

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОЕ РЕГИОНАЛЬНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
РОССИЙСКОЙ АССОЦИАЦИИ АЛЛЕРГОЛОГОВ И КЛИНИЧЕСКИХ ИММУНОЛОГОВ
(СПб РО РААКИ)

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

март-апрель

2017, том 19

№ 2

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

Фрейдлин Ирина Соломоновна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Заместитель главного редактора

Тотолян Арег Артемович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии, Санкт-Петербург, Россия

Редакционная коллегия

Горячкина Людмила Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической аллергологии Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава России, Москва, Россия

Кашкин Кирилл Павлович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава России, Москва, Россия

Кетлинский Сергей Александрович – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Климович Владимир Борисович – доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории гибридной технологии Российского научного центра радиологии и хирургических технологий Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Козлов Владимир Александрович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

Корнева Елена Андреевна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, главный научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Мазуров Вадим Иванович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, президент Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова Минздрава России, заведующий кафедрой терапии и ревматологии имени Э.Э. Эйхвальда, Санкт-Петербург, Россия

Назаров Петр Григорьевич – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.

E-mail: medimmun@spb.aaci.ru

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197136, Санкт-Петербург, а/я 58.

Электронная версия: www.mimmun.ru; www.elibrary.ru

© Медицинская иммунология

Журнал зарегистрирован Северо-Западным региональным управлением Государственного комитета РФ по печати 26 марта 1999 г.

Свидетельство о регистрации № П 3612.

Министерством РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций 30 июня 2003 г.

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №ФС77-60436 30 декабря 2014 г.

Издательство «Человек»

199004, Россия, Санкт-Петербург, Малый пр. В.О., 26, оф. 2.

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64, 328-18-68.

Подписано в печать 24.03.2017 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 14,25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1055

Напечатано в ООО «ИПК Береста».

196084, Россия, Санкт-Петербург, ул. Коли Томчака, 28.

Тел.: (812) 388-90-00

С 2001 г. журнал «Медицинская иммунология» регулярно входит в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук», рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

С июня 2016 года журнал «Медицинская иммунология» включен в международную базу SCOPUS

Недоспасов Сергей Артурович – доктор биологических наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии МГУ им. М.В. Ломоносова и заведующий отделом молекулярной иммунологии в Институте физико-химической биологии им. Белозерского МГУ, Москва, Россия

Пинегин Борис Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунодиагностики и иммунокоррекции ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Симбирцев Андрей Семенович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Смирнов Вячеслав Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель Медико-биологического научно-производственного комплекса «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия

Хайтов Рахим Мусаевич – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, научный руководитель ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Черных Елена Рэмовна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, Новосибирск, Россия

Редакционный совет

Ласунская Елена – доктор медицинских наук, профессор, Государственный университет Северной Флориды, Лаборатория биологии распознавания, Рио-де-Жанейро, Бразилия

Мароди Ласло – доктор медицинских наук, профессор, Университет Дебрецена, Медицинский научный центр, Отдел инфекционной и педиатрической иммунологии, Дебрецен, Венгрия

Михалеk Ярослав – доктор медицинских наук, Университет города Брно, заведующий кафедрой фармакологии медицинского факультета, Брно, Чехия

Роггенбук Дирк – доктор медицинских наук, профессор, Университет Лаузиц «University of Applied Sciences», Зенфтенберг, Германия

Сеонг Сеунг-Йонг – доктор медицинских наук, Национальный Университет, руководитель кафедры микробиологии и иммунологии, Сеул, Корея

Тендлер Евгений – доктор медицинских наук, Медицинский центр Рамбам, Отдел клинической биохимии, Хайфа, Израиль

Фейст Евгений – доктор медицинских наук, Университет Гумбольдта, клиника «Шаритэ», руководитель отделения ревматологии и клинической иммунологии, Берлин, Германия

Халдоянниди Софья – доктор медицинских наук, профессор, Институт молекулярных исследований, Сан-Диего, Калифорния, США

RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH

(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

March-April

2017, volume 19

No. 2

Published since March 1999

Editor-in-Chief

Irina S. Freidlin – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Chief researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Deputy Editor-in-Chief

Areg A. Totolian – PhD, MD, Professor, RAS full member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Director, Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Editorial Board

Ludmila A. Goriachkina – PhD, MD, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Clinical Allergology, Chief, Moscow, Russian Federation

Kirill P. Kashkin – PhD, MD, Professor, RAS full member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Immunology, Chief, Moscow, Russian Federation

Sergei A. Ketlinskij – PhD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Deputy-director on Science, St. Petersburg, Russian Federation

Vladimir B. Klimovich – PhD, MD, Professor, Russian Center of Radiology and Surgery Technologies, Laboratory of Hybridoma technology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Vladimir A. Kozlov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Scientific Director, Novosibirsk, Russian Federation

Elena A. Korneva – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Experimental Medicine, Department of Pathology and Pathophysiology, Chief researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Vadim I. Mazurov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Nord-Western State Medical University, President, Department of Therapy and Rheumatology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Petr G. Nazarov – PhD, MD, Professor, Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Sergei A. Nedospasov – PhD, Professor, RAS full member, Lomonosov State University, Department of Immunology, chief, Institute of Physico-Chemical Biology, Belozersky, Department of Molecular Immunology, Chief, Moscow, Russian Federation

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaja
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, PhD, MD

Editorial Office: phone/fax +7 812 233-08-58

Address for correspondence:

197136, St. Petersburg, P.O. Box 58.

Electronic version: www.mimmun.ru; www.elibrary.ru

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

Broadcasting and Mass media of the Russian Federation, June 30, 2003.

Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (ROSKOMNADZOR)

Certificate on registration of mass media PI №FS77-60436, December 30, 2014

Chelovek Publishing House

199004, Russian Federation, St. Petersburg, Malyye pers. Vasilevsky Island, 26, office 2.

E-mail: mail@mirmed.ru

Phone/fax: (812) 325-25-64, 328-18-68.

Passed for printing 24.03.2017. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 14,25. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Produced at the IPK Beresta Printing House.

196084, Russian Federation, St. Petersburg, Kolya Tomchak str., 28.

Phone: (812) 388-90-00

Since 2001, the Medical Immunology Journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific Journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science

Since June 2016 the Medical Immunology Journal is included into international SCOPUS database

Boris V. Pinegin – PhD, MD, Professor, Institute of Immunology, Department of Immunodiagnosics and Immunotherapy, Chief, Moscow, Russian Federation

Andrei S. Simbirtsev – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Director, St. Petersburg, Russian Federation

Viacheslav S. Smirnov – PhD, MD, Professor, "Cytomed" Ltd., Director on Science, St. Petersburg, Russian Federation

Rahim M. Khaitov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Immunology, Scientific Director, Moscow, Russian Federation

Elena R. Chernykh – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Deputy-director on Science, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Chief, Novosibirsk, Russian Federation

Editorial Council

Eugen Feist – PD, MD, Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Free University and Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany

Sophia Khaldoyanidi – PhD, MD, Associate Member, Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, CA, USA

Elena Lasunskaja – PhD, MD, Associated Professor, Laboratory of Biology of Recognition, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil

László Maródi – PhD, MD, Professor, Department of Infectious and Pediatric Immunology, University of Debrecen Medical and Health Science Centre, Debrecen, Hungary

Jaroslav Michálek – PhD., MD, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Dirk Roggenbuck – PhD, MD, Professor, Lausitz University of Applied Sciences, Senftenberg, Germany

Seung-Yong Seong – PhD, MD, Seoul National University, Associate Dean for Planning, Department of Microbiology and Immunology, Chief, Seoul, South Korea

Yevgeny Tendler – PhD, MD, Department of Clinical Biochemistry, Rambam Medical Center, Haifa, Israel

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Черенова Л.В., Каштиго Т.В., Саядян Х.С., Шмаров М.М.

РАЗРАБОТКА ВАКЦИН НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ: ОБЗОР ЗАРУБЕЖНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ (ЧАСТЬ 1)	111
---	-----

Непомнящих Т.С., Антонец Д.В., Максютков Р.А.

КРАТКИЙ ОБЗОР КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ СРЕДСТВ ИММУНОТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	127
--	-----

Стёганцева М.В., Мелешко А.Н.

ПРОТИВОРАКОВАЯ ДНК-ВАКЦИНАЦИЯ: ПРИНЦИП И ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА	145
---	-----

Оригинальные статьи

Богомолова Е.Г., Добровольская О.А., Федорова Е.А., Кондрашкина А.М., Колмаков Н.Н., Ищук С.А., Духовлинов И.В., Симбирцев А.С.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ КОНЪЮГИРОВАННЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ЛИГАНДОВ И БЕЛКА-НОСИТЕЛЯ CRM197	157
---	-----

Ширинский В.С., Казыгашева Е.В., Калиновская Н.Ю., Ширинский И.В.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ АГОНИСТА PPAR α ФЕНОФИБРАТА У БОЛЬНЫХ С ДИАБЕТ-АССОЦИИРОВАННЫМ ОСТЕОАРТРИТОМ: ПЕРЕКРЕСТНОЕ ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	165
---	-----

Краткие сообщения

Будкова А.И., Лапин С.В., Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В., Тришина И.Н., Маслянский А.Л., Тотолян Арег А.

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ В-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ	175
--	-----

Силков А.Н., Чердынцева Н.В., Максимов В.Н., Сенников С.В.

ПОЛИМОРФИЗМ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ И ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	185
--	-----

Виткина Т.И., Денисенко Ю.К., Сидлецкая К.А.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА К IL-6 НА ПОВЕРХНОСТИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ПРОГРЕССИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ	191
--	-----

Еремеев В.В., Духовлинов И.В., Орлов А.И., Маленко А.Ф., Федорова Е.А., Балазовский М.Б., Гергерт В.Я.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ВАКЦИННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ Ag85, TB10 И FliC	197
--	-----

Юбилей	203
--------------	-----

Дневник иммунолога	205
--------------------------	-----

Правила для авторов	215
---------------------------	-----

Авторский указатель	218
---------------------------	-----

Предметный указатель	218
----------------------------	-----

CONTENTS

Reviews

Cherenova L.V., Kashtigo T.V., Saiadian Kh.S., Shmarov M.M.

DEVELOPMENT OF VACCINES BASED ON ADENOVIRAL VECTORS: A REVIEW OF FOREIGN CLINICAL STUDIES (PART 1).....	111
--	------------

Nepomnyashchikh T.S., Antonets D.V., Maksyutov R.A.

SHORT OVERVIEW OF CLINICAL TRIALS WITH CURRENT IMMUNOTHERAPEUTIC TOOLS FOR CANCER TREATMENT	127
--	------------

Stegantseva M.V., Meleshko A.N.

ANTICANCER DNA VACCINATION: PRINCIPLE AND PERSPECTIVES OF THE METHOD	145
---	------------

Original articles

Bogomolova E.G., Dodrovolskaya O.A., Fedorova E.A., Kondrashkina A.M., Kolmakov N.N., Ishchuk S.A., Dukhovlinov I.V., Simbirtsev A.S.

ANTIGENIC ACTIVITY ASSAYS OF EXPERIMENTAL CONJUGATE VACCINES BASED ON SYNTHETIC OLIGOSACCHARIDE LIGANDS AND CRM197 CARRIER PROTEIN	157
---	------------

Shirinsky V.S., Kazygasheva E.V., Kalynovskaya N.Yu., Shirinsky I.V.

CLINICAL EFFICIENCY AND SAFETY OF FENOFIBRATE, A PPARα AGONIST, IN THE PATIENTS WITH DIABETES ASSOCIATED OSTEOARTHRITIS: A CROSS-OVER PILOT STUDY	165
--	------------

Short communications

Budkova A.I., Lapin S.V., Serebriakova M.K., Kudryavtsev I.V., Trishina I.N., Maslyansky A.L., Totolian Areg A.

