

УДК 615.37:57.043

© Коллектив авторов, 2025

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МЕХАНОИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ПОДХОДА В CAR-T-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Горшков Г.С.¹, Свитич О.А.^{1,2}, Зверев В.В.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Аннотация

Статья посвящена CAR-T-клеточной терапии и изучению новых механоиммунологических подходов, направленных на повышение её эффективности. В данной работе рассматриваются перспективные методы активации Т-клеток, включающие изменение механических свойств их мембран, применение специализированных подложек с различной жесткостью и топографией, а также использование химических веществ для модуляции механочувствительных путей. Основное внимание уделяется анализу механических стимулов, которые могут улучшить пролиферацию, активацию и функциональную активность CAR-T-клеток *ex vivo*. Рассматриваются различные стратегии модификации CAR-T-клеток с использованием методов механоиммунологии. В частности, рассматривается влияние механических нагрузок, создаваемых в конусно-пластинчатом вискозиметре, на активацию Т-клеток, а также использование наномоторов для целенаправленной стимуляции мембран. Анализируются экспериментальные данные о влиянии механических характеристик среды на активацию Т-клеток, включая жесткость подложек, их топографию и влияние геометрических характеристик на усиление иммунного ответа. Приводятся сведения о потенциале использования подложек с нанопорами различной глубины, различными длинами ворсинок и различной геометрией, которые способствуют эффективной активации и пролиферации Т-клеток, а также усилению сигнальных каскадов Т-клеточного рецептора. Отдельное внимание уделяется изучению химических методов активации CAR-T-клеток, включая применение вертепорфина и других соединений, способных модулировать механочувствительные пути. Обсуждаются механизмы их действия и возможные перспективы использования в сочетании с механоиммунологическими методами. Полученные данные могут способствовать созданию более гибких и адаптивных протоколов активации CAR-T-клеток, которые будут учитывать индивидуальные особенности клеточного ответа и опухолевой микросреды. В статье подчеркивается значимость интеграции передовых механоиммунологических подходов с современными методами клеточной инженерии для преодоления существующих барьеров CAR-T-клеточной терапии, особенно в отношении лечения солидных опухолей. Совмещение данных методик может привести к разработке персонализированных стратегий терапии, направленных на повышение её эффективности и безопасности. Обсуждаются перспективы дальнейших исследований в области механоиммунологии и возможности её применения для улучшения различных видов иммунотерапии.

Ключевые слова:

CAR-T-клеточная терапия, механоиммунологический подход, механочувствительность, наномоторы, жесткие среды, вертепорфин.

PRACTICAL ASPECTS OF MECHANOIMMUNOLOGICAL APPROACH IN CAR T-CELL THERAPY

Gorshkov G.S.¹, Svitich O.A.^{1,2}, Zverev V.V.^{1,2}

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

² Federal State Budgetary Scientific Institution «I.I. Mechnikov Vaccine and Serum Research Institute», Moscow, Russia

Abstract

The article examines CAR-T cell therapy and the study of new mechanoimmunological approaches aimed at increasing its efficiency. This paper reviews promising methods of T-cell activation, including alteration of mechanical properties of their membranes, application of specialised substrates with different stiffness and topography, and the usage of chemicals to modulate mechanosensitive pathways. It is mainly focused on the analysis of mechanical stimuli that can improve the proliferation, activation and functional activity of CAR-T cells *ex vivo*. Different strategies for modifying CAR-T cells using mechanoimmunological techniques are reviewed. In particular, the influence of mechanical loads generated in a cone-plate viscometer on T-cell activation is discussed, as well as the use of nanomotors for targeted membrane stimulation. Experimental data on the influence of mechanical characteristics of the medium on T-cell activation are analysed, including substrate stiffness, substrate topography and the effect of geometric characteristics on enhancing the immune response. The potential of using substrates with nanopores of different depths, different pile lengths and different geometries to promote efficient T-cell activation and proliferation as well as enhance T-cell receptor signalling cascades is presented. Special attention is paid to the study of chemical methods of CAR-T cell activation, including the use of verteporfin and other compounds capable of modulating mechanosensitive pathways. Mechanisms of their action and possible prospects of their use in combination with mechanoimmunological methods are discussed. The obtained data may contribute to the creation of more flexible and adaptive protocols of CAR-T cell activation, which will take

into account individual features of cellular response and tumour microenvironment. The article highlights the importance of integrating advanced mechanoimmunological approaches with modern cell engineering techniques to overcome the existing barriers of CAR-T cell therapy, especially for the treatment of solid tumours. The combination of these techniques may lead to the development of personalised therapy strategies aimed at improving efficacy and safety. Prospects for further research in mechanoimmunology and its potential application to improve various immunotherapies are discussed.

