

FLIM-ИМИДЖИНГ АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ НАД(Ф)Н Т-КЛЕТОК В ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИ-CTLA-4-ИММУНОТЕРАПИИ

DOI: 10.17691/stm2023.15.3.01

УДК 616.428–006.484:615.37

Поступила 17.03.2023 г.

- © **А.В. Изосимова**, лаборант лаборатории геномики адаптивного противоопухолевого иммунитета НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹; аспирант кафедры биофизики²;
А.М. Можеров, младший научный сотрудник лаборатории оптической спектроскопии и микроскопии НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;
М.В. Ширманова, к.б.н., зам. директора по науке НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;
В.И. Щеславский, к.ф.-м.н., зав. лабораторией оптической спектроскопии и микроскопии¹;
Д.А. Сачкова, студент-магистр кафедры биофизики²; лаборант лаборатории флуоресцентного биоимиджинга НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;
Е.В. Загайнова, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории оптической когерентной томографии НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;
Г.В. Шаронов, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник Института трансляционной медицины³; старший научный сотрудник лаборатории геномики адаптивного противоопухолевого иммунитета НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;
Д.В. Южакова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории геномики адаптивного противоопухолевого иммунитета НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Н. Новгород, 603005;

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, пр. Гагарина, 23, Н. Новгород, 603950;

³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, ул. Островитянова, 1, Москва, 117997

Основными проблемами иммунотерапии опухолей являются отсутствие надежных биомаркеров, позволяющих заранее определять индивидуальную восприимчивость пациентов к лечению, а также недостаточные знания о механизмах резистентности.

Биомаркеры на основе автофлуоресценции метаболитических коферментов в иммунных клетках могут стать новым мощным предиктором раннего ответа опухоли на лечение, а оптический метод FLIM — инструментом прогнозирования эффективности иммунотерапии, позволяющим сохранять пространственную структуру образца и получать данные о метаболитическом статусе иммунных клеток в режиме реального времени.

Цель работы — исследование методом метаболитического имиджинга автофлуоресценции метаболитического кофермента НАД(Ф)Н в иммунных клетках свежеевыделенных лимфатических узлов как потенциального маркера для оценки раннего ответа на иммунотерапию.

Материалы и методы. Исследование проводили на мышах линии C57Bl/6 FoxP3-EGFP с меланомой B16F0, привитой вблизи пахового лимфоузла. Мышам вводили антитела к CTLA-4 (Bio X Cell, США) по 250 мкг на мышь, внутрибрюшинно на 7-, 8-, 11- и 12-й дни роста опухоли. FLIM-изображения в канале кофермента никотинамидадениндинуклеотида (фосфата) — НАД(Ф)Н (возбуждение — 375 нм, регистрация — 435–485 нм) получали с помощью флуоресцентного конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного модулем FLIM Simple-Tau 152 TCSPC (Becker & Hickl GmbH, Германия). Проточную цитометрию проводили с использованием клеточного сортера BD FACSAria III (BD Biosciences, США).

Для контактов: Южакова Диана Владимировна, e-mail: yuzhakova-diana@mail.ru

Результаты. Иммуноterapia чекпойнт-ингибиторами приводила к выраженным метаболическим перестройкам в Т-клетках свежеевыделенных лимфоузлов у мышей-респондеров с торможением роста опухоли. Данные FLIM-изображений НАД(Ф)Н свидетельствовали об увеличении свободной фракции НАДН α_1 , вклада формы, связанной с гликолизом, для обеспечения высоких потребностей активированных Т-клеток и синтеза провоспалительных цитокинов. Напротив, у мышей-нереспондеров с прогрессирующей опухолью наблюдались низкие значения отношения свободной фракции к связанной α_1/α_2 , что может быть связано с механизмами резистентности к терапии.

Ответ на иммуноterapiю был верифицирован данными по экспрессии активационных и пролиферативных маркеров, полученными с помощью проточной цитометрии. Мы наблюдали увеличение продукции провоспалительного цитокина IFN- γ в эффекторных Т-клетках у мышей-респондеров по сравнению с контролем (без лечения) и нереспондерами. Кроме того, зарегистрировано повышение экспрессии поверхностных активационных маркеров CD25 и CD69 по сравнению с контролем.

Заключение. Использование FLIM-метода позволило продемонстрировать, что автофлуоресценция кофермента НАД(Ф)Н чувствительна к ответу на чекпойнт-иммуноterapiю и может быть использована в качестве надежного маркера эффективности ответа на лечение.

Ключевые слова: времяразрешенный имиджинг; FLIM; глиобластома; метаболический статус опухолевых клеток; НАД(Ф)Н.

Как цитировать: Izosimova A.V., Mozherov A.M., Shirmanova M.V., Shcheslavskiy V.I., Sachkova D.A., Zagaynova E.V., Sharonov G.V., Yuzhakova D.V. Fluorescence lifetime imaging of NAD(P)H T cells autofluorescence in the lymphatic nodes to assess the effectiveness of anti-CTLA-4 immunotherapy. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2023; 15(3): 5, <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.3.01>

English

Fluorescence Lifetime Imaging of NAD(P)H T Cells Autofluorescence in the Lymphatic Nodes to Assess the Effectiveness of Anti-CTLA-4 Immunotherapy

A.V. Izosimova, Laboratory Assistant, Laboratory of Genomics of Adaptive Antitumor Immunity, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹; PhD Student, Department of Biophysics²;

A.M. Mozherov, Junior Researcher, Laboratory of Optical Spectroscopy and Microscopy, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

M.V. Shirmanova, PhD, Deputy Director for Science, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

V.I. Shcheslavskiy, PhD, Head of the Laboratory of Optical Spectroscopy and Microscopy, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

D.A. Sachkova, Master Student, Department of Biophysics²; Laboratory Assistant, Laboratory of Fluorescent Bioimaging, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

E.V. Zagaynova, MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Science, Leading Researcher, Laboratory of Optical Coherence Tomography, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

G.V. Sharonov, PhD, Senior Researcher, Institute of Translational Medicine³; Senior Researcher, Laboratory of Genomics of Adaptive Antitumor Immunity, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

D.V. Yuzhakova, PhD, Researcher, Laboratory of Genomics of Adaptive Antitumor Immunity, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹

¹Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

²National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

³Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovitianova St., Moscow, 117997, Russia

The main problem in the field of tumor immunotherapy is the lack of reliable biomarkers that allow pre-determining the susceptibility of individual patients to treatment, as well as insufficient knowledge about the resistance mechanisms.

Biomarkers based on the autofluorescence of metabolic coenzymes in immune cells can become a powerful new predictor of early tumor response to treatment, whereas the optical FLIM method can be a tool to predict the effectiveness of immunotherapy, which allows preserving the spatial structure of the sample and obtaining results on the metabolic status of immune cells in real time.

The aim of the study is to conduct a metabolic autofluorescence imaging study of the NAD(P)H metabolic coenzyme in immune cells of freshly isolated lymph nodes as a potential marker for assessing the effectiveness of an early response to immunotherapy.

Materials and Methods. The study was carried out on C57Bl/6 FoxP3-EGFP mice with B16F0 melanoma implanted near the inguinal lymph node. The mice were injected with antibodies to CTLA-4 (Bio X Cell, USA) (250 μ g per mouse, intraperitoneally on days 7, 8, 11, and

12 of the tumor growth). FLIM images in the nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) coenzyme (NAD(P)H) channel (excitation — 375 nm, reception — 435–485 nm) were received using an LSM 880 fluorescent confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss, Germany) equipped with a FLIM Simple-Tau module 152 TCSPC (Becker & Hickl GmbH, Germany). Flow cytometry was conducted using a BD FACSAria III cell sorter (BD Biosciences, USA).

Results. Immunotherapy with checkpoint inhibitors resulted in marked metabolic rearrangements in T cells of freshly isolated lymph nodes in responder mice, with inhibition of the tumor growth. Fluorescence lifetime imaging data on NAD(P)H indicated an increase in the free fraction of NADH α_1 , a form associated with glycolysis to meet high demands of the activated T cells and pro-inflammatory cytokine synthesis. In contrast, non-responder mice with advanced tumors showed low values of the ratio of free fraction to bound α_1/α_2 , which may be related to mechanisms of resistance to therapy.