B-CELL SUBPOPULATIONS OF PERIPHERAL BLOOD IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS.....	175
---	------------

Silkov A.N., Cherdyntseva N.V., Maximov V.N., Sennikov S.V.

PROMOTER POLYMORPHISMS OF GENES ENCODING TUMOR NECROSIS FACTOR AND INTERLEUKIN-1 IN BREAST CANCER PATIENTS.....	185
--	------------

Vitkina T.I., Denisenko Yu.K., Sidletskaya K.A.

CHANGES IN THE SURFACE IL-6 RECEPTOR EXPRESSION OF DISTINCT IMMUNE CELLS IN PROGRESSION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE.....	191
--	------------

Yeremeev V.V., Duhovlinov I.V., Orlov A.I., Malenko A.F., Fedorova E.A., Balazovsky M.B., Gergert V.Ya.

STUDIES ON PROTECTIVE EFFECTS OF A VACCINE, BASED ON RECOMBINANT Ag85, TB10 AND FliC PROTEINS	197
--	------------

Anniversary	203
--------------------------	------------

Chronicle	205
------------------------	------------

Instructions to Authors	215
--------------------------------------	------------

Author index	218
---------------------------	------------

Subject index.....	218
---------------------------	------------

РАЗРАБОТКА ВАКЦИН НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ: ОБЗОР ЗАРУБЕЖНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ (ЧАСТЬ 1)

Черенова Л.В.¹, Каштиго Т.В.¹, Саядян Х.С.², Шмаров М.М.¹

¹ ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ГБОУ ВПУ «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Для многих инфекционных заболеваний, представляющих серьезную опасность для человека, до сих пор не разработаны эффективные способы лечения и профилактики. В настоящее время одним из наиболее действенных и доминирующих способов профилактики массовых вспышек вирусных и бактериальных инфекций является иммунизация населения с помощью вакцин. При этом массовая иммунизация способствует уменьшению количества переносчиков инфекций, что значительно снижает возможность распространения заболеваний. Новейшей разработкой, которая демонстрирует большой потенциал возможного использования, являются генно-инженерные вакцины на основе аденовирусных векторов, многие из которых уже находятся на той или иной стадии клинических испытаний. Генетическая иммунизация с использованием рекомбинантных аденовирусов основана на доставке в клетки человека только генов, кодирующих синтез необходимых антигенов, что позволяет не использовать при получении вакцин живые патогенные вирусы или бактерии, делая при этом технологию получения вакцин универсальной. При этом значительно сокращается время получения вакцинного препарата и, соответственно, разработки и создания новых вакцин, что является важным фактором при угрозе возникновения эпидемий и пандемий. Среди преимуществ аденовирусных векторов — высокая способность к проникновению в клетки человека, способность вызывать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ, при их введении в организм человека происходит достаточно длительная и активная наработка антигенов, безопасность в использовании, простота получения препаративных количеств вакцин. В данном обзоре мы планируем привести сведения о проводимых в настоящее время за рубежом клинических испытаниях вакцин на основе аденовирусных векторов против различных инфекционных заболеваний. Будут рассмотрены параметры отбора добровольцев, участвующих в испытаниях, схемы, используемые при вакцинации, дозы и способы введения препаратов, приведены результаты завершённых экспериментов и предварительные результаты незаконченных на данный момент исследований.

Ключевые слова: аденовирусный вектор, вакцина, клинические испытания, инфекционные заболевания, аденовирус человека, аденовирус шимпанзе

DEVELOPMENT OF VACCINES BASED ON ADENOVIRAL VECTORS: A REVIEW OF FOREIGN CLINICAL STUDIES (PART 1)

Cherenova L.V.^a, Kashtigo T.V.^a, Saiadian Kh.S.^b, Shmarov M.M.^b

^a N. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b First Moscow I. Sechenov State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. There are no effective approaches to treatment and prevention of many infectious diseases representing a significant danger to humans. So far, mass vaccine immunization is among the most efficient

Адрес для переписки:

Черенова Любовь Викторовна
ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18.
Тел.: 8 (916) 329-92-78.
Факс: 8 (499) 193-61-35.
E-mail: cherenova@yandex.ru

Address for correspondence:

Cherenova Liubov V.
N. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 18.
Phone: 7 (916) 329-92-78.
Fax: 7 (499) 193-61-35.
E-mail: cherenova@yandex.ru

Образец цитирования:

Л.В. Черенова, Т.В. Каштиго, Х.С. Саядян, М.М. Шмаров «Разработка вакцин на основе аденовирусных векторов: обзор зарубежных клинических исследований» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 111–126.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-111-126
© Черенова Л.В. и соавт., 2017

For citation:

L.V. Cherenova, T.V. Kashtigo, Kh.S. Saiadian, M.M. Shmarov "Development of vaccines based on adenoviral vectors: a review of foreign clinical studies", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 111–126.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-111-126
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-2-111-126

and widely used approaches to prevent outbreaks of viral and bacterial infections. Mass immunization helps to reduce the number of carriers of infections, thus significantly decreasing probability of infection dissemination. Recent promising developments include genetically engineered vaccines based on adenoviral vectors, many of which are already at various stages of clinical trials. Genetic immunization with recombinant adenovirus-based vaccines allows delivery of the genes encoding only required antigens to human cells, thus allowing avoidance of conventional vaccines, e.g., live pathogenic viruses and bacteria, and providing versatile technologies for vaccine development. These advances significantly reduce the time needed for vaccine production and, respectively, the development and creation of new vaccines, thus being an important factor in decreasing risk of epidemics and pandemics. Advantages of adenoviral vectors include high ability of penetration into human cells, a potential for induction of both humoral and cellular immune response, rather long and active production of antigens following administration of adenoviral vectors into the human, safe usage, ease of obtaining preparative quantities of vaccines. In this review, we provide information about the ongoing worldwide clinical trials of adenoviral vector-based vaccines against various infectious diseases, like as to consider selection parameters of volunteers participating in the testing, vaccination schedule, doses and methods of drug administration, results of completed experiments, and preliminary data on currently ongoing research.

Keywords: adenoviral vector, vaccine, clinical trials, infectious diseases, human adenovirus, chimpanzee adenovirus

Введение

С каждым годом растет число генно-инженерных вакцин, которые находятся в процессе клинических испытаний. И хотя все этапы клинических испытаний занимают годы, уже недалек тот день, когда использование подобных препаратов прочно войдет в медицинскую практику, что вызывает необходимость заранее знакомить с ними не только научных работников, но и практикующих врачей.

В нашем обзоре будут рассмотрены вакцины на основе аденовирусных векторов для профилактики и лечения различных инфекционных заболеваний, зарегистрированные как проходящие клинические испытания на добровольцах на сайте ClinicalTrials.gov. ClinicalTrials.gov – это веб-ресурс, который предоставляет доступ к базе данных об общественных и частных клинических исследованиях на добровольцах по различным заболеваниям. Информация на сайте предоставляется главным исследователем или спонсором клинического исследования. Регистрация на данном веб-ресурсе является добровольной, однако с каждым годом все больше специалистов стремятся зарегистрировать свои исследования. Поддержку веб-сайта осуществляет Национальная библиотека медицины (National Library of Medicine [NLM]) Национальных институтов здоровья США (National Institutes of Health [NIH]). Исследования, представленные в базе данных, проводятся не только в США, но и в 189 странах мира.

Согласно данным сайта ClinicalTrials.gov, в настоящее время клинические испытания (фаза 1-4) прошли или проходят более сотни вакцин на основе аденовирусных векторов. С какими же патогенами предлагается бороться в будущем при помощи генно-инженерных технологий? На первом месте, несомненно, находится ВИЧ (вирус иммунодефицита человека), далее следуют вирус Эбола, малярия, грипп, туберкулез,

гепатит С, сибирская язва и респираторно-синцитиальный вирус (RSV). Стоит отметить, что все вышеперечисленные возбудители либо вызывают латентные или хронические заболевания, либо не приводят к выработке стерильного иммунитета после перенесенного заболевания, либо характеризуются внутривидовой изменчивостью (антигенная изменчивость, антигенный дрейф, серологическая изменчивость, мутации и т.д.), что препятствует созданию для данных заболеваний эффективных вакцин классическими методами или снижает эффективность существующих вакцин, защищающих только от определенных штаммов, требуя индивидуального подхода для создания вакцинных препаратов.

Применение аденовирусов в качестве векторов обусловлено их хорошей изученностью и особыми природными свойствами, которые позволяют доставлять чужеродный генетический материал в клетки человека. Среди преимуществ аденовирусов как генно-инженерных вакцин – их естественный механизм взаимодействия с клеткой и проникновения в клетку, способность обеспечивать довольно длительную экспрессию антигена, при этом вирусная оболочка защищает антиген, встроенный в вирусный геном, способность активировать врожденный иммунный ответ. Используемые для создания вакцин рекомбинантные аденовирусы, как правило, являются репликативно-дефектными и безопасными, так как у них делетированы ответственные за репликацию вируса в клетках участки генома. Все полученные до настоящего времени научные данные подтверждают безопасность вакцин на основе аденовирусов, так как в репликативно-дефектной форме они не патогенны для человека и не интегрируют в клеточный геном.

В первой части обзора нами будут рассмотрены общие вопросы применения аденовирусных векторов в качестве вакцин: типы используемых аденовирусов, дозы, способы и схемы вакцина-

ции, параметры отбора добровольцев, а также вакцины против ВИЧ на основе аденовирусных векторов, участвующие в клинических испытаниях.

Аденовирусные векторы

Используемые в клинических испытаниях векторы на основе аденовирусов можно разделить на две большие группы: векторы на основе аденовирусов человека и векторы на основе аденовирусов животных. Среди аденовирусов человека, используемых в качестве средства доставки антигенов, наиболее изученным и распространенным является аденовирус человека 5 серотипа (Ad5). В последнее время его используют преимущественно в прайм-буст схемах вакцинации в комбинации с ДНК либо с другим вирусным вектором (например, аденовирусом другого типа, вирусом осповакцины). Также используются химерные аденовирусные векторы — так, в исследовании, заявленном Национальным институтом аллергологии и инфекционных болезней США (National Institute of Allergy and Infectious Diseases [NIAID]), используется вектор на основе Ad5, гексон которого заменен на гексон аденовируса 48 серотипа с целью изменения тропности вируса [3]. Как известно, аденовирусы способны проникать в широкий спектр клеток: эпителий дыхательных путей, эндотелиальные, мышечные, гематопозитические, дендритные, первичные опухолевые и другие типы клеток организма [12, 22, 46]. При этом определенный серотип аденовируса способен к проникновению в определенный тип клеток, что используется для создания аденовекторов со специфической направленностью, так называемых таргетных векторов. Применение генно-инженерных вакцин на основе Ad5 может быть ограничено наличием предсуществующего иммунного ответа у людей, уже встречавшихся ранее с этим вирусом (а это достаточно большая часть популяции людей — в зависимости от региона от 45 до 90%) [41, 49]. Однако, согласно литературным данным, при интраназальном способе введения вакцины на основе Ad5 можно избежать подобных неблагоприятных явлений [17]. Также использование различных методов увеличения экспрессии антигена в составе аденовирусного вектора приводит к тому, что иммунная система при введении такой вакцины сосредотачивается на ответе к данному антигену, вызывая уменьшение иммунного ответа к белкам самого аденовируса [51]. Достаточно широкое распространение в качестве векторов в клинических исследованиях получили аденовирусы человека 35 серотипа (Ad35), 26 серотипа (Ad26), 4 серотипа (Ad4), 6 и 7 серотипов (Ad6 и Ad7), что позволяет исследователям также обойти проблему предсуществующего иммунного ответа на Ad5 и получить вектор с повышенной тропностью к определенным клеткам и тканям.

