П., Барышникова Н.В., Краснов А.А., Петленко С.В. и соавт. Актуальные вопросы профилактики рака желудка. *Consilium medicum*. 2022;24(5): 358–364. doi: 10.26442/20751753.2022.5.201922.
  8. Gubin M.M., Vesely M.D. Cancer Immunoediting in the Era of Immuno-oncology. *Clin Cancer Res*. 2022;28(18):3917–3928. doi: 10.1158/1078–0432.CCR-21–1804.
  9. Bai Y., Xu H., Guo M., Xia L. et al. Extensive infiltration of CD8+ T cells and M1 macrophages is beneficial for multiple cancer patients undergoing chemotherapy. *Med Comm Oncology*. 2024; 3(3): e89. doi: 10.1002/mog2.89.
  10. Clinical pharmacology of Thymogen / Eds. Smirnov V.S. – St. Petersburg: AISING, 2012. – 108 p. (in Russ.) Available at: <https://cytomed.ru/wp-content/uploads/2023/12/klinicheskaya-farmakologiya-timogena.pdf> (Accessed: 01.12.2025.)  
Клиническая фармакология тимогена / Под ред. В.С. Смирнова. – СПб: АЙСИНГ, 2012. – 108 с. <https://cytomed.ru/wp-content/uploads/2023/12/klinicheskaya-farmakologiya-timogena.pdf>
  11. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*. 2010;53: 33–79.
  12. Wu Z., Zheng Y., Sheng J. et al. CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Front. Immunol*. 2022;13: 816005. doi: 10.3389/fimmu.2022.816005.
  13. Zhang Z.X., Ma Y., Wang H. et al. Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, Fas-Fas ligand-independent pathway. *J Immunol*. 2006;177(10):6920–9. doi: 10.4049/jimmunol.177.10.6920.
  14. Lasek W. Cancer immunoediting hypothesis: history, clinical implications and controversies. *Cent Eur J Immunol*. 2022;47(2):168–174. doi: 10.5114/ceji.2022.117376.
  15. Gu K.J., Li G. An overview of cancer prevention: chemoprevention and immunoprevention. *J Cancer Prev*. 2020;25(3):127–135. doi: 10.15430/JCP.2020.25.3.127.
  16. Rosca E.V., Koskimaki J.E., Rivera C.G. et al. Anti-angiogenic peptides for cancer therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12(8):1101–1116. doi: 10.2174/138920111796117300.
  17. Smith D.L., Cai J., Zhu S.T. et al. Natural killer cell cytolytic activity is necessary for in vivo antitumor activity of the dipeptide L-glutamyl-L-tryptophan. *Int J Cancer*. 2003;106(4):528–533. doi: 10.1002/ijc.11253.
  18. Tulpule A., Scadden D.T., Espina B.M. et al. Results of a randomized study of IM862 nasal solution in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol*. 2000;18(4):716–723. doi: 10.1200/JCO.2000.18.4.716.
  19. Bespalov V.G. [Synthetic and nature antitumor agents in cancer prevention]. Diss. ... med science., St. Petersburg, 2004. 46 p. (in Russ.) Available at: <https://www.dissercat.com/content/sinteticheskie-i-prirodnye-antikantserogennye-veshchestva-v-profilaktike-raka> (Accessed: 01.12.2025.)  
Беспалов В.Г. Синтетические и природные антиканцерогенные вещества в профилактике рака. Автореф. дисс., СПб., 2004; 46 с. <https://www.dissercat.com/content/sinteticheskie-i-prirodnye-antikantserogennye-veshchestva-v-profilaktike-raka>
  20. Anisimov V.N., Khavinson V. Kh., Morozov V.G. Immunomodulatory synthetic dipeptide L-Glu-L-Trp slows down aging and inhibits spontaneous carcinogenesis in rats. *Biogerontology*. 2000;1:55–59. doi: 10.1023/a:1010042008969.
  21. Deplanque G., Madhusudan S., Jones P.H. et al. Phase II trial of the antiangiogenic agent IM862 in metastatic renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2004;91:1645–1650. doi: 10.1038/sj.bjc.6602126.
  22. Ferrario A., Tiehl von K.F., Rucker N. et al. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res*. 2000;60:4066–4069.
  23. Khedr S., Ameln A.K.-von, Khedr M. et al. Characterization of tryptophan-containing dipeptides for anti-angiogenic effects. *Acta Physiologica*. 2021;231: e13556. doi: 10.1111/apha.13556.
  24. Kudryavtseva T.A., Starikova E.A., Aktureeva N.A. et al. Influence of glutamyl-tryptophan on the expression of IL-8 and ICAM-1 by mononuclear leukocytes of human peripheral blood and Ea.hy 926 cell line. *Russian J of Immunology*. 2017;11(20):2:157–158. (in Russ.)  
Кудрявцева Т.А., Старикова Э.А., Актуреева Н.А. и соавт. Влияние глутамил-триптофана на экспрессию IL-8 и ICAM-1 мононуклеарными лейкоцитами периферической крови человека и клетками линии Ea.hy 926. *Российский иммунологический журнал*. 2017;11(20):2:157–158.
  25. Golovacheva E.G., Starikova E.A., Kudryavtseva T.A., Apryatina V.A. The effect of drug with  $\alpha$ -glutamyl-tryptophan for cytokine secretion and level of surface molecule ICAM-1 in vitro. *Cell and Tissue Biology*. 2023;17(2):146–152. doi: 10.1134/S1990519X23020050.
  26. Radisavljevic Z., Avraham H., Avraham S. Vascular endothelial growth factor up-regulates ICAM-1 expression via the phosphatidylinositol 3 OH-kinase/AKT/Nitric oxide pathway and modulates migration of brain microvascular endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(27):20770–20774. doi: 10.1074/jbc.M002448200.
  27. Noy A., Scadden D.T., Lee J. et al. Angiogenesis inhibitor IM862 is ineffective against AIDS-Kaposi's sarcoma in a phase III trial, but demonstrates sustained, potent effect of highly active antiretroviral therapy: from the AIDS malignancy consortium and IM862 study team. *J Clin Oncol*. 2005;23(5):990–998. doi: 10.1200/JCO.2005.11.043.
  28. Wang S., Wang J., Chen Z. et al. Targeting M2-like tumor-associated macrophages is a potential therapeutic approach to overcome antitumor drug resistance. *NPJ Precis Oncol*. 2024;8(1):31. doi: 10.1038/s41698–024–00522-z.
  29. Park J.A., Espinosa-Cotton M., Guo H.-F. et al. Targeting tumor vasculature to improve antitumor activity of T cells armed ex vivo with T cell engaging bispecific antibody. *J Immunother Cancer*. 2023;11(3): e006680. doi: 10.1136/jitc-2023–006680.
  30. Gonçales M., Warwas K.M., Meyer M. et al. Reversal of endothelial cell energy by T cell-engaging bispecific antibodies. *Cancers (Basel)*. 2024;16(24):4251. doi: 10.3390/cancers16244251.