The response to immunotherapy was verified by data on the expression of activation and proliferation markers by means of flow cytometry. The authors observed an increase in the production of the pro-inflammatory cytokine IFN γ in effector T cells in responder mice compared to untreated controls and non-responders. In addition, an increase in the expression of the surface activation markers CD25 and CD69 was registered compared to untreated controls.

Conclusion. Use of the FLIM method allowed to demonstrate that autofluorescence of the NAD(P)H coenzyme is sensitive to the response to checkpoint immunotherapy and can be used as a reliable marker of the effectiveness of response to treatment.

Key words: fluorescence lifetime imaging; FLIM; glioblastoma; metabolic status of tumor cells; NAD(P)H.

Введение

Терапия ингибиторами контрольных точек иммунитета (чекпойнтов) является одним из самых быстро развивающихся направлений современной онкоиммунологии и обладает высокой эффективностью у ряда пациентов при меланоме, немелкоклеточном раке легкого, раке мочевого пузыря, раке молочной железы и других формах злокачественных новообразований. В настоящее время одобрены препараты к двум чекпойнтам: CTLA-4 и PD-1 [1]. Но, несмотря на беспрецедентный успех применения данной терапии в клинике, существенная доля пациентов, получающих препараты этой группы, не демонстрирует ответа на лечение, что связано с индивидуальными особенностями иммунитета пациентов и характером взаимодействия опухоли с иммунной системой [2, 3].

Во всем мире ведется поиск предиктивных маркеров иммунотерапии чекпойнт-ингибиторами. За последнее десятилетие предложено множество биомаркеров, которые должны прогнозировать эффект иммунотерапии.

Рутинно используемыми при отборе больных для прохождения лечения предикторами являются комбинация данных исследования субпопуляционного состава опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и лимфоцитов периферической крови в сочетании с уровнем экспрессии чекпойнтов CTLA-4 и PD-1/PD-L1. Более сложные и дорогостоящие методы включают высокопроизводительное секвенирование, основанное на анализе транскриптома выделенных лимфоцитов у пациента с последующим определением их клонального состава, на оценке внутриопухольевой мутационной нагрузки и на определении аллельной композиции главного комплекса гистосовместимости [4–6].

Однако данные методы не всегда способны точно предсказывать эффективность терапии непосредственно перед лечением, крайне трудоемкие, требуют дорогостоящего оборудования и реактивов и дают отсроченные результаты, в связи с чем доля пациентов

со значимым ответом на иммунотерапию для наиболее распространенных типов рака на сегодняшний день не превышает 30%. В связи с этим вопрос о надежных биомаркерах остается актуальным.

Одной из наиболее вероятных причин резистентности к иммунотерапии чекпойнт-ингибиторами является влияние опухолевого микроокружения на метаболический профиль Т-лимфоцитов. В частности, опухолевое окружение может мешать реализации метаболической программы эффекторных Т-клеток, конкурируя с ними за глюкозу, и, напротив, привлекать регуляторные и истощенные Т-лимфоциты избытком лактата и жирных кислот [7–9]. Известно, что изменения в метаболических процессах предшествуют развитию всех последующих событий в иммунных клетках (изменению экспрессионного профиля, пролиферации и т.д.), поэтому метаболический статус иммунных клеток потенциально может служить надежным предиктивным биомаркером, чувствительным к ранним иммунологическим перестройкам [1].

Инновационным подходом в области исследования клеточного метаболизма служит флуоресцентный времяразрешенный имиджинг (FLIM), который является высокочувствительным и безопасным методом регистрации автофлуоресценции метаболических кофакторов в живых клетках. FLIM позволяет быстро получать результаты оценки метаболизма и работать в режиме реального времени, не требует дополнительных окрасок и вмешательства в физиологические процессы [10, 11].

Мишенью для метаболического FLIM-имиджинга служат два кофермента: восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (фосфат) (НАД(Ф)Н) и окисленный флавинадениндинуклеотид (ФАД), которые участвуют в качестве переносчиков электронов во многих биохимических реакциях. Анализ метаболического статуса по времени жизни флуоресценции коферментов основан на том, что время жизни их флуоресценции существенно зависит от микроокружения, взаимодействия с белками и их конформации [12, 13].

Визуализация автофлуоресценции широко используется для исследований метаболизма рака и других заболеваний [14, 15]. Однако ее применение для исследования функционального состояния иммунных клеток стало развиваться совсем недавно. Пока известно лишь несколько работ по оптической метаболической визуализации иммунных клеток. В 2020–2022 гг. были опубликованы результаты исследований по метаболическому FLIM-имиджингу макрофагов [16–18] и Т-лимфоцитов [19, 20]. Продемонстрирована способность метаболического имиджинга различать покоящиеся и активированные Т-клетки *in vitro*, а также различные субпопуляции клеток врожденного и адаптивного иммунитета [19, 20]. Однако в данных исследованиях субпопуляции Т-клеток были извлечены у здоровых доноров и культивированы *in vitro*, а различные состояния активации моделировались искусственно путем добавления неантигенных стимулов. Работы по метаболическому имиджингу Т-клеток доноров с онкологией до недавнего времени отсутствовали.

В 2022 г. нами впервые был разработан протокол по метаболической визуализации Т-клеток в свежей лимфоидной ткани, т.е. в условиях, приближенных к естественным [21]. На модели мышинной меланомы впервые продемонстрировано, что параметры автофлуоресценции НАД(Ф)Н в лимфоцитах чувствительны к развитию опухоли и могут выступать в роли надежного биомаркера для оценки иммунного ответа на опухоль.

Цель настоящей работы — валидация метода метаболического FLIM-имиджинга для решения задачи прогнозирования эффективности иммунотерапии на свежeweделенных лимфоцитах.

Известно, что меланома является одной из основных мишеней для иммунотерапии чекпойнт-ингибиторами благодаря высокой мутационной нагрузке, которая способствует ее высокой иммуногенности [1, 22], поэтому исследование проведено на мышах C57BL/6 FoxP3-EGFP с меланомой B16F0. Эксперименты выполняли на свежeweделенных лимфоузлах на 13–14-е сутки после имплантации опухоли. Поскольку метаболические изменения являются самыми ранними событиями в иммунных клетках в ответ на лечение, лимфоузлы забирали через 1–2 дня после последней инъекции терапевтического антитела. Данный ранний срок был выбран на основе наших предыдущих исследований [23–25]. Активацию и пролиферацию эффекторных Т-клеток подтверждали с помощью проточной цитометрии.

Материалы и методы

Культивирование клеток. Опухолевые клетки мышинной меланомы B16F0 культивировали по стандартной методике на питательной среде RPMI (Roswell park memorial institute medium) (Gibco, США) с добавлением 0,06% L-глутамин, 10% фетальной

телячей сыворотки (Gibco, США), 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина сульфата («ПанЭко», Россия) в культуральных флаконах (25 см³) (Corning, США) в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37°C и 85% влажности. Снятие клеток осуществляли при помощи 25% раствора трипсин–ЭДТА («ПанЭко», Россия) в течение 5 мин.

Опухолевая модель. В качестве объекта исследования выступали мыши особой трансгенной линии FoxP3-EGFP на основе линии C57BL/6, у которых химерный фактор FoxP3, связанный с зеленым флуоресцентным белком EGFP, экспрессирован в регуляторных Т-лимфоцитах для их специфического мечения.

Эксперименты проводили на 43 трансгенных мышах C57BL/6-FoxP3-EGFP (любезно предоставлены Александром Руденским, Sloan Kettering Institute, Нью-Йорк, США). У этих мышей выполняли нокаут химерной конструкции EGFP, субклонированной в первый экзон гена *FoxP3* [26], для идентификации регуляторных FoxP3+CD4+Т-клеток.

Для получения опухолевой модели мышам (самкам в возрасте 2–4 мес) проводили инъекцию суспензии опухолевых клеток в дозе 100 000 клеток в 150 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS). Инъекцию выполняли подкожно в положении животного на боку, ближе к большому и легко находимому паховому лимфоузлу.

На время всех оперативных процедур мыши были анестезированы внутримышечно с помощью смеси Золетила — 40 мг/кг, 50 мкл (Virbac France S.A., Франция) и 2% Ксилазина — 10 мкл, 10 мг/кг («Интерхеми веркер Де Аделаар Ести АС», Эстония). Все исследования на животных одобрены локальным этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета (протокол №12 от 5 августа 2022 г.).

Анти-CTLA-4-иммунотерапия. Мышам вводили антитела к CTLA-4 (Bio X Cell, США) (250 мкг на мышь, внутривентриально, на 7-, 8-, 11- и 12-й дни роста опухоли). Данную схему лечения выбрали на основе наших предыдущих исследований [21, 23–25].