Среди векторов на основе аденовирусов животных в клинических исследованиях применяются векторы на основе аденовирусов обезьян — аденовирус шимпанзе 3 серотипа (ChAd3) и аденовирус шимпанзе 63 серотипа (ChAd63). Их использование также снимает проблему предсуществующего иммунитета по отношению к аденовирусам человека, так как в человеческой популяции уровень наличия предсуществующих антител к вектору на основе аденовирусов обезьян крайне низок (в США и странах Африки около 5% населения) [18, 28]. Стоит отметить, что данные векторы показывают сравнимые с Ad5 уровни иммуногенности и защитной эффективности, а также демонстрируют наличие эффективного клеточного иммунного ответа в доклинических исследованиях, не вызывая патологических изменений и заболеваний у человека. Филогенетические исследования аденовирусов шимпанзе показали их высокую гомологию с одноклеточными аденовирусами человека, продемонстрировав и значительное геномное сходство, что позволяет выращивать рекомбинантные аденовирусы шимпанзе в культурах клеток, адаптированных для получения рекомбинантных аденовирусов человека (например, HEK293). При этом в полученных препаратах было продемонстрировано отсутствие репликативно-компетентных аденовирусов шимпанзе [42].

Параметры отбора добровольцев

Для участия в клинических испытаниях, как правило, отбирались здоровые добровольцы в возрасте от 18 до 50 лет, мужчины и женщины. Верхняя граница возрастного ценза для испытуемых могла колебаться от 35 до 65 лет, в зависимости от целей исследования. Женщины обязательно проходят тест на беременность и предупреждаются о необходимости использования контрацепции для предупреждения наступления беременности. Также, при необходимости, для проведения исследований могут быть отобраны люди, являющиеся носителями хронических инфекций, против которых направлена вакцина, либо лица с высокой опасностью заражения ими (например, ВИЧ). Достаточно часто при отборе добровольцев для испытаний вакцин на основе аденовирусов их тестируют на наличие предсуществующего иммунного ответа на данный тип вектора. По результатам анализов крови отбираются добровольцы с низким уровнем иммунного ответа или его полным отсутствием. В некоторых исследованиях в эксперимент берут добровольцев с предсуществующим иммунным ответом, выделяя их в отдельную группу.

Схемы вакцинации

В последнее время наиболее эффективной для вакцинации с использованием аденовекторов является схема комбинированной или прайм-буст вакцинации, что позволяет получить более

сильный иммунный ответ по сравнению с ранее использовавшимися схемами с одной прививкой. Схема прайм-буст вакцинации подразумевает, что вначале происходит праймирование иммунного ответа (или индукция клеточного иммунного ответа) при помощи ДНК или вектора, несущего ген патогена, а затем иммунный ответ бустится (или индуцируется гуморальный иммунный ответ) также с использованием вектора или ДНК. Аденовекторы используют в комбинации с ДНК-вакцинами [32, 45], вектором на основе вируса осповакцины [42, 47] или другими аденовекторами [6]. Согласно литературным данным, сроки между введением прайм- и буст-компонентов вакцины могут иметь решающее значение для достижения полной защиты [13]. В связи с этим возникает необходимость для каждой конкретной генно-инженерной вакцины тщательно изучить разные режимы и схемы ее введения для получения максимального эффекта от вакцинации, поэтому во многих клинических исследованиях компоненты вакцины вводятся в различных сочетаниях с разными временными интервалами, исследуется длительность иммунитета между прививками. Также находят применение и схема комбинации в составе вакцины нескольких аденовекторов одного типа, несущих различные антигены [14, 48].

Используемые дозы вакцин

Как правило, векторы на основе Ad5 вводятся в дозах 10^8 - 10^{11} ОЕ или вирусных частиц (вч). Для Ad4 исследуемые дозы составляют 10^3 - 10^{11} вч, Ad6 — 10^8 - 10^{11} вч, Ad26 — 10^9 - 10^{11} вч (чаще используется доза 5×10^{10} вч), Ad35 — 10^8 - 10^{11} вч. Для векторов на основе аденовирусов обезьян используют следующие дозы: для ChAd3 используемые дозы 10^9 - 10^{10} вч, для ChAd63 — 10^8 - 10^{11} вч. Все используемые дозы аденовекторов безопасны.

Способы введения вакцин

Преимущественным способом введения вакцин на основе аденовекторов является внутримышечная иммунизация, в большинстве исследований — в дельтовидную мышцу. Для вакцинации используются как стандартные шприцы, так и Biojector — шприц-пистолет с газовым патроном для массовой вакцинации без применения иглы. Стоит отметить, что в результате экспериментов с использованием Biojector у добровольцев увеличивалась частота местных реакций на введение вакцины, однако иммунный ответ на вакцину при использовании иглы либо Biojector не отличался [44], хотя ранее были получены данные о более высоком иммунном ответе у людей, получивших вакцину с помощью Biojector [23]. В ряде исследований сравнивался внутримышечный, внутрикожный и подкожный способ введения вакцин на основе аденовекторов человека и обезьян. Согласно полученным данным, у добровольцев, вакцинированных внутримышечно, местные

неблагоприятные реакции (зуд, покраснение, отек, боль и т.д.) наблюдались значительно реже по сравнению с добровольцами, которым аденовектор вводился двумя другими способами [20, 32, 42]. Для вакцинации против гриппа Ad4 и Ad5 используются интраназально в виде спрея и перорально в составе кишечнорастворимых капсул [25, 35]. В силу своих особенностей (вирус обладает большей тропностью к слизистым оболочкам), для Ad4 характерен оральный способ вакцинации для профилактики и лечения не только вируса гриппа, но и бактерий сибирской язвы и ВИЧ (NCT01979406 и NCT01989533, PaxVax Inc.). Также против ВИЧ используется вакцина в виде капсул с оральным способом введения на основе Ad26 (NCT02366013, International AIDS Vaccine Initiative). Для вакцинации против туберкулеза Ad5 предполагается доставлять в дыхательные пути в виде аэрозоля при помощи небулайзера (NCT02337270, McMaster University).

Вакцины против ВИЧ (табл. 1)

Неудачными стали клинические испытания трехвалентной вакцины против ВИЧ на основе Ad5, предложенной Merck Sharp & Dohme Corp. — MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef (V520). Несмотря на то, что вакцина была безопасна и показала у здоровых добровольцев Т-клеточный иммунный ответ на ВИЧ-антигены, ее использование у ВИЧ-инфицированных и добровольцев с высоким риском заражения не дало достоверных отличий от групп, получавших плацебо, наблюдался незначительный или краткосрочный эффект вирусной супрессии [21, 34]. При этом полученные в результате клинических испытаний данные позволили предположить повышенный риск инфицирования ВИЧ, связанный с иммунизацией вакцинами данного типа, что привело к остановке вакцинации данным препаратом. Наиболее высокой восприимчивость к ВИЧ-инфекции была вскоре после вакцинации, однако через 18 месяцев от начала проведения вакцинации этот риск снижался, особенно в группах с мужчинами, которым не было сделано обрезание и/или Ad5-серопозитивными [19]. Стоит отметить, что риск инфицирования не зависел от количества полученных доз вакцины [24]. Дальнейшее изучение групп добровольцев с высоким риском инфицирования показало, что для мужчин, имевших половые контакты с мужчинами и получавших вакцину, риск заражения ВИЧ был связан с предсуществующим инфицированием их вирусом простого герпеса 2 типа [5]. В связи с необходимостью дальнейшего изучения возможных рисков для испытуемых прививки данной вакциной были прекращены (<http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2013/Pages/phambili.aspx>).

Проведенные через три года после остановки программы вакцинации исследования продемон-

стрировали отсутствие в дальнейшем различий в риске ВИЧ-инфицирования у обрезанных и необрезанных мужчин, а также у людей с предсуществующим иммунитетом к Ad5 и без него, однако в вакцинированной группе продолжали преобладать случаи ВИЧ-инфицирования по сравнению с группой плацебо [39]. Также в этом исследовании было продемонстрировано отсутствие эффекта от введения вакцины у женщин.

Для экспериментов с такого же типа аденовектором VRC-HIVADV014-00-VP (NIAD в сотрудничестве с HIV Vaccine Trials Network) при проведении фазы 2 клинических испытаний прививки также были приостановлены [26]. Вакцина VRC-HIVADV014-00-VP была создана на основе рекомбинантных Ad5, несущих гены ВИЧ-1 Gag/Pol полипротеин из клада В и ВИЧ-1 Env гликопротеин из клада А, В и С, репликативно-дефектных. Соотношение векторов в вакцине 3:1:1:1. На ранних этапах клинических испытаний было показано, что вакцина не дает значительных побочных эффектов, большая реактогенность на ее введение наблюдается при более высокой дозе (10^{11} ОЕ). При этом единичная инъекция вакцины вызывала образование как гуморального, так и клеточного ($CD4^+$, $CD8^+$) иммунного ответа, у добровольцев без предсуществующего иммунного ответа к Ad5 он был несколько выше [15]. На следующих этапах данная вакцина исследовалась при использовании в прайм-буст схемах с ДНК-вакциной, где была продемонстрирована хорошая переносимость и безопасность данной комбинации. Согласно полученным данным, при использовании прайм-буст режима вакцинации иммунный ответ был выше на порядок, вакцина вызывала как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ, причем клеточный иммунный ответ был долгосрочным — на протяжении более 6 месяцев [23, 33, 44]. Использование в схемах вакцинации различных вариантов ДНК-вакцин в комбинации с аденовирусным вектором приводило как к выработке Т-клеточного иммунного ответа у 60-80% испытуемых [20, 31], так и к низкому уровню клеточного иммунного ответа [32]. При этом у добровольцев с предсуществующим иммунным ответом к Ad5 Т-клеточный иммунный ответ на введение вакцины был менее выражен [16], а, согласно другому исследованию, уровень предсуществующего иммунитета к Ad5 не влиял на реактогенность вакцины и иммунный ответ на антигены ВИЧ [29]. При исследовании вакцины на ВИЧ-инфицированных добровольцах с одновременным применением антиретровирусной терапии было показано улучшение масштабности, широты и полифункциональности Т-клеточного иммунного ответа [14]. Тем не менее, при проведении испытаний вакцины на добровольцах с высоким риском заражения положительные результаты получены не были,

по сравнению с плацебо вакцина не оказывала профилактического эффекта, при этом были получены данные о более частом заражении ВИЧ мужчин, получавших вакцину и имеющих предсуществующий иммунитет к Ad5, в связи с чем в апреле 2013 года комиссия по безопасности рекомендовала прекратить проведение прививок [26]. Однако после того, как данный вектор был иначе структурирован, заявлены еще два клинических испытания с его использованием, но эксперименты продолжаются и результаты исследований не представлены.

В 2009 году было представлено клиническое исследование, в котором для вакцинации против ВИЧ предлагалось использовать схему гетерологичной прайм-буст вакцинации вектором на основе Ad5 и вектором на основе модифицированного вируса осповакцины (NYVAC-B — New York Vaccinia vector). Использование векторов разного типа снимает проблему выработки вирус-нейтрализующих антител при повторной вакцинации и ослаблении иммунного ответа на целевые антигены, а многообещающие результаты использования поксвирусных векторов в клинических испытаниях вакцин против ВИЧ делают подобную стратегию весьма оправданной [10, 38]. Согласно полученным в результате испытаний данным, введение вакцин вызывало выработку как гуморального, так и клеточного иммунного ответа, более выраженный иммунный ответ на введение вакцин наблюдался в группах, где аденовектор использовался в качестве прайм-вакцины [11]. При этом использование высоких доз аденовирусного вектора (1×10^{10} БОЕ) вызывало более значительную выработку нейтрализующих антител. Гуморальный иммунный ответ на антигены ВИЧ детектировался в течение длительного времени — более 6 месяцев. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о перспективности подобных схем вакцинации.