Keywords:

CAR-T cell therapy, mechanoimmunological approach, mechanosensitivity, nanomotors, rigid media, verteporfin.

Введение

Иммунотерапия стала одной из самых перспективных стратегий в лечении онкологических заболеваний. Среди современных методов особое место занимает клеточная терапия с использованием Т-лимфоцитов, модифицированных химерными антигенными рецепторами (CAR-T-клеток). Этот метод продемонстрировал высокую эффективность в лечении гемабластозов таких, как острая лимфобластная лейкемия, диффузная В-крупноклеточная лимфома, а также ряда других патологий. Разработка и внедрение CAR-T-клеточной терапии открыли новые возможности для пациентов с рефрактерными и рецидивирующими формами рака, у которых стандартные методы лечения оказались неэффективными [10].

Несмотря на успехи в лечении гематологических злокачественных новообразований, применение CAR-T-клеток в терапии солидных опухолей остается сложной задачей. Основные проблемы при этом связаны с гетерогенностью опухолевых антигенов, иммуносупрессивным микроокружением, создаваемым опухолевыми клетками, недостаточной инфильтрацией CAR-T-клеток в опухолевую ткань, а также недостаточным привлечением CAR-T-клеток к месту опухоли из-за аномальных хемокинов, выделяемых клетками опухоли [9, 10]. Список проблем на этом не заканчивается. Серьезной проблемой CAR-T-клеточной терапии является недостаточная активация Т-клеток *ex vivo* [12].

Современные исследования направлены на улучшение CAR-T-клеточной терапии за счет оптимизации дизайна химерных антигенных рецепторов, внедрения дополнительных костимуляторных доменов и использования регуляторных механизмов для повышения специфичности и безопасности терапии. Инженерные подходы, включающие создание универсальных платформ для нацеливания CAR-T-клеток на несколько антигенов, а также разработка адаптивных конструкций рецепторов, способных изменять свою активность в зависимости от микроокружения, также представляют большой интерес [4, 16].

В последние годы развивается механоиммунологический подход. Исследования показывают,

что его потенциальное применение может значительно повлиять на результаты CAR-T-клеточной терапии [3, 14, 17]. В настоящее время активно изучается возможность модификации методики на основе взаимодействия Т-клеток и механических стимулов, что приводит к комплексной активации иммунного компонента. Интеграция передовых методов клеточной инженерии с инновационными механоиммунологическими подходами открывает широкие перспективы для преодоления существующих барьеров в CAR-T-клеточной терапии, в том числе солидных опухолей, расширяя горизонт лечения онкологических заболеваний.

Механоиммунологические методы

Все известные на данный момент механоиммунологические методы рассматриваются, в основном, в качестве потенциальных *ex vivo* методик. При этом глобально их можно разделить на три группы. В первую категорию входят методы, влияющие на механические свойства мембраны Т-клеток, во вторую – техники с применением различных подложек, а в третью – способы, предполагающие использование химических молекул для активации механочувствительных путей.

Изменять механические свойства мембраны можно при помощи жидкостей или наномоторов.

Экспозиция Т-клеток в конусно-пластинчатом вискозиметре показывает значимую их активацию [5, 14]. Основной задачей является подбор оптимальных временно-силовых характеристик такого воздействия. Слишком большая скорость вискозиметра приводит к разрушению клеток из-за ударов о стенку колбы [5]. При этом в кровеносной и лимфатической системе Т-клетки точно также бьются о стенку сосуда, однако давление, создаваемое там, недостаточно для их разрушения. Диапазон этого давления достаточно широк. В некоторых исследованиях оно варьирует от 4,5 до 60,3 мм.рт.ст. в лимфатических сосудах [15], в сердечно-сосудистой же системе принято считать, что этот интервал изменяется от околонулевых значений до 120 мм.рт.ст. Создание подобных физиологических давлений в вискозиметре не всегда, по всей видимости, приводит к положительному итогу, что, очевидно, связано с различием в эластических свойствах стенки сосуда

и колбы [5]. Между тем эксперименты с околонулевым значением все-таки показали значимые результаты [5, 14]. Тем не менее имеющиеся исследования не позволяют установить конкретный интервал давлений, активирующих Т-клетки.