В качестве контрольной группы выступали мыши с опухолью без лечения. Для определения мышей-респондеров и нереспондеров проводили мониторинг роста опухолевого узла. Размер опухолей определяли с помощью штангенциркуля по двум измерениям для последующего вычисления объема по формуле $V=a \cdot b \cdot b/2$, где a — длина, b — ширина опухолевого узла.

Измерения проводили каждые 1–2 дня, начиная с 5-го дня после имплантации опухолевых клеток и кончая 13–14-м днем, когда выполняли забор пахового лимфоузла. Для этого мышей подвергали эвтаназии 90% Изофлураном (Laboratories Karizoo, Испания). Лимфоузлы сразу после умерщвления вырезали с помощью микрохирургических ножниц под стереомикроскопом Leica M50 (Leica Microsystems, Германия) и разделяли на два фрагмента: для FLIM-имиджинга и для проточной цитометрии соответственно.

FLIM-имиджинг. С использованием ранее разработанного протокола [21] проведена метаболическая визуализация Т-клеток в свежей лимфоидной ткани. Фрагмент лимфоузла (~1/3 часть толщиной ~1 мм) отрезали микрохирургическими ножницами и помещали срезом вниз на чашку FluoroDish со стеклянным дном (WPI, Китай), чтобы капсула лимфоузла не блокировала флуоресцентный сигнал от иммунных клеток. Фрагмент лимфоузла накрывали салфеткой, смоченной 0,9% физиологическим раствором, чтобы избежать высыхания и смещения образца во время микроскопии. Время от выделения лимфоузла до окончания эксперимента не превышало 20 мин.

Визуализацию проводили с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия). В качестве источника возбуждения служил фемтосекундный Ti:Sa-лазер (Spectra Physics, США) с частотой следования импульсов 80 МГц и длительностью 120 фс с перестраиваемой длиной волны в диапазоне 690–1040 нм. Детекцию времени жизни флуоресценции осуществляли с помощью FLIM-модуля Simple-Tau 152 TCSPC (Becker & Hickl GmbH, Германия), основанного на время-коррелированном счете единичных фотонов. Изображения получены с использованием масляного иммерсионного объектива C Plan-Apochrom at 40x/1.3. NA Oil DIC M27 (Carl Zeiss, Германия). Возбуждение флуоресценции метаболического кофермента НАД(Ф)Н осуществляли в двухфотонном режиме на длине волны 750 нм и принимали в диапазоне 450–490 нм. Мощность возбуждающего излучения составляла 7 мВт. Количество фотонов на пикселе — не менее 5000 при биннинге 3, время накопления сигнала — 60 с.

Однофотонную флуоресценцию EGFP возбуждали на длине волны 488 нм, а эмиссию регистрировали в диапазоне 500–570 нм.

Обработку данных FLIM проводили с помощью программного обеспечения SPCImage software (Becker & Hickl GmbH, Германия). Для определения параметров кривых затухания в каждом пикселе использовали аппроксимацию методом наименьших квадратов.

В случае НАД(Ф)Н короткая компонента времени жизни соответствовала его свободной форме, ассоциированной с гликолизом, а длинная — связанной с белками форме НАД(Ф)Н, ассоциированной с митохондриальной электрон-транспортной цепью и с участием в окислительном фосфорилировании.

Флуоресцентные кривые затухания были аппроксимированы би-экспоненциальной моделью, позволяющей определять короткий и длинный компоненты (τ_1 и τ_2 соответственно) и относительные амплитуды этих компонент (α_1 и α_2 соответственно). По этим значениям определяли амплитудно-взвешенное среднее время жизни флуоресценции по формуле $\tau_m = \alpha_1\tau_1 + \alpha_2\tau_2$. Точность аппроксимации оценивали посредством параметра χ^2 . Для всех данных χ^2 лежал в диапазоне 0,8–1,2.

Изображение импортировали в программу, выбира-

ли участки с допустимым значением χ^2 , выделяли область цитоплазмы клетки, исключая ядро. Для каждого лимфоузла получали по 2–3 поля зрения, суммарно 40–60 клеток.

Проточная цитометрия. Для оценки влияния терапии на экспрессию основных активационных и пролиферативных маркеров фрагмент лимфоузла механически дезагрегировали в 100 мкл PBS. Для мечения живых клеток использовали антитела к рецепторам CD3, CD4, CD8, CD25 и CD69 (BD Biosciences, США). Для внутриклеточного окрашивания клетки фиксировали, пермеабилizировали и окрашивали антителами CD3, CD4, CD8 (BD Biosciences, США) и IFN- γ (Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя набора Inside Stain Kit (Miltenyi Biotec, Германия). Меченые клетки анализировали на клеточном сортере BD FACSAria III (BD Biosciences, США). Собирали по 300 000 клеток с каждого лимфоузла. Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star, США).

Статистический анализ. Для сравнительного анализа данных и их графического отображения использовали программное обеспечение GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). Для анализа скорости роста опухолей вычисляли усредненный объем опухоли по всем мышам в каждой экспериментальной группе на определенный день. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Для нахождения статистически значимых различий между исследуемыми группами «Контроль» и «Анти-CTLA-4 терапия» применяли непараметрический критерий Манна–Уитни (при $p \leq 0,05$ различия считали статистически значимыми).

Проверку непрерывных переменных на нормальность распределения проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка (при $p \leq 0,05$ распределение считали нормальным).

Для анализа данных FLIM вычисляли усредненное значение каждого параметра — по 40–60 клеткам (2–3 поля зрения) в лимфоузле каждой мыши. Затем вычисляли усредненное значение по всем мышам в каждой экспериментальной группе. Для нахождения статистически значимых различий между исследуемыми группами «Контроль», «Анти-CTLA-4-терапия, респондеры» и «Анти-CTLA-4-терапия, нереспондеры» применяли непараметрический критерий Манна–Уитни (при $p \leq 0,05$ различия считали статистически значимыми).

Для анализа данных проточной цитометрии на клеточном сортере собирали по 300 000 клеток с каждого лимфоузла. Оценивали процент клеток, экспрессирующих определенный маркер, от общего числа клеток в конкретной субпопуляции Т-лимфоцитов. Вычисляли усредненное значение по всем мышам в каждой экспериментальной группе. Для нахождения статистически значимых различий между исследуемыми группами «Контроль», «Анти-CTLA-4-терапия, респондеры» и «Анти-CTLA-4-терапия, нереспондеры» применяли

непараметрический критерий Манна–Уитни (при $p \leq 0,05$ различия считали статистически значимыми).

Результаты

Мониторинг роста опухолей у мышей. На первом этапе исследования был проведен мониторинг роста опухолей у мышей из групп «Контроль» и «Анти-CTLA-4-терапия» вплоть до дня забора лимфоузлов для FLIM-микроскопии и проточной цитометрии.

Анализ кривых усредненной скорости роста опухолей в группах «Контроль» и «Анти-CTLA-4-терапия» (рис. 1, а) показал, что в целом группа «Анти-CTLA-4-терапия» демонстрировала тенденцию к снижению скорости роста опухолей по сравнению с контрольной группой. Однако статистически значимые различия наблюдались только на 11-й день роста опухоли.

Известно, что меланома характеризуется высокой иммуногенностью, из-за чего наблюдается разброс в значениях скорости роста отдельных опухолей (рис. 1, б). При лечении данный разброс становится более выраженным вследствие гетерогенного отве-

та на иммунотерапию (рис. 1, в). Так, на день забора лимфоузлов объем опухолевого узла в группе «Анти-CTLA-4-терапия» варьировал от 45 до 470 мм³, тогда как в контрольной группе он варьировал меньше — от 110 до 380 мм³. В группе с лечением можно было выделить как мышей с выраженным торможением роста опухоли, так и со скоростью роста, сравнимой с контрольными опухолями либо выше.

Таким образом, выбранная схема иммунотерапии приводила к результату, схожему по данным клинической статистики с картиной, когда максимальный эффект достигается не более чем у 30% пациентов, и позволяла выделить мышей-респондеров и нереспондеров.

FLIM-имиджинг НАД(Ф)Н. На следующем этапе исследования проводили оценку автофлуоресценции метаболического кофермента НАД(Ф)Н в иммунных клетках лимфоузлов мышей. Установлены значения времен жизни короткой и длинной компонент τ_1 и τ_2 , а также их относительных вкладов α_1 и α_2 и среднего времени жизни τ_m НАД(Ф)Н в Т-клетках, которые были усреднены для каждого лимфоузла.