Еще в одном заявленном клиническом испытании предлагается использовать в качестве вакцины химерный аденовирусный вектор, в котором Ad5 содержит вставку гипервариабельной области гексона аденовируса 48 серотипа (Ad5HVR48.EnvA.01). По результатам клинических испытаний, данная вакцина безопасна, хорошо переносится и иммуногенна во всех исследуемых дозах, иммунный ответ сохранялся до 52 недели. На 28 неделе титр вируснейтрализующих антител к Ad48 был в 1,7 раза выше, чем к Ad5, что демонстрирует первоочередное образование аденовирус-нейтрализующих антител против гипервариабельных регионов гексонов [3].

В связи с определенными неудачами при испытаниях вакцин на основе Ad5 все большее внимание в области разработки вакцин против ВИЧ уделяется аденовекторам другого типа —

ТАБЛИЦА 1. ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ПРОТИВ ВИЧ

TABLE 1. VACCINES AGAINST HIV BASED ON ADENOVIRAL VECTORS

Тип аденовирусного вектора Type of adenoviral vectors	Вакцины и антигены Vaccines and antigens	Фаза клинических испытаний Clinical trial phase
Аденовирус человека 5 серотипа Human adenovirus serotype 5	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef, Merck Sharp & Dohme Corp. Антигены gag/pol/nef клад В gag/pol/nef clade B antigens	Фаза 2 Phase 2
	VRC-HIVADV014-00-VP, NIAD в сотрудничестве с HIV Vaccine Trials Network Соотношение векторов в вакцине 3:1:1:1, антигены gag/ pol клад В и Env клад А, В и С VRC-HIVADV014-00-VP, NIAD in cooperation with HIV Vaccine Trials Network. Ratio of the vectors in vaccine was 3:1:1:1, antigens gag/pol, clade B and Env, clades A, B,C	Фаза 2 Phase 2
	Совместно с поксвирусом, Ad5 и NYVAC, HIV Vaccine Trials Network. Ad5 содержит антигены gag/ pol клад В и gp140 клад А, В и С. NYVAC содержит антигены gag/pol/nef и gp120 клад В Together with poxvirus, Ad5 and NYVAC, HIV Vaccine Trials Network. Ad5 contains gag/pol, clade B and gp140, clades A,B,C antigens. NYVAC contains gag/pol/nef and gp120 clade B antigens	Фаза 1 Phase 1
Химерный аденовирус человека 5 серотипа Chimeric human adenovirus serotype 5	Ad5HVR48.EnvA.01, NIAID Содержит вставку гипервариабельной области гексона Ad48 и антиген Env клад А ВИЧ-1 Ad5 contains hypervariable regions of Ad serotype 48 hexon, and Env antigen, clade A HIV-1	Фаза 1 Phase 1
Аденовирус человека 26 серотипа Human adenovirus serotype 26	Ad26.ENVA.01, Crucell Holland BV. Содержит антиген Env клад А ВИЧ-1 Ad26 contains antigen Env, clade A HIV-1	Фаза 1 Phase 1
	Совместно с поксвирусом, Ad26.ENVA.01 и MVA Mosaic, Crucell Holland BV. Ad26 содержит антиген Env клад А ВИЧ-1, поксвирус содержит две мозаичные вставки антигенов Together with poxvirus, Ad26.ENVA.01 and MVA Mosaic, Crucell Holland BV. Ad26 contains antigen Env, clade A HIV-1, poxvirus contains two mosaic HIV inserts	Фаза 1 Phase 1

Дозы и методы введения Doses and methods of administration	Параметры отбора добровольцев Selection criteria for the volunteers	Результаты Results
$1,5 \times 10^{10}$ вч внутримышечно $1,5 \times 10^{10}$ vp intramuscularly	Здоровые добровольцы, добровольцы с высоким риском заражения ВИЧ и ВИЧ-инфицированные Healthy volunteers, volunteers at a high risk for infection and HIV-infected persons	Проведение прививок прекращено досрочно, вакцина неэффективна, риск заражения после вакцинации увеличивался [19, 21, 24, 34, 39] Vaccination has been terminated before time, the vaccine was not effective, infection risk increased after vaccination [19, 21, 24, 34, 39]
Как отдельно, так и в прайм-буст схемах с ДНК-вакциной. 10^{10}-10^{11} ОЕ, внутримышечно Individually and in prime-boost schedules with DNA-vaccine. 10^{10} to 10^{11} OU intramuscularly	Здоровые добровольцы, с высоким риском заражения и ВИЧ-инфицированные добровольцы, получающие антиретровирусную терапию Healthy volunteers, volunteers at a high infection risk and HIV-infected volunteers receiving antiretroviral therapy	Проведение прививок прекращено. Прайм-буст вакцинация вызывала образование более высокого и более длительного как гуморального, так и клеточного иммунного ответа [23, 33, 44]. У добровольцев с повышенным риском заражения не давала профилактического эффекта [26] Vaccination has been terminated before time. Prime-boost vaccination has caused formation of higher and longer humoral and cellular immune response [23, 33, 44]. In high-infection risk volunteers, no preventive effect was achieved [26]
Прайм-буст схема. $1 \times 10^8 - 1 \times 10^{10}$ вч, внутримышечно Prime-boost scheme, 1×10^8 to 1×10^{10} vp intramuscularly	Без предсуществующего иммунитета к Ad5 Without pre-existing immunity to Ad5	Иммунный ответ был значительнее при использовании Ad5 в качестве прайм-вакцины. С увеличением дозы Ad5 увеличивалось его связывание и образование вируснейтрализующих антител [11] The immune response was higher when using Ad5 as a prime vaccine. Higher Ad5 priming doses significantly increased binding and production of virus-neutralizing antibodies [11]
$1 \times 10^9 - 1 \times 10^{11}$ вч, внутримышечно 1×10^9 to 1×10^{11} vp intramuscularly	Без предсуществующего иммунитета к Ad5 или Ad48 Without pre-existing immunity to Ad5 and Ad48	Вакцина безопасна, хорошо переносится, иммуногенна. Иммунный ответ на вакцину детектировался на протяжении 52 недель. Титр вируснейтрализующих антител выше к Ad48, чем к Ad5 [3] The vaccine is safe, well tolerated, immunogenic. Immune response to the vaccine was detected for 52 weeks. The titers of neutralizing antibodies to Ad48 are higher than to Ad5 [3]
5×10^{10} вч, внутримышечно 5×10^{10} vp intramuscularly	Здоровые добровольцы с предсуществующим иммунитетом к Ad26 и без него Healthy volunteers with/without pre-existing immunity to Ad26	Вакцина безопасна, хорошо переносится. Вызывает длительный иммунный ответ (до 52 недель), как гуморальный, так и клеточный. Предсуществующий иммунный ответ не влияет на иммуногенность вакцины [2, 4, 7] The vaccine is safe, well tolerated. Induces prolonged immune response (up to 52 weeks), both humoral and cellular. Pre-existing immune response does not affect immunogenicity of the vaccine [2, 4, 7]
Прайм-буст схема, 5×10^{10} вч Ad26 и 1×10^8 БОЕ осповакцины, внутримышечно Prime-boost scheme, 5×10^{10} vp Ad26 and 1×10^8 PFU MVA Mosaic intramuscularly	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Не опубликованы Not published

Тип аденовирусного вектора Type of adenoviral vectors	Вакцины и антигены Vaccines and antigens	Фаза клинических испытаний Clinical trial phase
Аденовирус человека 26 серотипа Human adenovirus serotype 26	Ad26.Mos.HIV с белком gp140 ВИЧ-1 клад С и добавлением адъюванта фосфата алюминия, Crucell Holland BV. Смесь аденовирусных векторов, один со вставкой антигена Env и два со вставками gag/ pol Ad26.Mos.HIV with glycoprotein 140 HIV-1 clade C and adjuvant aluminum phosphate, Crucell Holland BV. Mix of adenoviral vectors, one with the insert Env sequence and two vectors with inserts gag/pol sequence	Фаза 1 Phase 1
	Совместно с поксвирусом и белком gp140 ВИЧ-1 клад С, Ad26.Mos.HIV и MVA Mosaic, Crucell Holland BV. Содержат антигены Env и gag/ pol Together with poxvirus and glycoprotein 140 HIV-1, clade C, Ad26.Mos.HIV and MVA Mosaic, Crucell Holland BV. Viral vectors contain antigens Env and gag/pol	Фаза 2 Phase 2
	rcAd26.MOS1.HIV-Env, International AIDS Vaccine Initiative. Содержит мозаичные антигены ВИЧ и антиген Env Ad26 contains mosaic HIV antigens and Env	Фаза 1 Phase 1
Аденовирус человека 26 серотипа и 35 серотипа Human adenovirus serotype 26 and serotype 35	Ad26.ENVA.01 и Ad35-ENV, International AIDS Vaccine Initiative. Оба вектора содержат антиген Env клад А ВИЧ-1 Ad26.ENVA.01 and Ad35-ENV, International AIDS Vaccine Initiative. Both vectors contain Env, clade A HIV-1 antigen	Фаза 1 Phase 1
Аденовирус человека 5 серотипа и 35 серотипа Human adenovirus serotype 5 and serotype 35	VRC-HIVADV027-00-VP (rAd35-EnvA) и VRC-HIVADV038-00-VP (rAd5-EnvA), NIAD. Содержат антигены Env клад А VRC-HIVADV027-00-VP (rAd35-EnvA) and VRC-HIVADV038-00-VP (rAd5-EnvA), NIAD. Both vectors contain Env, clade A HIV-1 antigen	Фаза 1 Phase 1
Аденовирус человека 35 серотипа Human adenovirus serotype 35	Ad35-GRIN совместно с адъювантной вакциной, International AIDS Vaccine Initiative. Адъювантная вакцина – фьюжн-белок F4, содержащий антигены p24, RT, Nef, p17 клад В с адъювантной системой AS01 GSK. Ad35-GRIN – модифицированные антигены Gag/RT/Int/Nef клад А Ad35-GRIN together with adjuvant vaccine, International AIDS Vaccine Initiative. Adjuvant vaccine is fusion protein F4, containing p24, RT, Nef, p17, clade B antigens with AS01 GSK adjuvant system. Ad35-GRIN contains modified Gag/RT/Int/Nef antigens, clade A	Фаза 1 Phase 1

Таблица 1 (продолжение)

Дозы и методы введения Doses and methods of administration	Параметры отбора добровольцев Selection criteria for the volunteers	Результаты Results
5 × 10¹⁰ вч, 250 мкг белка, внутримышечно 5 × 10 ¹⁰ vp Ad26, 250 µg of protein intramuscularly	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Не опубликованы Not published
5 × 10¹⁰ вч для Ad26, 10⁸ БОЕ для поксвируса, 50-250 мкг белка, внутримышечно 5 × 10 ¹⁰ vp Ad26, 10 ⁸ PFU MVA Mosaic, 50-250 µg of protein intramuscularly	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Не опубликованы Not published
1 × 10⁸ – 1 × 10¹¹ вч, в капсулах, перорально 1 × 10 ⁸ to 1 × 10 ¹¹ vp, in capsules <i>per os</i>	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Не опубликованы Not published
Прайм-буст схемы, 5 × 10¹⁰ вч для Ad26 и Ad35 Prime-boost schemes, 5 × 10 ¹⁰ vp Ad26 and Ad35 intramuscularly	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Не опубликованы Not published
Прайм-буст схемы как совместно, так и отдельно в комбинации с ДНК-вакциной. 1 × 10¹⁰ БОЕ для Ad35, 4 мг для Ad5 и ДНК-вакцины Prime-boost schedules, together and separately with DNA-vaccine. 1 × 10 ¹⁰ PFU Ad35, 4 mg Ad5 and DNA	Отдельные группы с предсуществующим иммунитетом к Ad5 и без него Separate group of volunteers with/without pre-existing immunity to Ad5	Не опубликованы Not published
Прайм-буст схемы или совместно, для Ad35 2 × 10¹⁰ вч, для адъювантной вакцины 4 мкг, внутримышечно Prime-boost schemes or together, 2 × 10 ¹⁰ vp Ad35, 4 µg adjuvant vaccine, intramuscularly	Без предсуществующего иммунитета к Ad35 Without pre-existing immunity to Ad35	Образование как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Иммунный ответ детектировался в течение года после вакцинации, более значительным он был в группе с Ad35 в качестве прайм-вакцины и при одновременном введении вакцин. Независимо от режима вакцинации наблюдалось ингибирование аденовируса [43] Induction of both humoral and cellular immune response was observed. Immune response was detectable over 1 year after vaccination, the response rate was higher when Ad35 was the priming vaccine and in the co-administration groups. Independently of vaccination method, inhibition of adenovirus was observed [43]