Немаловажной задачей является определение оптимального времени воздействия. При экспозиции в течение 1 часа наибольшая активация Т-клеток наблюдалась через 3 дня [14]. Исследователи также отмечают, что оптимальное время находится, вероятно, в пределах 30-60 минут и время до 2 часов считается нетоксичным [14]. Однако апробации этих результатов для Т-лимфоцитов, помещенных в конусно-пластинчатый вискозиметр, проведено не было. Таким образом, на данный момент рассматривать одночасовую экспозицию как наиболее эффективную нельзя. Сравнительный анализ текущего результата с уровнями активации Т-клеток при других временах воздействия может способствовать созданию пластичного протокола, эффективного у различных групп пациентов и позволяющего учитывать индивидуальные особенности клеточного ответа и опухолевой микросреды.

Еще одной задачей является изучение различных типов жидкостей. В текущих исследованиях использовались растворы, представляющие собой ньютоновские жидкости [5, 14]. В нормальном же организме большинство жидкостей являются неньютоновскими. Приближение условий активации Т-клеток к физиологическим может привести к повышению её эффективности. Кроме того, изучение аспектов активации Т-клеток в неньютоновских жидкостях может способствовать созданию других методик повышения эффективности CAR-T-клеточной терапии.

Сама идея использования конусно-пластинчатого вискозиметра состоит в возможности преактивации CAR-T-клеток, что, с одной стороны, решит проблему их недостаточной активации, с другой стороны, усложнит их регуляцию опухолевым микроокружением. Известно, что опухолевые клетки и клетки опухолевого окружения способны выделять иммунносупрессирующие факторы такие, как IL-10, TGF- β и др [9]. Преактивация Т-клеток *ex vivo* может удлинять процесс их инактивации, что приведет к снижению образованию дисфункциональных CAR-T-клеток *in vivo*. Текущее состояние проблемы не позволяет создать эффективный протокол активации CAR-T-клеток *ex vivo*, однако следует ожидать, что дальнейшие исследования в данном направлении приведут к эффективной модификации методики.

Другой возможный метод изменения механических свойств мембраны – применение наномоторов [3, 17]. Последние исследования демонстрируют возможность создания Au/Zn и Pd/Au наномоторов, способных достаточно эффективно активировать Т-клетки [3, 17]. При этом исследователи показывают значимый вход ионов кальция внутрь клеток через 2-4 минуты [17] и 50 минут [3] соответственно для первой и второй групп, индуцируемый физическим воздействием наномоторов на мембрану клеток. Выступая в качестве, вторичного мессенджера, ионы кальция активируют пролиферацию и дифференцировку, а также влияют на эффекторные функции Т-клеток. *Ex vivo* применение наномоторов в отношении CAR-T-клеток может способствовать повышению эффективности терапии.

Еще одним методом активации CAR-T-клеток *ex vivo* является активация на специальных средах. При этом все активационные среды можно разделить на жесткие подложки и подложки с богатой топографией.

Использование жестких сред для активации Т-клеток обусловлено накоплением данных, свидетельствующих об усилении активации при увеличении жесткости среды. Так, например, при сравнении полиакриламидных гидрогелей с жесткостью 10, 25, 100 и 200 кПа активация Т-клеток была лучше на средах 100 и 200 кПа по сравнению с мягкими [6]. Между тем в отношении экспрессии IL-2 и фосфорилирования ZAP70 лучше себя показали подложки с жесткостью 100 кПа [6]. Кроме того, исследования на полидиметилсилоксановых гидрогелях указывают на то, что увеличение модуля Юнга среды выше 2 МПа приводит к ухудшению активации по сравнению с мягкими средами, где модуль Юнга не превышает 100 кПа [11]. Совокупно эти данные свидетельствуют о том, что оптимальная жесткость среды для преактивации CAR-T-клеток находится где-то в районе 100 кПа. Задача выбора подложки играет немаловажную роль и с точки зрения других методов CAR-T-клеточной преактивации. Выбор чрезмерно жестких подложек может ухудшать результаты воздействия химическими веществами как за счет влияния на механочувствительные пути, так и посредством снижения доступности химических веществ для Т-клеток. Точно так же и слишком мягкие среды не создадут условия для достаточной преактивации.

Изменение топографии подложек – еще один метод увеличения активации Т-клеток. Среда данной категории часто имитируют внеклеточный матрикс. В связи с этим можно выделить 3 спосо-

ба изменения их геометрии, включающие уменьшение ширины нанопор, оптимизацию длины нановорсинок и увеличение геометрической хаотичности среды. Все они усиливают активацию, пролиферацию и дифференцировку Т-клеток, а также способствуют реорганизации цитоскелета и влияют на эффекторные функции иммунных клеток.