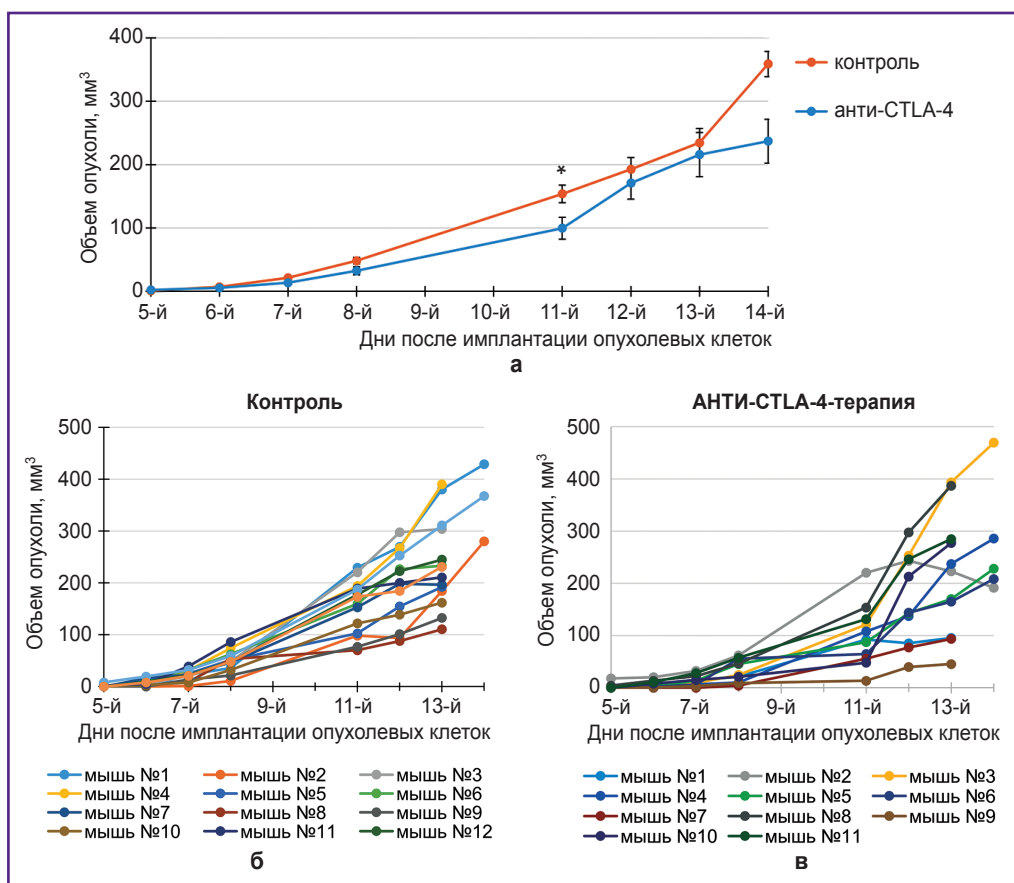


Рис. 1. Мониторинг роста опухолей у мышей в ходе анти-CTLA-4-иммунотерапии: а — кривые усредненной скорости роста опухолей в группах «Контроль» и «Анти-CTLA-4-терапия». Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего; * статистически значимое различие между группами на 11-й день роста опухоли, $p=0,0211$, непараметрический критерий Манна–Уитни; б, в — индивидуальные кривые роста опухоли для каждой мыши в группе «Контроль» и «Анти-CTLA-4-терапия» соответственно

Время жизни флуоресценции кофермента НАД(Ф)Н в иммунных клетках лимфоузлов мышей с опухолью (M±SEM)

Группа	τ_1 , нс	τ_2 , нс
Контроль	0,48±0,01	2,58±0,08
Анти-CTLA-4-иммунотерапия	0,49±0,01	2,53±0,08

Абсолютные значения времен жизни НАД(Ф)Н, зарегистрированные в иммунных клетках обеих групп, соответствовали типичным значениям, указанным в литературе [10, 27] (см. таблицу). Для групп «Контроль» и «Анти-CTLA-4-терапия» время жизни свободной формы (τ_1) составляло 0,48±0,01 и 0,49±0,01 нс, а связанной с белком формы (τ_2) — 2,58±0,08 и 2,53±0,08 нс соответственно. Значения абсолютных времен жизни между группами статистически значимо не различались.

Для оценки отношения вкладов α_1/α_2 и среднего времени жизни τ_m построены диаграммы распределения их значений в зависимости от объема опухоли на день забора лимфоузла (рис. 2, а).

Установлено, что параметр α_1/α_2 демонстрирует корреляцию с объемом опухоли. Обнаружено, что мыши с наименьшим объемом опухоли после анти-CTLA-4-терапии (45–95 мм³, мыши №1, №7 и №9, см. рис. 1, в) показывали самые высокие значения α_1/α_2 по сравнению с остальными мышами как с лечением, так и без. Кроме того, также высокое значение α_1/α_2 показывала мышь №2 из группы «Анти-CTLA-4-терапия» (объем опухоли — 191 мм³), у которой, несмотря на изначально большую опухоль, начиная с 11-го дня наблюдалось торможение роста опухоли и уменьшение размеров опухолевого узла.

Напротив, те мыши, которые, несмотря на терапию, имели прогрессирующую большую опухоль объемом 208–470 мм³, демонстрировали низкие значения α_1/α_2 , сравнимые с показателями контрольных мышей без терапии.

На основании полученных данных мы можем выделить в группе «Анти-CTLA-4-терапия» две подгруппы мышей: респондеры (мыши №1, №2, №7 и №9) (красные квадратные точки на рис. 2) и нереспондеры (мыши №3, №4, №5, №6, №8, №10, №11) (красные треугольные точки на рис. 2).

Для τ_m подобной четкой зависимости не наблюдалось (рис. 2, б). Тем не менее отдельные мыши-респондеры (№1, №9) демонстрировали самые низкие значения τ_m . У остальных мышей после лечения значения τ_m не отличались от контроля.

Для статистической обработки были построены точечные диаграммы, иллюстрирующие значения α_1/α_2 и τ_m для групп мышей «Контроль», «Анти-CTLA-4-терапия, респондеры» и «Анти-CTLA-4-терапия, нереспондеры» (рис. 3).

Установлено, что усредненное отношение α_1/α_2

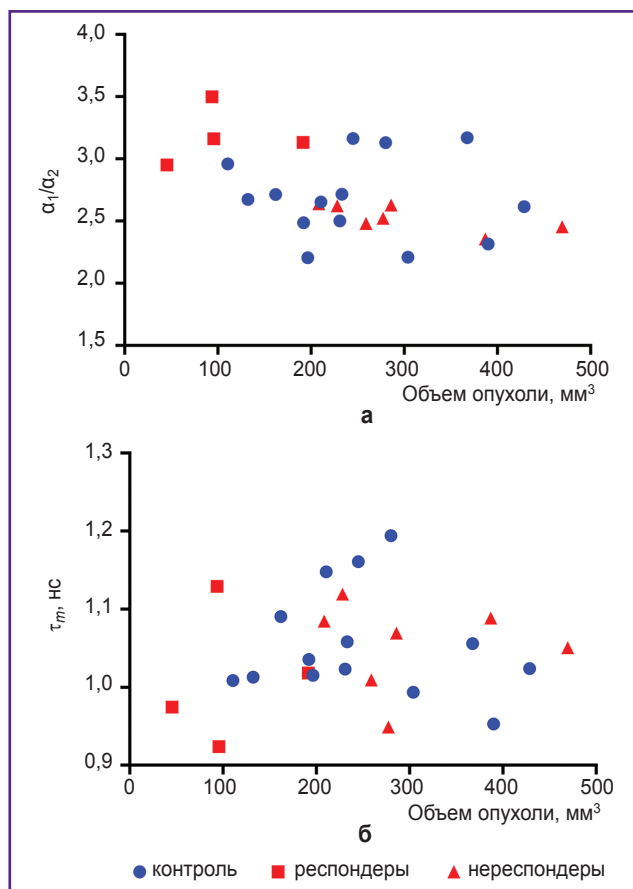


Рис. 2. Точечные диаграммы распределения значений α_1/α_2 (а) и τ_m (б) НАД(Ф)Н в зависимости от объема опухоли на день забора лимфоузла

Каждая точка соответствует усредненному значению по клеткам лимфоузла каждой мыши

в группе «Анти-CTLA-4-терапия, респондеры» составило 3,18±0,11 и было статистически значимо выше по сравнению со значением 2,68±0,08 в группе «Контроль» ($p=0,0346$) и со значением 2,52±0,04 в группе «Анти-CTLA-4-терапия, нереспондеры» ($p=0,0061$) (рис. 3, в).