Тип аденовирусного вектора Type of adenoviral vectors	Вакцины и антигены Vaccines and antigens	Фаза клинических испытаний Clinical trial phase
Аденовирус человека 35 серотипа Human adenovirus serotype 35	Ad35-GRIN/ENV совместно с ДНК-вакциной HIV-MAG с/без адъювантом GENEVAX® IL-12, International AIDS Vaccine Initiative. Ad35-GRIN/ENV содержит два вектора с антигенами Gag/RT/Int/Nef клад А и антигеном Env клад А (gp140). HIV-MAG содержит две плазмиды с антигенами Gag/Pol клад В и Nef/Tat/Vif клад В и Env клад В (gp160) Ad35-GRIN/ENV together with DNA-vaccine HIV-MAG with/without adjuvant GENEVAX® IL-12, International AIDS Vaccine Initiative. Ad35-GRIN/ENV contains two vectors with Gag/RT/Int/Nef clade A antigens and Env clade A (gp140) antigen. HIV-MAG contains two plasmid with Gag/Pol clade B and Nef/Tat/Vif, clade B and Env, clade B (gp160) antigens	Фаза 1 Phase 1
Аденовирус человека 4 серотипа Human adenovirus serotype 4	Ad4-mgag и Ad4-EnvC150, NIAID и PaxVax, Inc. Живые, репликативно-компетентные вакцины, содержащие антигены Gag и Env клад С, в качестве буст-вакцины белок gp120 ВИЧ Ad4-mgag and Ad4-EnvC150, NIAID and PaxVax, Inc. Live, replication-competent vaccines, containing Gag and Env, clade C antigens; bivalent HIV gp120 glycoprotein as a booster vaccine	Фаза 1 Phase 1
Аденовирус шимпанзе 63 серотипа Chimpanzee adenovirus serotype 63	Совместно с поксвирусом и ДНК-вакциной. ChAdV63.HIVconsv, MVA.HIVconsv, pSG2.HIVconsv, University of Oxford. Содержат уникальный Т-клеточный иммуноген HIVconsv Together with poxvirus and DNA-vaccine. ChAdV63. HIVconsv, MVA.HIVconsv, pSG2.HIVconsv, University of Oxford, contain unique T-cell HIVconsv immunogen	Фаза 1 Phase 1
	Совместно с поксвирусом. ChAdV63.HIVconsv, MVA.HIVconsv, IrsiCaixa Together with poxvirus. ChAdV63.HIVconsv, MVA.HIVconsv, IrsiCaixa	Фаза 1 Phase 1

например, на основе Ad26 и Ad35, что находит отражение в заявленных клинических испытаниях вакцин. Использование этих аденовирусов основано на данных, показывающих их существенное биологическое отличие от Ad5. Так, векторы на основе Ad26 показали лучшую защитную эффективность у макаков-резусов, не вызывая увеличения уровня вектор-специфических CD4⁺T-клеток на поверхности слизистых оболочек в организме человека после вакцинации, при этом распространенность Ad26 в человеческой популяции умеренная, а титр предсуществующих антител ниже [8]. Кроме этого, основываясь на последних научных данных, векторы могут быть сконструированы так, чтобы пред-

ставлять различные или улучшенные варианты ВИЧ-антигенов, а также использовать более мощные гетерологичные схемы прайм-буст режимов вакцинации. Вакцина Ad26.ENVA.01, производства Crucell Holland BV, представляет собой репликативно-дефектный вирусный вектор на основе Ad26, содержащий ген Env клад А ВИЧ-1, кодирующий модифицированную оболочку белка gp140. Вакцинация добровольцев показала безопасность и хорошую переносимость данной вакцины, незначительная реактогенность наблюдалась при первоначальной иммунизации в высокой дозе (10¹¹ вч). Вакцина индуцировала ВИЧ-специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ после единичной

Таблица 1 (окончание)

Дозы и методы введения Doses and methods of administration	Параметры отбора добровольцев Selection criteria for the volunteers	Результаты Results
Прайм-буст схемы, для Ad35 2×10^{10} вч, внутримышечно. Для ДНК-вакцины 3 мкг, IL 100-1000 мкг, внутримышечно с помощью электропорации Prime-boost schemes, 2×10^{10} vp Ad35 intramuscularly. 3 µg DNA-vaccine, 100-1000 µg IL intramuscularly by <i>in vivo</i> electroporation	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Вакцина безопасна, умеренно иммуногенна. Клеточный и гуморальный иммунный ответ на вакцину не зависел от введения интерлейкина. Специфические антитела к ВИЧ обнаруживались только после введения буст-вакцины на основе Ad35 [40] The vaccine is safe and moderately immunogenic. Cellular and humoral immune response to the vaccine did not depend on interleukin injections. Specific antibodies to HIV were detected only after administration of Ad35-based boost vaccine [40]
В виде капсул перорально и в виде спрея интраназально, дозы не приводятся In peroral capsules and intranasal spray, doses not specified	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Не опубликованы Not published
Прайм-буст схемы, для аденовектора доза 5×10^{10} вч, для поксвектора 4×10^8 БОЕ, для ДНК-вакцины 4 мг, внутримышечно Prime-boost schedules, 5×10^{10} vp ChAd, 4×10^8 PFU MVA, 4 mg DNA-vaccine intramuscularly	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Вакцины безопасны и иммуногены, вызывают образование значительного Т-клеточного иммунного ответа. Вакцинация вызывает увеличение уровня вируснейтрализующих антител к аденовектору [27] Vaccines are safe and immunogenic, causing production of significant T-cell immune response. Vaccination causes increased levels of virus-neutralizing antibodies against adenovector [27]
Прайм-буст схема, для аденовектора доза 5×10^{10} вч, для поксвектора 2×10^8 БОЕ, внутримышечно Prime-boost scheme, 5×10^{10} vp for ChAd, 2×10^8 PFU for MVA intramuscularly	Больные ВИЧ на фоне антиретровирусной терапии HIV-infected volunteers, receiving antiretroviral therapy	Не опубликованы Not published

вакцинации даже в группе с самой низкой дозой (10^9 вч), который сохранялся на протяжении 1 года, Т-клеточный иммунный ответ не зависел от вводимой дозы вакцины или числа прививок [2]. Гуморальный иммунный ответ был выше при 3-кратном режиме вакцинации, и это отличие от 2-кратного режима введения вакцины также наблюдалось в течение года. При этом у всех получивших вакцину добровольцев, а в исследовании набирали серонегативных по отношению к Ad26 людей, наблюдались Ad26-специфические клеточные иммунные реакции, которые не оказывали влияние на иммуногенность вакцины [7]. На следующем этапе исследований вакцина вводилась внутримышечно не только серонегатив-

ным добровольцам, но и людям с предсуществующим иммунитетом к Ad26. В результате было продемонстрировано, что единичная внутримышечная инъекция вакцины вызывает как системный, так и мукозальный иммунный ответ. Иммунный ответ у людей с предсуществующим иммунитетом к Ad26 был сравним с иммунным ответом у серонегативных добровольцев, увеличения общего количества или вектор-специфических CD4⁺Т-лимфоцитов после вакцинации не наблюдалось [4]. Затем для клинических испытаний было предложено исследование, в котором вектор на основе Ad26 исследуется в схемах гомологичной и гетерологичной совместно с аналогичным вектором на основе Ad35 прайм-

буст вакцинации с разными режимами введения вакцины (NCT01215149). Результаты данного исследования не представлены. В 2014 году Stucell было заявлено новое исследование — в нем вектор на основе Ad26 используется в прайм-буст схеме вакцинации совместно с модифицированным вирусом осповакцины Анкара (Modified Vaccinia Ankara [MVA]). Такая комбинация вирусных векторов показала многообещающие результаты в экспериментах с обезьянами [8], поэтому теперь предлагается изучить безопасность и иммуногенность подобной вакцины на добровольцах. В декабре 2014 года заявлено еще одно исследование подобной вакцины — в нем планируется изучить безопасность и иммуногенность различных комбинаций вакцины Ad26.Mos.HIV, содержащей три репликативно-дефектных вектора на основе Ad26 со вставками Env, Gag и Pol-генов, и MVA-Mosaic, представляющей собой модифицированный вирус осповакцины Анкара также со вставками генов Env, Gag и Pol, совместно с белком gp140 ВИЧ-1 клад С и адъювантом фосфатом алюминия. В заявленном в 2016 году отдельном эксперименте будет изучена безопасность и эффективность различных режимов вакцинации только Ad26.Mos.HIV в сочетании с белком gp140 ВИЧ-1 клад С и добавлением адъюванта фосфата алюминия. И, наконец, в феврале 2015 года заявлены клинические испытания вакцины гсAd26.MOS1.HIV-Env в форме оральных капсул на основе репликативно-компетентного Ad26, несущего различные антигены ВИЧ.

Еще одним многообещающим направлением в вакцинации против ВИЧ является использование в качестве вектора для доставки антигенов Ad35. Ad35 отличается от Ad5 своим тропизмом, предсуществующий иммунитет к Ad5 не оказывает на него влияния, а предсуществующий иммунитет к нему у человеческой популяции незначительный [50]. Для репликативно-дефектных векторов на основе Ad35 продемонстрировано отсутствие серьезных побочных эффектов при вакцинации добровольцев, у большинства вырабатывался гуморальный и клеточный иммунный ответ после введения вакцины, при этом Т-клеточный иммунный ответ был широким и полифункциональным, а титр анти-Ad35-нейтрализующих антител оставался низким и после второй вакцинации [30]. В настоящее время вакцина, состоящая из двух аденовекторов — VRC-HIVADV027-00-VP (или гAd35-EnvA) и VRC-HIVADV038-00-VP (или гAd5-EnvA) — исследуется на безопасность, реактогенность и иммуногенность у добровольцев с предсуществующим иммунитетом к Ad5 и Ad35 и без предсуществующего иммунитета. Изучаются разные дозы и схемы комбинации компонентов вакцины между собой, а также в сочетании с ДНК-вакцинацией для получения продолжительного гуморального и клеточного

иммунного ответа. Результаты экспериментов не представлены. Еще одно заявленное исследование на добровольцах без предсуществующего иммунитета к Ad35 — комбинация адъювантной вакцины, состоящей из основных белков ВИЧ, и вакцины на основе репликативно-дефектного Ad35 (Ad35-GRIN). Согласно полученным результатам, адъювантная вакцина индуцировала преимущественно CD4⁺Т-клеточный иммунный ответ, а вакцинация аденовектором — CD8⁺Т-клеточный ответ, значительный гуморальный иммунный ответ детектировался на белки ВИЧ, входящие в состав адъювантной вакцины [43]. При этом использование режима совместного введения вакцин приводило к взаимному дополнению друг друга иммунными профилями. Иммунный ответ был выше в группе с использованием аденовируса в качестве прайм-вакцины и в группе с совместным введением вакцин. Иммунный ответ на введение вакцин детектировался в течение длительного времени после вакцинации, во всех группах наблюдалось ингибирование вирусной активности. В дальнейшем планируется изучение этой же вакцины на добровольцах с предсуществующим иммунитетом к Ad35. Также для данного типа вакцин было заявлено исследование, в котором вакцина на основе Ad35 (Ad35-GRIN/ENV) исследуется в схемах прайм-буст вакцинации совместно с ДНК-вакциной с использованием или без использования в качестве адъюванта интерлейкина 12 (GENEVAX® IL-12). Стоит отметить, что ДНК-вакцину и адъювант вводят внутримышечно с использованием метода электропорации, а аденовектор — инъекцией с помощью шприца. Согласно полученным результатам, вакцина безопасна и умеренно иммуногенна. Клеточный и гуморальный иммунный ответ на введение вакцины не зависел от наличия или отсутствия адъюванта IL-12. При этом специфические антитела к ВИЧ обнаруживались только после введения буст-вакцины на основе Ad35 [40].