Недавние исследования показывают, что уменьшение ширины нанопоры от 400 нм до 200 нм приводит к более эффективному исключению CD 45 на микроворсинках, проникающих в эти поры [7]. CD 45 ограничивает активацию Т-клеток через TCR, и его удаление способствует эффективному функционированию Т-клеток в иммунологическом синапсе. Использование сред с уменьшенной шириной нанопор может как повышать эффективность преактивации CAR-T-клеток в сочетании с использованием агонистов TCR *ex vivo*, так и улучшать сигнализацию через TCR *in vivo*, совершенствуя CAR-T-клеточную терапию.

Использование подложек с ворсинками разной длины также способно влиять на активацию. Так, например, наблюдалось значимое усиление экспрессии IL-2 и IFN- γ на полидиметилсилоксановых средах с ворсинками длиной 4 мкм по сравнению с 6 мкм и плоскими средами [2]. Эксперименты с ZnO нанопроволоками продемонстрировали, что контакт Т-клеток с нановорсинками происходит только в верхних 2-3 мкм ее длины [1]. Несмотря на это, было показано постепенно усиление экспрессии IFN- γ при увеличении длины ворсинок от 3-5 мкм до 18-20 мкм [1]. Однако транслокация NF- κ B в ядро активировалась приблизительно одинаково для подложек с нанопроволоками различной длины. Исследователи связали подобное явление с полимеризацией F-актина, участвующего в формировании выступов Т-клеток, увеличивающих площадь контакта поверхности Т-клетки с антителами [1]. Совокупно эти данные свидетельствуют о возможном рациональном применении полидиметилсилоксановых сред с длиной ворсинок 3-5 мкм или подложек с ZnO нанопроволоками длиной 18-20 мкм для преактивации CAR-T-клеток.

Увеличение геометрического разнообразия подложки стимулирует экспрессию IL-2, IFN- γ , TNF- α , а также способствует пролиферации Т-клеток [13]. При этом наилучшие результаты показывали мягкие подложки с жесткостью 80 кПа. Тем не менее для хаотичных подложек с жесткостью меньше 160 кПа результаты продукции цитокинов были заметно выше, чем для аналогичных сред с параллельно расположенными фибриллами, что созда-

ет условия для избегания жестких сред в пользу хаотичных мягких. Между тем секреция цитокинов заметно повышалась только для подложки с жесткостью 80 кПа, тогда как для других сред не было заметной разницы у группы с повышенным геометрическим разнообразием по сравнению со второй, что может быть связано с физическими препятствиями для их секреции. В конечном счете использование мягких топографических хаотичных подложек можно рассмотреть в качестве одной из целесообразных методик преактивации CAR-T-клеток. Повышение продукции цитокинов может способствовать увеличению их секреции в организме и более длительному функционированию клеток.

Таким образом, использование различных сред для активации CAR-T-клеток *ex vivo* может рассматриваться в качестве потенциальной методики улучшения результатов CAR-T-клеточной терапии. Широкое разнообразие активационных сред может стать основой для их успешной взаимозаменяемости или для создания более пластичных протоколов в будущем.

Возможно также и применение химических веществ. Например, используется вертепорфин. Его действие на разнообразных подложках индуцировало ряд вышеописанных эффектов [13]. Не исключено и его одиночное применение. Вероятно, ингибируя механочувствительные пути, вертепорфин способен усиливать активацию CAR-T-клеток и их киллерную функцию [8].

Заключение

Исследования, посвященные улучшению CAR-T-клеточной терапии через механоиммунологические подходы, демонстрируют значительный потенциал для повышения её эффективности и безопасности. Применение различных методов активации (Рис. 1), включая оптимизацию механических свойств мембраны Т-клеток, использование специфических подложек с регулируемой жесткостью и топографией, а также обработка химическими агентами, такими как вертепорфин, открывают новые пути для преодоления существующих барьеров в лечении солидных опухолей. Совмещение клеточной инженерии с инновационными методами активации создает основу для разработки более гибких и персонализированных протоколов терапии. Перспективы дальнейших исследований в этой области обещают значительные прорывы в клеточной терапии и расширение её применения в онкологии, что может радикально изменить подходы к лечению пациентов с агрессивными и рефрактерными опухолями.