Значимых различий между группой контрольных мышей и мышей-нереспондеров не наблюдалось.

Параметр τ_m показывал тенденцию к снижению в группе респондеров за счет роста вклада свободной (короткой) компоненты без статистической значимости (рис. 3, д).

Таким образом, параметр α_1/α_2 может быть использован в качестве маркера эффективности ответа на иммунотерапию чекпойнт-ингибиторами. Увеличение вклада свободной формы и, соответственно, снижение вклада связанной с белком формы НАД(Ф)Н может быть ассоциировано со сдвигом клеточного метаболизма в сторону гликолиза.

Экспрессия активационных и пролиферативных маркеров эффекторными Т-клетками. Для верификации ответа на иммунотерапию мы оценили

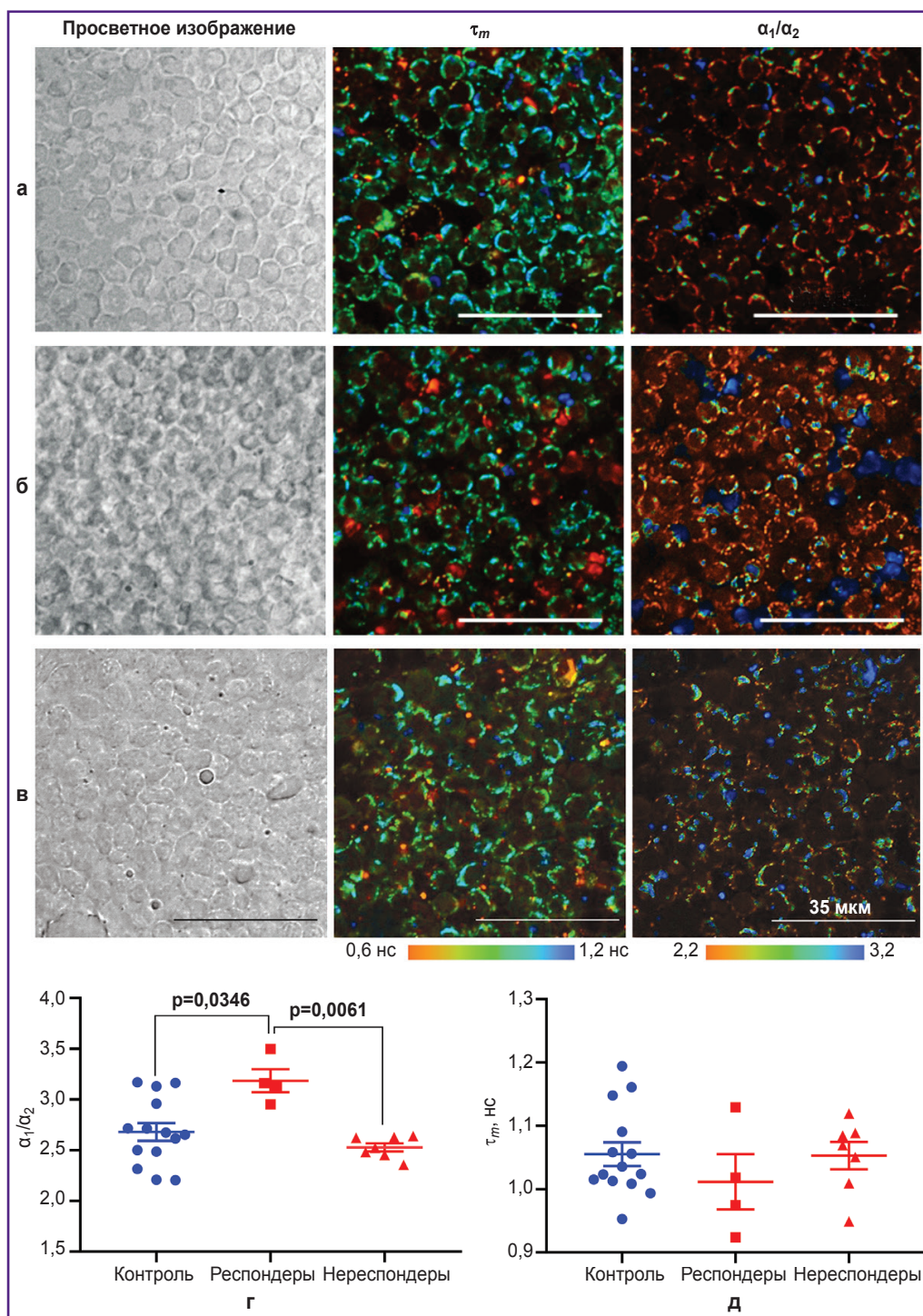


Рис. 3. FLIM-имиджинг НАД(Ф)Н в иммунных клетках лимфоузлов мышей с опухолью
 Репрезентативные FLIM-изображения τ_m и α_1/α_2 НАД(Ф)Н в лимфоузлах мышей из групп «Контроль» (а), «Анти-CTLA-4-терапия, нереспондеры» (б) и «Анти-CTLA-4 терапия, респондеры» (в); точечные диаграммы значений α_1/α_2 (г) и τ_m (д) НАД(Ф)Н в этих группах. Горизонтальные линии соответствуют среднему значению по группе и стандартной ошибке среднего

активацию эффекторных Т-клеток в двух основных субпопуляциях: цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитах и хелперных CD4+ Т-лимфоцитах (CD4+Th), выделенных из лимфоузлов.

Вначале был проведен анализ экспрессии поверхностных маркеров ранней (CD69) и средней (CD25 (IL-2R α)) активации в живых иммунных клетках (рис. 4). Наблюдалось статистически значимое увеличение

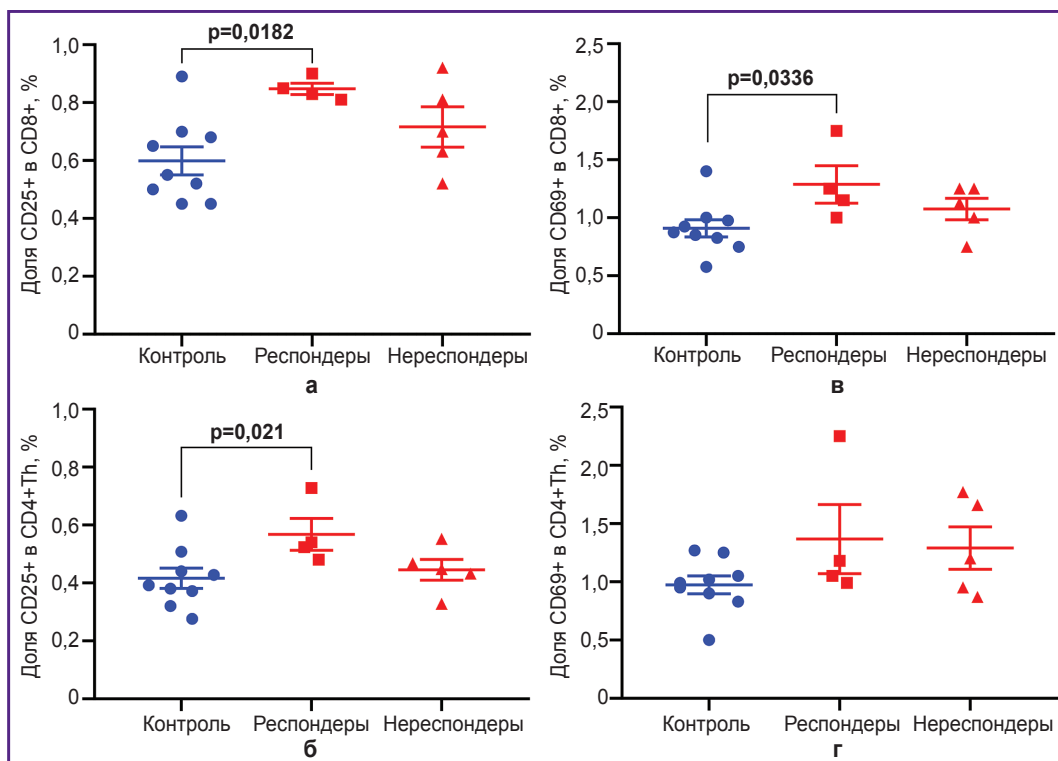


Рис. 4. Анализ экспрессии маркеров активации CD25 (а, б) и CD69 (в, г) в живых Т-клетках CD8+ и CD4+Th соответственно