В 2013 году National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID, USA) и PaxVax Inc. было заявлено клиническое испытание вакцины против ВИЧ на основе репликативно-компетентного Ad4 (NCT01989533). Ad4 особенно распространен среди взрослого населения и часто является причиной ОРЗ у военнослужащих-новобранцев, в связи с чем он хорошо изучен, а вакцины на его основе безопасны [9, 37]. Стоит отметить, что в настоящее время все призывники в США получают прививку с использованием живых, репликативно-компетентных Ad4 и Ad7. Использование данных вакцин предполагается перорально в виде кишечнорастворимых капсул либо интраназально в виде спрея, затем в качестве буст-вакцины будут использованы белки вируса иммунодефицита. Данные схемы хорошо

зарекомендовали себя в доклинических и клинических испытаниях векторов на основе живых Ad4, Ad5 и Ad7 против различных инфекционных заболеваний [1, 25, 36, 52]. Особое внимание планируется уделить возможной контагиозности вакцины на основе живого аденовируса для окружения добровольцев. В настоящее время идет набор добровольцев для исследования.

Также многообещающими аденовирусными векторами для вакцинации против ВИЧ являются аденовирусы обезьян. Среди заявленных клинических испытаний — одно с использованием вакцин трех типов: на основе ChAd63, вируса осповакцины и ДНК-вакцины в прайм-буст схемах у здоровых добровольцев. Результаты исследования показали, что все вакцины и схемы иммунизации демонстрируют безопасность для добровольцев и иммуногенность [27]. Другое заявленное клиническое испытание — на фоне антиретровирусной терапии у ВИЧ-

инфицированных добровольцев проводится вакцинация вектором на основе ChAd63 в качестве прайм-вакцины и вектором на основе вируса осповакцины в качестве буст-компонента (NCT01712425). Данное исследование не завершено, результаты его не представлены.

Заключение

В первой части обзора мы коснулись общих вопросов использования аденовирусных векторов в качестве вакцин, а также рассмотрели участвующие в зарубежных клинических испытаниях вакцины на основе аденовирусных векторов против ВИЧ.

Во второй части обзора будут приведены сведения о вакцинах на основе аденовирусных векторов против таких патогенов, как вирус гриппа, вирус Эбола, малярия, гепатит и др., участвующих в клинических испытаниях.

Список литературы / References

1. Alexander J., Mendy J., Vang L., Avanzini J.B., Garduno F., Manayani D.J., Ishioka G., Farness P., Ping L., Swannstrom R., Parks R., Liao H., Haynes B.F., Montefiori D.C., LaBranche C., Smith J., Gurwith M., Mayall T. Pre-clinical development of a recombinant, replication-competent adenovirus serotype 4 vector vaccine expressing HIV-1 envelope 1086 clade C. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 12, e82380.
2. Baden L.R., Walsh S.R., Seaman M.S., Tucker R.P., Krause K.H., Patel A., Johnson J.A., Kleinjan J., Yanosick K.E., Perry J., Zablosky E., Abbink P., Peter L., Iampietro M.J., Cheung A., Pau M.G., Weijtens M., Goudsmit J., Swann E., Wolff M., Loblein H., Dolin R., Barouch D.H. First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine (IPCAVD 001). *J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 207, no. 2, pp. 240-247.
3. Baden L.R., Walsh S.R., Seaman M.S., Johnson J.A., Tucker R.P., Kleinjan J.A., Gothing J.A., Engelson B.A., Carey B.R., Oza A., Bajimaya S., Peter L., Bleckwehl C., Abbink P., Pau M.G., Weijtens M., Kunchai M., Swann E.M., Wolff M., Dolin R., Barouch D.H. First-in-human evaluation of a hexon chimeric adenovirus vector expressing HIV-1 Env (IPCAVD 002). *J. Infect. Dis.*, 2014, Vol. 210, no. 7, pp. 1052-1061.
4. Baden L.R., Liu J., Li H., Johnson J.A., Walsh S.R., Kleinjan J.A., Engelson B.A., Peter L., Abbink P., Milner D.A., Golden K.L., Viani K.L., Stachler M.D., Chen B.J., Pau M.G., Weijtens M., Carey B.R., Miller C.A., Swann E.M., Wolff M., Loblein H., Seaman M.S., Dolin R., Barouch D.H. Induction of HIV-1-specific mucosal immune responses following intramuscular recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 vaccination of humans. *J. Infect. Dis.*, 2015, Vol. 211, no. 4, pp. 518-528.
5. Barnabas R.V., Wasserheit J.N., Huang Y., Janes H., Morrow R., Fuchs J., Mark K.E., Casapia M., Mehrotra D.V., Buchbinder S.P., Corey L. Impact of herpes simplex virus type 2 on HIV-1 acquisition and progression in an HIV vaccine trial (the Step study). *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, 2011, Vol. 57, no. 3, pp. 238-244.
6. Barnes E., Folgori A., Capone S., Swadling L., Aston S., Kurioka A., Meyer J., Huddart R., Smith K., Townsend R., Brown A., Antrobus R., Ammendola V., Naddeo M., O'Hara G., Willberg C., Harrison A., Grazioli F., Esposito M.L., Siani L., Traboni C., Oo Y., Adams D., Hill A., Colloca S., Nicosia A., Cortese R., Klennerman P. Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Sci. Transl. Med.*, 2012, Vol. 4, no. 115, pp. 115ra1.
7. Barouch D.H., Liu J., Peter L., Abbink P., Iampietro M.J., Cheung A., Alter G., Chung A., Dugast A., Frahm N., McElrath M.J., Wenschuh H., Reimer U., Seaman M.S., Pau M.G., Weijtens M., Goudsmit J., Walsh S.R., Dolin R., Baden L.R. Characterization of humoral and cellular immune responses elicited by a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine in healthy adults (IPCAVD 001). *J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 207, no. 2, pp. 248-256.
8. Barouch D.H., Picker L.J. Novel vaccine vectors for HIV-1. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2014, Vol. 12, no. 11, pp. 765-771.
9. Barraza E.M., Ludwig S.L., Gaydos J.C., Brundage J.F. Reemergence of adenovirus type 4 acute respiratory disease in military trainees: report of an outbreak during a lapse in vaccination. *J. Infect. Dis.*, 1999, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2014, Vol. 179, no. 6, pp. 1531-1533.
10. Bart P.A., Goodall R., Barber T., Harari A., Guimaraes-Walker A., Khonkarly M., Sheppard N.C., Bangala Y., Frachette M.J., Wagner R., Liljestrom P., Kraehenbuhl J.P., Girard M., Goudsmit J., Esteban M., Heeney J., Sattentau Q., McCormack S., Babiker A., Pantaleo G., Weber J. EV01: a phase I trial in healthy HIV negative volunteers to evaluate a clade C HIV vaccine, NYVAC-C undertaken by the EuroVacc Consortium. *Vaccine*, 2008, Vol. 26, no. 25, pp. 3153-3161.

11. Bart P.A., Huang Y., Karuna S.T., Chappuis S., Gaillard J., Kochar N., Shen X., Allen M.A., Ding S., Hural J., Liao H.X., Haynes B.F., Graham B.S., Gilbert P.B., McElrath M.J., Montefiori D.C., Tomaras G.D., Pantaleo G., Frahm N. HIV-specific humoral responses benefit from stronger prime in phase Ib clinical trial. *J. Clin. Invest.*, 2014, Vol. 124, no. 11, pp. 4843-4856.
12. Bouri K., Feero W.G., Myerburg M.M., Wickham T.J., Kovesdi I., Hoffman E.P., Clemens P.R. Polylysine modification of adenoviral fiber protein enhances muscle cell transduction. *Hum. Gene Ther.*, 1999, Vol. 10, no. 10, pp. 1633-1640.
13. Bruna-Romero O., Gonzalez-Aseguinolaza G., Hafalla J.C., Tsuji M., Nussenzweig R.S. Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, Vol. 98, no. 20, pp. 11491-11496.
14. Casazza, J.P., Bowman K.A., Adzaku S., Smith E.C., Enama M.E., Bailer R.T., Price D.A., Gostick E., Gordon I.G., Ambrozak D.R., Nason M.C., Roederer M., Andrews C.A., Maldarelli F.M., Wiegand A., Kearney M.F., Persaud D., Ziemniak C., Gottardo R., Ledgerwood J.E., Graham B.S., Koup R.A. Therapeutic vaccination expands and improves the function of the HIV-specific memory T-cell repertoire. *J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 207, no. 12, pp. 1829-1840.
15. Catanzaro A.T., Koup R.A., Roederer M., Bailer R.T., Enama M.E., Moodie Z., Gu L., Martin J.E., Novik L., Chakrabarti B.K., Butman B.T., Gall J.G.D., King C.R., Andrews C.A., Sheets R., Gomez P.L., Mascola J.R., Nabel G.J., Graham B.S. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 candidate vaccine delivered by a replication-defective recombinant adenovirus vector. *J. Infect. Dis.*, 2006, Vol. 194, no. 12, pp. 1638-1649.
16. Churchyard G.J., Morgan C., Adams E., Hural J., Graham B.S., Moodie Z., Grove D., Gray G., Bekker L.-G., McElrath M.J., Tomaras G.D., Goepfert P., Kalam S., Baden L.R., Lally M., Dolin R., Blattner W., Kalichman A., Figueroa J.P., Pape J., Schechter M., Defawe O., De Rosa S.C., Montefiori D.C., Nabel G.J., Corey L., Keefer M.C. A phase IIA randomized clinical trial of a multiclade HIV-1 DNA prime followed by a multiclade rAd5 HIV-1 vaccine boost in healthy adults (HVTN204). *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 8, e21225.
17. Croyle M.A., Patel A., Tran K.N., Gray M., Zhang Y., Strong J.E., Feldmann H., Kobinger G.P. Nasal delivery of an adenovirus-based vaccine bypasses pre-existing immunity to the vaccine carrier and improves the immune response in mice. *PLoS One*, 2008, Vol. 3, no. 10, e3548.
18. Dudareva M., Andrews L., Gilbert S.C., Bejon P., Marsh K., Mwacharo J., Kai O., Nicosia A., Hill A.V. Prevalence of serum neutralizing antibodies against chimpanzee adenovirus 63 and human adenovirus 5 in Kenyan children, in the context of vaccine vector efficacy. *Vaccine*, 2009, Vol. 27, no. 27, pp. 3501-3504.
19. Duerr A., Huang Y., Buchbinder S., Coombs R.W., Sanchez J., del Rio C., Casapia M., Santiago S., Gilbert P., Corey L., Robertson M.N. Extended follow-up confirms early vaccine-enhanced risk of HIV acquisition and demonstrates waning effect over time among participants in a randomized trial of recombinant adenovirus HIV vaccine (Step Study). *J. Infect. Dis.*, 2012, Vol. 206, no. 2, pp. 258-266.
20. Enama M.E., Ledgerwood J.E., Novik L., Nason M.C., Gordon I.J., Holman L., Bailer R.T., Roederer M., Koup R.A., Mascola J.R., Nabel G.J., Graham B.S. Phase I randomized clinical trial of VRC DNA and rAd5 HIV-1 vaccine delivery by intramuscular (i.m.), subcutaneous (s.c.) and intradermal (i.d.) administration (VRC 011). *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 3, e91366.
21. Fitzgerald D.W., Janes H., Robertson M., Coombs R., Frank I., Gilbert P., Loufty M., Mehrotra D., Duerr A. An Ad5-vectored HIV-1 vaccine elicits cell-mediated immunity but does not affect disease progression in HIV-1-infected male subjects: results from a randomized placebo-controlled trial (the Step study). *J. Infect. Dis.*, 2011, Vol. 203, no. 6, pp. 765-772.
22. Fontana L., Nuzzo M., Urbanelli L., Monaci P. General strategy for broadening adenovirus tropism. *J. Virol.*, 2003, Vol. 77, no. 20, pp. 11094-11104.
23. Graham B.S., Enama M.E., Nason M.C., Gordon I.J., Peel S.A., Ledgerwood J.E., Plummer S.A., Mascola J.R., Bailer R.T., Roederer M., Koup R.A., Nabel G.J. DNA vaccine delivered by a needle-free injection device improves potency of priming for antibody and CD8⁺ T-cell responses after rAd5 boost in a randomized clinical trial. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 4, e59340.
24. Gray G.E., Moodie Z., Metch B., Gilbert P.B., Bekker L.G., Churchyard G., Nchabeleng M., Mlisana K., Laher F., Roux S., Mngadi K., Innes C., Mathebula M., Allen M., McElrath M.J., Robertson M., Kublin J., Corey L. Recombinant adenovirus type 5 HIV gag/pol/nef vaccine in South Africa: unblinded, long-term follow-up of the phase 2b HVTN 503/Phambili study. *Lancet Infect. Dis.*, 2014, Vol. 14, no. 5, pp. 388-396.
25. Gurwith M., Lock M., Taylor E.M., Ishioka G., Alexander J., Mayall T., Ervin J.E., Greenberg R.N., Strout C., Treanor J.J., Webby R., Wright P.F. Safety and immunogenicity of an oral, replicating adenovirus serotype 4 vector vaccine for H5N1 influenza: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 study. *Lancet Infect. Dis.*, 2013, Vol. 13, no. 3, pp. 238-250.
26. Hammer S.M., Sobieszczyk M.E., Janes H., Karuna S.T., Mulligan M.J., Grove D., Koblin B.A., Buchbinder S.P., Keefer M.C., Tomaras G.D., Frahm N., Hural J., Anude C., Graham B.S., Enama M.E., Adams E., DeJesus E., Novak R.M., Frank I., Bentley C., Ramirez S., Fu R., Koup R.A., Mascola J.R., Nabel G.J., Montefiori D.C., Kublin J., McElrath M.J., Corey L., Gilbert P.B. Efficacy trial of a DNA/rAd5 HIV-1 preventive vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 2013, Vol. 369, no. 22, pp. 2083-2092.
27. Hayton E.J., Rose A., Ibrahimsa U., Del Sorbo M., Capone S., Crook A., Black A.P., Dorrell L., Hanke T. Safety and tolerability of conserved region vaccines vectored by plasmid DNA, simian adenovirus and modified vaccinia virus ankara administered to human immunodeficiency virus type 1-uninfected adults in a randomized, single-blind phase I trial. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 7, e101591.