Рис. 1. Классификация механоиммунологических методов, перспективных для CAR-T-клеточной терапии

Литература

- Bhingardive V. Antibody-Functionalized Nanowires: A Tuner for the Activation of T Cells / Bhingardive V., Kossover A., Iraqi M., et al. // *Nano Letters*. – 2021. – Vol. 21, № 10. – P. 4241–4248. DOI: 10.1021/acs.nanolett.1c00245
- Chaudhuri P.K. Modulating T cell activation using depth sensing topographic cues / Chaudhuri P.K., Wang M.S., Black C.T., Huse M., Kam L.C. // *Advanced biosystems*. – 2020. – Vol. 4, № 9. – P. e2000143. DOI: 10.1002/adbi.202000143
- Fu D. Mechanically Optimize T Cells Activation by Spiky Nanomotors / Fu D., Xie D., Wang F., Chen B., Wang Z., Peng F. // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2022. – Vol. 10. – P. 844091. DOI: 10.3389/fbioe.2022.844091
- Hong M. Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy / Hong M., Clubb J. D., Chen Y.Y. // *Cancer Cell* – 2020. – Vol. 38, № 4. – P. 473–488. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.07.005
- Hope J.M. Fluid shear stress enhances T cell activation through Piezo1 / Hope J.M., Dombroski J.A., Pereles R.S., et al. // *BMC Biology*. – 2022. – Vol. 20, № 1. – P. 61. DOI: 10.1186/s12915-022-01266-7
- Judokusumo E. Mechanosensing in T Lymphocyte Activation / Judokusumo E., Tabdanov E., Kumari S., Dustin M.L., Kam L.C. // *Biophysical Journal*. – 2012. – Vol. 102, № 2. – P. L5–L7. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.12.011
- Jung Y. CD45 pre-exclusion from the tips of T cell microvilli prior to antigen recognition / Jung Y., Wen L., Altman A., Ley K. // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – P. 3872. DOI: 10.1038/s41467-021-23792-8
- Liang J.A Case Study of Chimeric Antigen Receptor T Cell Function: Donor Therapeutic Differences in Activity and Modulation with Verteporfin / Liang J., Fang D., Gumin J., et al. // *Cancers*. – 2023. – Vol. 15, № 4. – P. 1085. DOI: 10.3390/cancers15041085
- Liu Z. Immunosuppression in tumor immune microenvironment and its optimization from CAR-T cell therapy / Liu Z., Zhou Z., Dang Q., et al. // *Theranostics*. – 2022. – Vol. 12, № 14. – P. 6273–6290. DOI: 10.7150/thno.76854
- Maalej K.M. CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances / Maalej K. M., Merhi M., Inchakalody V. P., et al. // *Molecular Cancer*. – 2023. – Vol. 22. – P. 20. DOI: 10.1186/s12943-023-01723-z
- O'Connor R.S. Substrate Rigidity Regulates Human T Cell Activation and Proliferation / O'Connor R. S., Hao X., Shen K., et al. // *The Journal of Immunology*. – 2012. – Vol. 189, № 3. – P. 1330–1339. DOI: 10.4049/jimmunol.1102757
- Poorebrahim M. Counteracting CAR T cell dysfunction / Poorebrahim M., Melief J., Pico de Coaña Y., L. Wickström S., Cid-Arregui A., Kiessling R. // *Oncogene*. – 2021. – Vol. 40, № 2. – P. 421–435. DOI: 10.1038/s41388-020-01501-x
- Sapudom J. Matrix stiffening from collagen fibril density and alignment modulates YAP-mediated T-cell immune suppression / Sapudom J., Alatoon A., Tipay P. S., Teo J. C. // *Biomaterials*. – 2025. – Vol. 315. – P. 122900. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2024.122900
- Sarna N.S. Enhanced and sustained T cell activation in response to fluid shear stress / Sarna N. S., Desai S. H., Kaufman B. G., Curry N. M., Hanna A. M., King M. R. // *iScience*. – 2024. – Vol. 27, № 6. DOI: 10.1016/j.isci.2024.109999
- Thorup L. The transport function of the human lymphatic system – A systematic review / Thorup L., Hjortdal A., Boedtkjer D. B., Thomsen M. B., Hjortdal V. // *Physiological Reports*. – 2023. – Vol. 11, № 11. – P. e15697. DOI: 10.14814/phy2.15697
- Wu Y. Engineering CAR T cells for enhanced efficacy and safety / Wu Y., Huang Z., Harrison R., et al. // *APL Bioengineering*. – 2022. – Vol. 6, № 1. – P. 011502. DOI: 10.1063/5.0073746
- Xie D. Mechanical Activation of Immune T Cells via a Water Driven Nanomotor / Xie D., Fu D., Fu S., et al. // *Advanced Healthcare Materials*. – 2022. – Vol. 11, № 12. – P. 2200042. DOI: 10.1002/adhm.202200042.

Контакты авторов:

Горшков Г.С.

e-mail: gorshkov.grigoriy@mail.ru

Конфликт интересов: отсутствует