Точечные диаграммы отражают измерения для отдельных животных (точки), а также среднее значение по группе и стандартную ошибку среднего (горизонтальные линии)

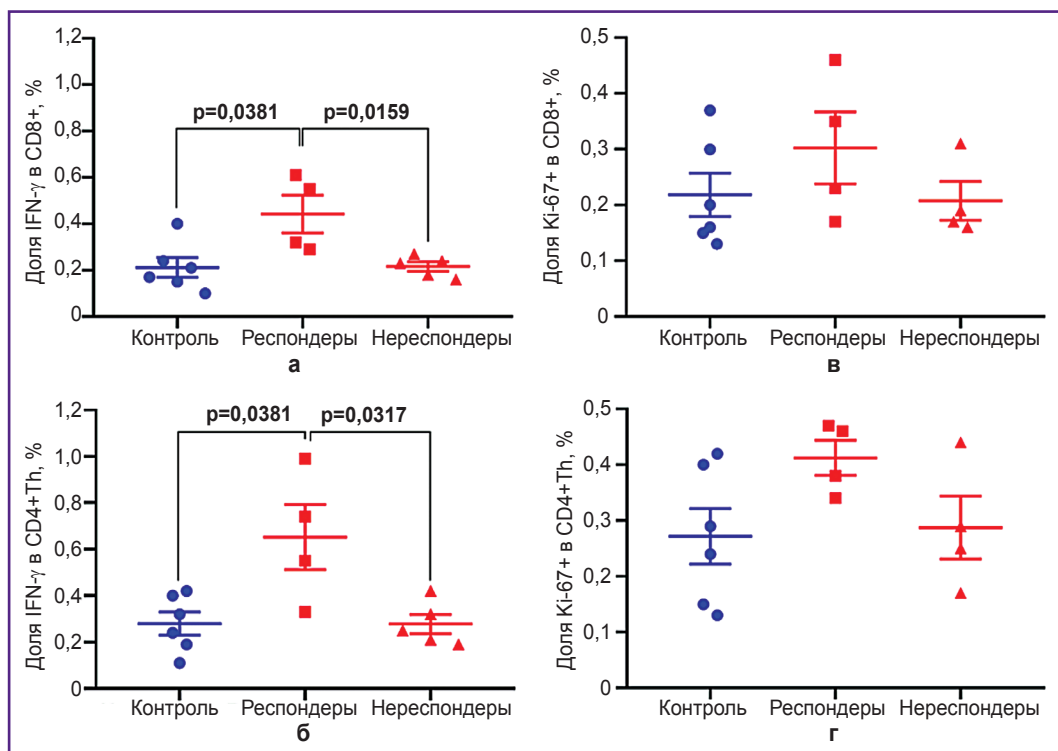


Рис. 5. Анализ продукции IFN- γ (а, б) и экспрессии пролиферативного маркера Ki-67 (в, г) в фиксированных Т-клетках CD8+ и CD4+Th соответственно

Точечные диаграммы отражают измерения для отдельных животных (точки), а также среднее значение по группе и стандартную ошибку среднего (горизонтальные линии)

доли активированных клеток после терапии у мышей-респондеров по сравнению с контролем. Данные проточной цитометрии показали увеличение доли CD25+ клеток в субпопуляциях Т-лимфоцитов CD8+ ($p=0,0182$) и CD4+Th ($p=0,021$), а также доли CD69+ клеток среди CD8+ Т-клеток ($p=0,0336$). Группа «Анти-CTLA-4-терапия, нереспондеры» не отличалась по экспрессии поверхностных маркеров активации от групп «Анти-CTLA-4-терапия, респондеры» и «Контроль».

Оценка внутриклеточной экспрессии провоспалительного цитокина IFN- γ в качестве маркера ранней активации и пролиферативного маркера Ki-67 с помощью внутриклеточного окрашивания фиксированных иммунных клеток (рис. 5) выявила статистически значимое увеличение уровня продукции IFN- γ у мышей-респондеров как по сравнению с контролем, так и по сравнению с мышами-нереспондерами. Увеличение доли IFN- γ + клеток наблюдалось в обеих субпопуляциях эффекторных лимфоцитов CD8+ ($p=0,0381$ и $p=0,0159$) и CD4+Th ($p=0,0381$ и $p=0,0317$) по сравнению с группами «Контроль» и «Анти-CTLA-4-терапия, нереспондеры» соответственно.

Пролиферативный индекс Ki-67 не обнаружил статистически значимых различий между группами. Однако наблюдалась незначимая тенденция к увеличению доли Ki-67+ клеток у мышей-респондеров, более выраженная в субпопуляции CD4+Th.

Следовательно, эффекторные Т-клетки, как и ожидалось, активировались в ответ на иммунотерапию, и экспрессия основных маркеров активации повышалась только в группе мышей-респондеров. Поскольку выбранный срок забора лимфоузла соответствовал раннему ответу на терапию, мы наблюдали разницу между респондерами и нереспондерами только по продукции IFN- γ как самого раннего маркера активации. Для данного срока также не обнаружено значимого усиления пролиферации иммунных клеток, которое характерно для более поздних стадий после лечения [23–25].

Обсуждение

Ключевая проблема в иммунотерапии чекпойнт-ингибиторами опухолей — отсутствие надежных биомаркеров, позволяющих заранее определять восприимчивость индивидуальных пациентов к лечению, и недостаточные знания о механизмах резистентности [1]. Биомаркеры на основе автофлуоресценции метаболитических коферментов могут стать новым мощным предиктором раннего ответа опухоли на лечение, а оптический метод FLIM — инструментом прогнозирования эффективности иммунотерапии, позволяющим сохранить пространственную структуру образца и быстро получать и обрабатывать данные о метаболическом статусе иммунных клеток.

В данной работе мы исследовали методом FLIM аутофлуоресценцию иммунных клеток в свежих фрагментах лимфоузлов в ходе анти-CTLA-4-терапии мышей с меланомой B16F0 на раннем этапе лечения.

Метаболический имиджинг иммунных клеток при иммунотерапии был выполнен впервые.

Мишенью для метаболического имиджинга выбраны параметры времени жизни кофермента НАД(Ф)Н. Ранее [21] нами было показано, что именно эти параметры демонстрируют чувствительность к развитию опухоли. Мы наблюдали, что прогрессирование опухоли приводит к постепенному увеличению свободной формы НАДН α_1 , связанной с гликолизом, и появлению фосфорилированной компоненты НАДФН α_3 , связанной с биосинтетическими процессами, и это отражает усиление противоопухолевого иммунного ответа за счет нарастающего выброса опухолевых антигенов. Данные проточной цитометрии подтвердили, что изменения доли свободной НАДН коррелируют с активацией CD4+Th и CD8+ Т-клеток, а связанного НАДФН — с их пролиферацией [21].

В настоящем исследовании установлено, что параметр α_1/α_2 НАДН чувствителен к ответу на иммунотерапию чекпойнт-ингибиторами.

Увеличение вклада свободной формы НАДН α_1 и, соответственно, снижение вклада связанной с белком формы НАДН α_2 коррелируют с положительным ответом на анти-CTLA-4-терапию, выражающимся в торможении роста опухоли. Рост α_1/α_2 у респондеров может быть ассоциирован со сдвигом клеточного метаболизма в сторону гликолиза.

Известно, что ингибирующий рецептор CTLA-4 на Т-клетках в основном препятствует нормальной презентации им антигена антиген-презентирующими клетками (АПК), конкурируя с рецепторами CD28 за связывание с лигандами B7 (B7-1/CD80 и B7-2/CD86) на АПК и лишая Т-клетки костимулирующего сигнала [28, 29]. Кроме того, этот рецептор репрессирует коактиватор транскрипции PGC-1 α , что приводит к нарушению метаболического переключения в сторону гликолиза [30]. Блокада же CTLA-4 позволяет реализоваться метаболической программе эффекторных Т-клеток в дренирующих лимфатических узлах [31]. Нормальная стимуляция Т-клеточного антигенного рецептора приводит к активации сигнального пути фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt/mTORC1 и индукции Мус, что способствует усилению аэробного гликолиза и глутаминолиза для поддержания высоких энергетических и биосинтетических потребностей клетки [30, 31], и это согласуется с нашими результатами.