28. Hill A.V., Reyes-Sandoval A., O'Hara G., Ewer K., Lawrie A., Goodman A., Nicosia A., Folgori A., Colloca S., Cortese R., Gilbert S.C., Draper S.J. Prime-boost vectored malaria vaccines: progress and prospects. *Hum. Vaccin.*, 2010, Vol. 6, no. 1, pp. 78-83.
29. Jaoko W., Karita E., Kayitenkore K., Omosa-Manyonyi G., Allen S., Than S., Adams E.M., Graham B.S., Koup R.A., Bailer R.T., Smith C., Dally L., Farah B., Anzala O., Muvunyi C.M., Bizimana J., Tarragona-Fiol T., Bergin P.J., Hayes P., Ho M., Loughran K., Komaroff W., Stevens G., Thomson H., Boaz M.J., Cox J.H., Schmidt C., Gilmour J., Nabel G.J., Fast P., Bwayo J. Safety and immunogenicity study of Multiclade HIV-1 adenoviral vector vaccine alone or as boost following a multiclade HIV-1 DNA vaccine in Africa. *PLoS One*, 2010, Vol. 5, no. 9, e12873.
30. Keefer M.C., Gilmour J., Hayes P., Gill D., Kopycinski J., Cheeseman H., Cashin-Cox M., Naarding M., Clark L., Fernandez N., Bunce C.A., Hay C.M., Welsh S., Komaroff W., Hachambwa L., Tarragona-Fiol T., Sayeed E., Zachariah D., Ackland J., Loughran K., Barin B., Cormier E., Cox J.H., Fast P., Excler J.L. A phase I double blind, placebo-controlled, randomized study of a multigenic HIV-1 adenovirus subtype 35 vector vaccine in healthy uninfected adults. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 8, e41936.
31. Kibuuka H., Kimutai R., Maboko L., Sawe F., Schunk M.S., Kroidl A., Shaffer D., Eller L.A., Kibaya R., Eller M.A., Schindler K.B., Schuetz A., Millard M., Kroll J., Dally L., Hoelscher M., Bailer R., Cox J.H., Marovich M., Birx D.L., Graham B.S., Michael N.L., de Souza M.S., Robb M.L. A phase 1/2 study of a multiclade HIV-1 DNA plasmid prime and recombinant adenovirus serotype 5 boost vaccine in HIV-Uninfected East Africans (RV 172). *J. Infect. Dis.*, 2010, Vol. 201, no. 4, pp. 600-607.
32. Koblin B.A., Casapia M., Morgan C., Qin L., Wang Z.M., Defawe O.D., Baden L., Goepfert P., Tomaras G.D., Montefiori D.C., McElrath M.J., Saavedra L., Lau C.Y., Graham B.S. Safety and immunogenicity of an HIV adenoviral vector boost after DNA plasmid vaccine prime by route of administration: a randomized clinical trial. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 9, pp. e24517.
33. Koup R.A., Roederer M., Lamoreaux L., Fischer J., Novik L., Nason M.C., Larkin B.D., Enama M.E., Ledgerwood J.E., Bailer R.T., Mascola J.R., Nabel G.J., Graham B.S. Priming immunization with DNA augments immunogenicity of recombinant adenoviral vectors for both HIV-1 specific antibody and T-cell responses. *PLoS One*, 2010, Vol. 5, no. 2, e9015.
34. Li J.Z., Heisey A., Ahmed H., Wang H., Zheng L., Carrington M., Wrinn T., Schooley R.T., Lederman M.M., Kuritzkes D.R. Relationship of HIV reservoir characteristics with immune status and viral rebound kinetics in an HIV therapeutic vaccine study. *AIDS*, 2014, Vol. 28, no. 18, pp. 2649-2657.
35. Liebowitz D., Lindbloom J.D., Brandl J.R., Garg S.J., Tucker S.N. High titre neutralising antibodies to influenza after oral tablet immunisation: a phase 1, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Infect. Dis.*, 2015, Vol. 15, no. 9, pp. 1041-1048.
36. Lubeck M.D., Davis A.R., Chengalvala M., Natuk R.J., Morin J.E., Molnar-Kimber K., Mason B.B., Bhat B.M., Mizutani S., Hung P.P. Immunogenicity and efficacy testing in chimpanzees of an oral hepatitis B vaccine based on live recombinant adenovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, Vol. 86, no. 17, pp. 6763-6767.
37. Lyons A., Longfield J., Kuschner R., Straight T., Binn L., Seriwatana J., Reitstetter R., Froh I.B., Craft D., McNabb K., Russell K., Metzgar D., Liss A., Sun X., Towle A., Sun W. A double-blind, placebo-controlled study of the safety and immunogenicity of live, oral type 4 and type 7 adenovirus vaccines in adults. *Vaccine*, 2008, Vol. 26, no. 23, pp. 2890-2898.
38. McCormack S., Stöhr W., Barber T., Bart P.A., Harari A., Moog C., Ciuffreda D., Cellerai C., Cowen M., Gamboni R., Burnet S., Legg K., Brodnicki E., Wolf H., Wagner R., Heeney J., Frachette M.J., Tartaglia J., Babiker A., Pantaleo G., Weber J. EV02: a Phase I trial to compare the safety and immunogenicity of HIV DNA-C prime-NYVAC-C boost to NYVAC-C alone. *Vaccine*, 2008, Vol. 26, no. 25, pp. 3162-3174.
39. Moodie Z., Metch B., Bekker L.G., Churchyard G., Nchabeleng M., Mlisana K., Laher F., Roux S., Mngadi K., Innes C., Mathebula M., Allen M., Bentley C., Gilbert P.B., Robertson M., Kublin J., Corey L., Gray G.E. Continued follow-up of phambili phase 2b randomized HIV-1 vaccine trial participants supports increased HIV-1 acquisition among vaccinated men. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 9, e0137666.
40. Mpendo J., Mutua G., Nyombayire J., Ingabire R., Nanvubya A., Anzala O., Karita E., Hayes P., Kopycinski J., Dally L., Hannaman D., Egan M.A., Eldridge J.H., Syvertsen K., Lehrman J., Rasmussen B., Gilmour J., Cox J.H., Fast P.E., Schmidt C. A Phase I double blind, placebo-controlled, randomized study of the safety and immunogenicity of electroporated HIV DNA with or without interleukin 12 in prime-boost combinations with an Ad35 HIV vaccine in healthy HIV-seronegative african adults. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 8, e0134287.
41. Nwanegbo E., Vardas E., Gao W., Whittle H., Sun H., Rowe D., Robbins P.D., Gambotto A. Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of the Gambia, South Africa and the United States. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2004, Vol. 11, no. 2, pp. 351-357.
42. O'Hara G.A., Duncan C.J., Ewer K.J., Collins K.A., Elias S.C., Halstead F.D., Goodman A.L., Edwards N.J., Reyes-Sandoval A., Bird P., Rowland R., Sheehy S.H., Poulton I.D., Hutchings C., Todryk S., Andrews L., Folgori A., Berrie E., Moyle S., Nicosia A., Colloca S., Cortese R., Siani L., Lawrie A.M., Gilbert S.C., Hill A.V. Clinical assessment of a recombinant simian adenovirus ChAd63: a potent new vaccine vector. *J. Infect. Dis.*, 2012, Vol. 205, no. 5, pp. 772-781.
43. Omosa-Manyonyi G., Mpendo J., Ruzagira E., Kilembe W., Chomba E., Roman F., Bourguignon P., Koutsoukos M., Collard A., Voss G., Laufer D., Stevens G., Hayes P., Clark L., Cormier E., Dally L., Barin B., Ackland J., Syvertsen K., Zachariah D., Anas K., Sayeed E., Lombardo A., Gilmour J., Cox J., Fast P., Priddy F. A Phase I double blind, placebo-controlled, randomized study of the safety and immunogenicity of an adjuvanted

HIV-1 Gag-Pol-Nef fusion protein and adenovirus 35 Gag-RT-Int-Nef vaccine in healthy HIV-uninfected african adults. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 5, e0125954.