Однако подобный положительный ответ мы наблюдали лишь у 36% мышей, что согласуется с клинической статистикой, когда максимальный эффект чекпойнт-терапии достигается не более чем у 30% пациентов [1, 32]. Животные-нереспондеры демонстрировали низкие значения α_1/α_2 , сравнимые со значениями у контрольных мышей без терапии, что может быть ассоциировано с нарушением метаболических путей, ответственных за переключение на гликолиз.

Причиной данной дисфункции могут служить следующие механизмы резистентности. Известно, что лечение блокирующими анти-CTLA-4- или анти-PD-

1-антителами может вызывать активацию других ингибирующих рецепторов, таких как TIM-3, LAG-3 и VISTA, которые, в свою очередь, также подавляют гликолитические пути в эффекторных клетках. Кроме того, сами клетки меланомы поддерживают высокогликолитический профиль за счет активации сигнальных путей MAPK и (PI3K)/Akt/mTORC1 (посредством активации мутации в гене *BRAF* V600E или инактивации *PTEN*), конкурируя с эффекторными Т-клетками за глюкозу. Опухолевое окружение с избытком лактата и жирных кислот создает метаболический барьер для гликолитических эффекторных клеток и в то же время способствует стабильности регуляторных Т-клеток, что ограничивает эффективность чекпойнт-терапии анти-CTLA-4 [7, 33, 34].

Ответ на иммунотерапию был верифицирован данными по экспрессии активационных и пролиферативных маркеров с помощью проточной цитометрии. Мы наблюдали повышение экспрессии активационных маркеров CD25, CD69 и IFN- γ в эффекторных Т-клетках у мышей-респондеров. Однако только экспрессия IFN- γ как самого раннего маркера позволяла разделить респондеров и нереспондеров. Данный феномен коррелирует с данными FLIM по увеличению вклада свободной компоненты α_1 , ассоциированной с гликолизом, у респондеров. Известно, что аэробный гликолиз способствует выработке воспалительных цитокинов, таких как IFN- γ . Он поддерживает пулы ацетил-КоА-субстратов, которые необходимы для эпигенетического стимулирования экспрессии гена IFN- γ , и усиливает трансляцию мРНК IFN- γ в белок [8, 35].

В отличие от предыдущего исследования [21], в настоящей работе не отмечено роста τ_2 и увеличения вклада фосфорилированной формы НАДФН α_3 , ассоциированной с биосинтетическими процессами и пролиферацией. Данные проточной цитометрии по экспрессии пролиферативного маркера Ki-67 коррелируют с данными FLIM, демонстрируя отсутствие статистически значимой разницы между исследуемыми группами. Наиболее вероятной причиной служат более ранний срок развития опухоли и ранний этап терапии в текущей работе.

Таким образом, иммунотерапия чекпойнт-ингибиторами приводит к значительному перепрограммированию метаболизма Т-клеток. Данные, получаемые с помощью FLIM-исследования НАДФН, а именно увеличение α_1/α_2 , отражают развитие противоопухолевого иммунного ответа в ответ на чекпойнт-терапию у животных-респондеров. Метаболический FLIM-имиджинг более чувствителен к индивидуальным изменениям на ранних этапах лечения, нежели уровень пролиферации клеток и экспрессии поверхностных рецепторов активации.

Заключение

Исследование показало, что иммунотерапия чекпойнт-ингибиторами приводит к выраженным метаболи-

ческим перестройкам в Т-клетках свежесыведенных лимфоузлов у мышей-респондеров с торможением роста опухоли. Данные по FLIM-имиджингу НАДФН свидетельствуют об увеличении свободной фракции НАДФН α_1 -формы, связанной с гликолизом для обеспечения высоких потребностей активированных Т-клеток и синтеза провоспалительных цитокинов. Напротив, у мышей-нереспондеров с прогрессирующей опухолью наблюдаются низкие значения α_1/α_2 , что может быть связано с механизмами резистентности к терапии. Данные FLIM коррелировали с результатами проточной цитометрии по экспрессии активационных маркеров и продукции IFN- γ .

Полученные результаты свидетельствуют, что автофлуоресценция кофермента НАДФ(Ф)Н может быть использована в качестве надежного маркера эффективности ответа на чекпойнт-иммунотерапию.

Финансирование исследования. Работа проведена при поддержке гранта Российского научного фонда №21-74-00101.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

- Huang A.C., Zappasodi R. A decade of checkpoint blockade immunotherapy in melanoma: understanding the molecular basis for immune sensitivity and resistance. *Nat Immunol* 2022; 23(5): 660–670, <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01141-1>.
- Wolchok J.D., Chiarion-Sileni V., Gonzalez R., Grob J.J., Rutkowski P., Lao C.D., Cowey C.L., Schadendorf D., Wagstaff J., Dummer R., Ferrucci P.F., Smylie M., Butler M.O., Hill A., Márquez-Rodas I., Haanen J.B.A.G., Guidoboni M., Maio M., Schöffski P., Carlino M.S., Lebbé C., McArthur G., Ascierto P.A., Daniels G.A., Long G.V., Bas T., Ritchings C., Larkin J., Hodi F.S. Long-term outcomes with nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 2022; 40(2): 127–137, <https://doi.org/10.1200/jco.21.02229>.
- Egen J.G., Ouyang W., Wu L.C. Human anti-tumor immunity: insights from immunotherapy clinical trials. *Immunity* 2020; 52(1): 36–54, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.010>.
- Bai R., Lv Z., Xu D., Cui J. Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. *Biomark Res* 2020; 8: 34, <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00209-0>.
- Янус Г.А., Иевлева А.Г., Суспицын Е.Н., Тюрин В.И., Бизин И.В., Горустович О.А., Ни В.И., Холматов М.М., Лайдус Т.А., Чуиныхина С.А., Алексахина С.Н., Имянитов Е.Н. Предиктивные маркеры ответа на блокаторы контрольных точек иммунного ответа. *Сибирский онкологический журнал* 2020; 19(4): 123–131, <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2020-19-4-123-131>.
- Janus G.A., Ievleva A.G., Suspitsyn E.N., Tyurin V.I., Bizin I.V., Gorustovich O.A., Ni V.I., Kholmatorov M.M., Laidus T.A., Chuynyshina S.A., Aleksakhina S.N., Imyanitorov E.N. Predictive response markers for immune response blocks. *Sibirskij onkologicheskij zurnal* 2020; 19(4): 123–131, <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2020-19-4-123-131>.

6. Lei Y., Li X., Huang Q., Zheng X., Liu M. Progress and challenges of predictive biomarkers for immune checkpoint blockade. *Front Oncol* 2021; 11: 617335, <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.617335>.
7. Li Y.Z., Zhang H.M. Recent advances in primary resistance mechanisms against immune checkpoint inhibitors. *Curr Opin Oncol* 2022; 34(1): 95–106, <https://doi.org/10.1097/coo.0000000000000802>.
8. Leone R.D., Powell J.D. Metabolism of immune cells in cancer. *Nat Rev Cancer* 2020; 20: 516–531, <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0273-y>.
9. Hu C., Xuan Y., Zhang X., Liu Y., Yang S., Yang K. Immune cell metabolism and metabolic reprogramming. *Mol Biol Rep* 2022; 49(10): 9783–9795, <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07474-2>.
10. Kolenc O.I., Quinn K.P. Evaluating cell metabolism through autofluorescence imaging of NAD(P)H and FAD. *Antioxid Redox Signal* 2019; 30(6): 875–889, <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7451>.
11. Shirshin E.A., Shirmanova M.V., Gayer A.V., Lukina M.M., Nikonova E.E., Yakimov B.P., Budylin G.S., Dudenkova V.V., Ignatova N.I., Komarov D.V., Yakovlev V.V., Becker W., Zagaynova E.V., Shcheslavskiy V.I., Scully M.O. Label-free sensing of cells with fluorescence lifetime imaging: the quest for metabolic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; 119(9): e2118241119, <https://doi.org/10.1073/pnas.2118241119>.
12. Datta R., Heaster T.M., Sharick J.T., Gillette A.A., Skala M.C. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications. *J Biomed Opt* 2020; 25(7): 1–43, <https://doi.org/10.1117/1.jbo.25.7.071203>.
13. Kalinina S., Freymueller C., Naskar N., von Einem B., Reess K., Sroka R., Rueck A. Bioenergetic alterations of metabolic redox coenzymes as NADH, FAD and FMN by means of fluorescence lifetime imaging techniques. *Int J Mol Sci* 2021; 22(11): 5952, <https://doi.org/10.3390/ijms22115952>.
14. Lukina M.M., Dudenkova V.V., Ignatova N.I., Druzhkova I.N., Shimolina L.E., Zagaynova E.V., Shirmanova M.V. Metabolic cofactors NAD(P)H and FAD as potential indicators of cancer cell response to chemotherapy with paclitaxel. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2018; 1862(8): 1693–1700, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.021>.
15. Kuznetsova D.S., Rodimova S.A., Gulina A., Reunov D., Bobrov N., Polozova A.V., Vasin A., Shcheslavskiy V.I., Vdovina N., Zagaynov V.E., Zagaynova E.V. Metabolic imaging and secondary ion mass spectrometry to define the structure and function of liver with acute and chronic pathology. *J Biomed Opt* 2019; 25(1): 1–14, <https://doi.org/10.1117/1.jbo.25.1.014508>.
16. Hu L., Wang N., Cardona E., Walsh A.J. Fluorescence intensity and lifetime redox ratios detect metabolic perturbations in T cells. *Biomed Opt Express* 2020; 11(10): 5674–5688, <https://doi.org/10.1364/boe.401935>.
17. Heaster T.M., Humayun M., Yu J., Beebe D.J., Skala M.C. Autofluorescence imaging of 3D tumor-macrophage microscale cultures resolves spatial and temporal dynamics of macrophage metabolism. *Cancer Res* 2020; 80(23): 5408–5423, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-20-0831>.
18. Miskolci V., Tweed K.E., Lasarev M.R., Britt E.C., Walsh A.J., Zimmerman L.J., McDougal C.E., Cronan M.R., Fan J., Sauer J.D., Skala M.C., Huttenlocher A. In vivo fluorescence lifetime imaging of macrophage intracellular metabolism during wound responses in zebrafish. *Elife* 2022; 11: e66080, <https://doi.org/10.7554/elife.66080>.
19. Walsh A.J., Mueller K.P., Tweed K., Jones I., Walsh C.M., Piscopo N.J., Niemi N.M., Pagliarini D.J., Saha K., Skala M.C. Classification of T-cell activation via autofluorescence lifetime imaging. *Nat Biomed Eng* 2021; 5(1): 77–88, <https://doi.org/10.1038/s41551-020-0592-z>.
20. Lemire S., Thoma O.M., Kreiss L., Völkl S., Friedrich O., Neurath M.F., Schürmann S., Waldner M.J. Natural NADH and FAD autofluorescence as label-free biomarkers for discriminating subtypes and functional states of immune cells. *Int J Mol Sci* 2022; 23(4): 2338, <https://doi.org/10.3390/ijms23042338>.
21. Izosimova A.V., Shirmanova M.V., Shcheslavskiy V.I., Sachkova D.A., Mozherov A.M., Sharonov G.V., Zagaynova E.V., Yuzhakova D.V. FLIM of NAD(P)H in lymphatic nodes resolves T-cell immune response to the tumor. *Int J Mol Sci* 2022; 23(24): 15829, <https://doi.org/10.3390/ijms232415829>.
22. Patton E.E., Mueller K.L., Adams D.J., Anandasabapathy N., Aplin A.E., Bertolotto C., Bosenberg M., Ceol C.J., Burd C.E., Chi P., Herlyn M., Holmen S.L., Karreth F.A., Kaufman C.K., Khan S., Kobold S., Leucci E., Levy C., Lombard D.B., Lund A.W., Marie K.L., Marine J.C., Marais R., McMahon M., Robles-Espinoza C.D., Ronai Z.A., Samuels Y., Soengas M.S., Villanueva J., Weeraratna A.T., White R.M., Yeh I., Zhu J., Zon L.I., Hurlbert M.S., Merlino G. Melanoma models for the next generation of therapies. *Cancer Cell* 2021; 39(5): 610–631, <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.01.011>.
23. Izosimova A.V., Yuzhakova D.V., Skatova V.D., Volchkova L.N., Zagaynova E.V., Chudakov D.M., Sharonov G.V. Deciphering repertoire of B16 melanoma reactive TCRs by immunization, in vitro restimulation and sequencing of IFN γ -secreting T cells. *Int J Mol Sci* 2021; 22(18): 9859, <https://doi.org/10.3390/ijms22189859>.
24. Yuzhakova D.V., Volchkova L.N., Pogorelyy M.V., Serebrovskaya E.O., Shagina I.A., Bryushkova E.A., Nakonechnaya T.O., Izosimova A.V., Zavyalova D.S., Karabut M.M., Izraelson M., Samoylenko I.V., Zagaynov V.E., Chudakov D.M., Zagaynova E.V., Sharonov G.V. Measuring intratumoral heterogeneity of immune repertoires. *Front Oncol* 2020; 10: 512, <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00512>.
25. Zhigalova E.A., Izosimova A.I., Yuzhakova D.V., Volchkova L.N., Shagina I.A., Turchaninova M.A., Serebrovskaya E.O., Zagaynova E.V., Chudakov D.M., Sharonov G.V. RNA-seq-based TCR profiling reveals persistently increased intratumoral clonality in responders to anti-PD-1 therapy. *Front Oncol* 2020; 10: 385, <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00385>.
26. Fontenot J.D., Rasmussen J.P., Williams L.M., Dooley J.L., Farr A.G., Rudensky A.Y. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005; 22(3): 329–341, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.01.016>.
27. Skala M.C., Riching K.M., Bird D.K., Gendron-Fitzpatrick A., Eickhoff J., Eliceiri K.W., Keely P.J., Ramanujam N. In vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia. *J Biomed Opt* 2007; 12(2): 024014, <https://doi.org/10.1117/1.2717503>.
28. Waldman A.D., Fritz J.M., Lenardo M.J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* 2020; 20(11): 651–668, <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>.

29. Liu Y., Zheng P. Preserving the CTLA-4 checkpoint for safer and more effective cancer immunotherapy. *Trends Pharmacol Sci* 2020; 41(1): 4–12, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.11.003>.
30. Zheng K., Zheng X., Yang W. The role of metabolic dysfunction in T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Front Immunol* 2022; 13: 843242, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.843242>.
31. Seidel J.A., Otsuka A., Kabashima K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Front Oncol* 2018; 8: 86, <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00086>.
32. Pires da Silva I., Ahmed T., Reijers I.L.M., Wepler A.M., Betof Warner A., Patrinely J.R., Serra-Bellver P., Allayous C., Mangana J., Nguyen K., Zimmer L., Trojaniello C., Stout D., Lyle M., Klein O., Gerard C.L., Michielin O., Haydon A., Ascierto P.A., Carlino M.S., Lebbe C., Lorigan P., Johnson D.B., Sandhu S., Lo S.N., Blank C.U., Menzies A.M., Long G.V. Ipilimumab alone or ipilimumab plus anti-PD-1 therapy in patients with metastatic melanoma resistant to anti-PD-(L)1 monotherapy: a multicentre, retrospective, cohort study. *Lancet Oncol* 2021; 22(6): 836–847, [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(21\)00097-8](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(21)00097-8).
33. Zappasodi R., Serganova I., Cohen I.J., Maeda M., Shindo M., Senbabaoglu Y., Watson M.J., Leftin A., Maniyar R., Verma S., Lubin M., Ko M., Mane M.M., Zhong H., Liu C., Ghosh A., Abu-Akeel M., Ackerstaff E., Koutcher J.A., Ho P.C., Delgoffe G.M., Blasberg R., Wolchok J.D., Merghoub T. CTLA-4 blockade drives loss of T_{reg} stability in glycolysis-low tumours. *Nature* 2021; 591(7851): 652–658, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03326-4>.
34. Zhou B., Gao Y., Zhang P., Chu Q. Acquired resistance to immune checkpoint blockades: the underlying mechanisms and potential strategies. *Front Immunol* 2021; 12: 693609, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.693609>.
35. Kishton R.J., Sukumar M., Restifo N.P. Metabolic regulation of T cell longevity and function in tumor immunotherapy. *Cell Metab* 2017; 26(1): 94–109, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.016>.