44. Sarwar U.N., Novik L., Enama M.E., Plummer S.A., Koup R.A., Nason M.C., Bailer R.T., McDermott A.B., Roederer M., Mascola J.R., Ledgerwood J.E., Graham B.S. Homologous boosting with adenoviral serotype 5 HIV vaccine (rAd5) vector can boost antibody responses despite preexisting vector-specific immunity in a randomized phase I clinical trial. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 9, e106240.

45. Segerman A., Mei Y.F., Wadell G. Adenovirus types 11p and 35p show high binding efficiencies for committed hematopoietic cell lines and are infective to these cell lines. *J. Virol.*, 2000, Vol. 74, no. 3, pp. 1457-1460.

46. Sheehy S.H., Duncan C.J., Elias S.C., Biswas S., Collins K.A., O'Hara G.A., Halstead F.D., Ewer K.J., Mahungu T., Spencer A.J., Miura K., Poulton I.D., Dicks M.D., Edwards N.J., Berrie E., Moyle S., Colloca S., Cortese R., Gantlett K., Long C.A., Lawrie A.M., Gilbert S.C., Doherty T., Nicosia A., Hill A.V., Draper S.J. Phase Ia clinical evaluation of the safety and immunogenicity of the Plasmodium falciparum blood-stage antigen AMA1 in ChAd63 and MVA vaccine vectors. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 2, e31208.

47. Smaill F., Jeyanathan M., Smieja M., Medina M.F., Thanthrige-Don N., Zganiacz A., Yin C., Heriazon A., Damjanovic D., Puri L., Hamid J., Xie F., Foley R., Bramson J., Gauldie J., Xing Z. A human type 5 adenovirus-based tuberculosis vaccine induces robust T cell responses in humans despite preexisting anti-adenovirus immunity. *Sci. Trans. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 205, 205ra134.

48. Tamminga C., Sedegah M., Regis D., Chuang I., Epstein J.E., Spring M., Mendoza-Silveiras J., McGrath S., Maiolatesi S., Reyes S., Steinbeiss V., Fedders C., Smith K., House B., Ganeshan H., Lejano J., Abot E., Banania G.J., Sayo R., Farooq F., Belmonte M., Murphy J., Komisar J., Williams J., Shi M., Brambilla D., Manohar N., Richie N.O., Wood C., Limbach K., Patterson N.B., Bruder J.T., Doolan D.L., King C.R., Diggs C., Soisson L., Carucci D., Levine G., Dutta S., Hollingdale M.R., Ockenhouse C.F., Richie T.L. Adenovirus-5-vectored P. falciparum vaccine expressing CSP and AMA1. Part B: safety, immunogenicity and protective efficacy of the CSP component. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 10, e25868.

49. Tatsis N., Ertl H.C. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol. Ther.*, 2004, Vol. 10, no. 4, pp. 616-629.

50. Vogels R., Zuijdgheest D., van Rijnsoever R., Hartkoorn E., Damen I., de Béthune M.P., Kostense S., Penders G., Helmus N., Koudstaal W., Cecchini M., Wetterwald A., Sprangers M., Lemckert A., Ophorst O., Koel B., van Meerendonk M., Quax P., Panitti L., Grimbergen J., Bout A., Goudsmit J., Havenga M. Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. *J. Virol.*, 2003, Vol. 77, no. 15, pp. 8263-8271.

51. Wang M., Shu Y., Qu J.G., Wang J.W., Hong T. Improved expression of human rotavirus G1VP7 and G3VP7 antigens in the recombinant adenoviruses by codon optimization. *Zhonghua. Shi. Yan. He. Lin. Chuang. Bing. Du. Xue. Za. Zhi. (Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology)*, 2008, Vol. 22, no. 6, pp. 437-439.

52. Weaver E.A. Vaccines within vaccines: the use of adenovirus types 4 and 7 as influenza vaccine vectors. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2014, Vol. 10, no. 3, pp. 544-556.

Авторы:

Черенова Л.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Каштиго Т.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной микробиологии ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Саядян Х.С. — д.м.н., профессор, кафедра фармацевтической технологии и фармакологии ГБОУ ВПУ «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Шмаров М.М. — д.б.н., заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Cherenova L.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Biotechnology, N. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Kashtigo T.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular Microbiology, N. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Saiadian K.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pharmaceutical Technology and Pharmacology, First Moscow I. Sechenov State Medical University, Moscow, Russian Federation

Shmarov M.M., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Biotechnology, N. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Поступила 14.09.2016
Принята к печати 19.09.2016

Received 14.09.2016
Accepted 19.09.2016

КРАТКИЙ ОБЗОР КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ СРЕДСТВ ИММУНОТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Непомнящих Т.С., Антонец Д.В., Максютов Р.А.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Резюме. В течение последнего десятилетия был достигнут большой прогресс в понимании биологии рака и его взаимодействия с иммунной системой. В клинической практике для лечения онкологических заболеваний широко применяются иммунотерапевтические препараты на основе рекомбинантных цитокинов и моноклональных антител, разработано большое количество экспериментальных способов лечения онкологических заболеваний, многие из которых в данный момент проходят различные стадии клинических испытаний. Одобрение рекомбинантного онколитического герпесвируса T-VEC для лечения меланомы стало очередным важным шагом на пути к созданию эффективных и безопасных противораковых препаратов. В данном обзоре мы рассмотрим некоторые наиболее перспективные стратегии иммунотерапии онкологических заболеваний: ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, клеточную терапию и онколитические вирусы.

Ключевые слова: рак, иммунотерапия, онколитические вирусы, клинические испытания, вирус осповакцины, T-лимфоциты, дендритные клетки, химерный антигенный рецептор

SHORT OVERVIEW OF CLINICAL TRIALS WITH CURRENT IMMUNOTHERAPEUTIC TOOLS FOR CANCER TREATMENT

Nepomnyashchikh T.S., Antonets D.V., Maksyutov R.A.

State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Welfare, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. Over last decade, a substantial progress has been made, with respect to understanding of cancer biology and its interplay with the host immune system. Different immunotherapeutic drugs based on recombinant cytokines and monoclonal antibodies are widely used in cancer therapy, and a large number of experimental cancer treatments have been developed, many of which are currently undergoing various stages of clinical trials. Recent endorsement of a recombinant oncolytic herpesvirus T-VEC for the treatment of melanoma was an important step towards a more safe and efficient anticancer therapeutics. In this review, we shall mention only some of the most promising cancer immunotherapy strategies, namely, immune checkpoint inhibitors, cellular therapy and oncolytic viruses.

Keywords: cancer, immunotherapy, oncolytic viruses, clinical trials, vaccinia virus, T lymphocytes, dendritic cells, chimeric antigen receptor

Адрес для переписки:

Антонец Денис Викторович
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии “Вектор”» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
630559, Россия, Новосибирская обл., р. п. Кольцово, 28/97.
Тел.: 8 (923) 251-81-78.
E-mail: antonec@ngs.ru, antonec@yandex.ru

Address for correspondence:

Antonets Denis V.
Vitebsk State Medical University
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo,
28, apt 97.
Phone: 7 (923) 251-81-78.
E-mail: antonec@ngs.ru, antonec@yandex.ru

Образец цитирования:

Т.С. Непомнящих, Д.В. Антонец, Р.А. Максютов «Краткий обзор клинических испытаний средств иммунотерапии онкологических заболеваний» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 127-144.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-127-144

For citation:

T.S. Nepomnyashchikh, D.V. Antonets, R.A. Maksyutov “Short overview of clinical trials with current immunotherapeutic tools for cancer treatment”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 127-144.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-127-144

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-10101).

Введение

Онкологические заболевания занимают второе место среди ведущих причин человеческой смертности после сердечно-сосудистых заболеваний [30, 78]. В течение последнего десятилетия был достигнут большой прогресс в понимании биологии рака, его генетики и его взаимодействия с иммунной системой. На основании новых данных было разработано большое количество экспериментальных способов лечения онкологических заболеваний, многие из которых в данный момент проходят различные стадии клинических испытаний [19, 35]. Наиболее перспективным направлением является иммунотерапия — терапия, нацеленная на активацию естественных защитных механизмов организма. Иммунотерапия была признана Американским обществом клинической онкологии (ASCO, American Society of Clinical Oncology) главным достижением в области онкологии [17]. Стратегии иммунотерапии онкологических заболеваний можно разделить на неспецифические и специфические. Основной целью первых является неспецифическая активация иммунных реакций, активация антиген-презентирующих клеток и Т-лимфоцитов, например с помощью цитокинов, таких как IL-2 [8], интерфероны [63], GM-CSF, G-CSF [55], или с помощью ингибиторов контрольных точек иммунного ответа — препаратов анти-CTLA4 или анти-PD1 моноклональных антител [4, 62]. Стратегии специфической иммунотерапии в свою очередь могут быть разделены на пассивные и активные. В качестве примеров пассивной специфической иммунотерапии можно привести использование моноклональных антител против раковых антигенов, например герцептина — моноклонального антитела, специфичного к HER-2, мембранному белку, сверхэкспрессируемому многими видами рака [24], и adoptивную клеточную терапию с использованием аутологических опухолеспецифичных Т-лимфоцитов, стимулированных *ex vivo*, либо извлеченных из опухоли пациента (TIL — tumor infiltrated lymphocytes — опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов), CAR-клеток — клеток, несущих химерные антигенные рецепторы (chimeric antigen receptor) [19, 35, 36]. В качестве примеров активной специфической иммунотерапии можно привести клеточную терапию с использованием аутологических дендритных клеток, презентующих раковые антигены [61], либо иммунизацию с помощью вакцин на основе лизатов опухолевых клеток, рекомбинантных раковых антигенов, пептидов, ДНК-вакцин, кодиру-

ющих раковые антигены и т.п. [80]. Относительно новым подходом к терапии онкологических заболеваний является использование онколитических вирусов — вирусов, вызывающих литическую инфекцию клеток различных опухолей, но не нормальных тканей [3, 19]. Показано, что помимо активного лизиса опухолевых клеток онколитические вирусы обладают мощным иммуностимулирующим действием. Оно связано как с активацией неспецифических врожденных защитных реакций: синтезом воспалительных цитокинов и хемокинов, привлечением лейкоцитов и т.п., так и с развитием антиген-специфического противоопухолевого ответа за счет презентации привлеченными в очаг репликации вируса антигенпрезентирующими клетками раковых антигенов, высвобожденных из лизированных клеток опухоли [11, 66]. В настоящее время онколитические вирусы все чаще рассматриваются в качестве перспективной платформы для разработки противораковых вакцин.

Общая характеристика клинических испытаний способов иммунотерапии онкологических заболеваний

В международной базе клинических испытаний (ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>) на данный момент (13 сентября 2016 г.) зарегистрировано 8401 клиническое испытание (КИ) различных стратегий иммунотерапии онкологических заболеваний. Из них 3143 исследования на данный момент завершено, и результаты 949 из них уже опубликованы. 1015 испытаний было остановлено. На рисунке 1 показано распределение количества клинических испытаний по годам, начатых в период с 1990 по 2017 год. Из 3774 незавершенных на настоящий момент КИ 32 исследования стадии 0, 939 исследования I фазы, 590 — I/II фазы, 1221 — II фазы, 410 — II/III и III фазы, и 55 — IV фазы. Важную роль в защите организма от онкологических заболеваний играет Т-клеточный иммунный ответ — на долю КИ различных противораковых вакцин приходится 1094, из них 62 — на долю ДНК- и РНК-вакцин. Результаты 76 испытаний противораковых вакцин опубликованы. Создание искусственных полиэпитопных антигенов считается очень перспективным направлением разработки как противораковых вакцин, так и вакцин против различных инфекционных агентов. Считается, что использование иммуногенных пептидных фрагментов — Т-клеточных эпитопов — раковых антигенов позволит избежать потенциально патогенного действия полноразмерных раковых белков и индуцировать протективный иммунный ответ [9, 33, 59, 76]. На данный момент в базе КИ зарегистрировано 144

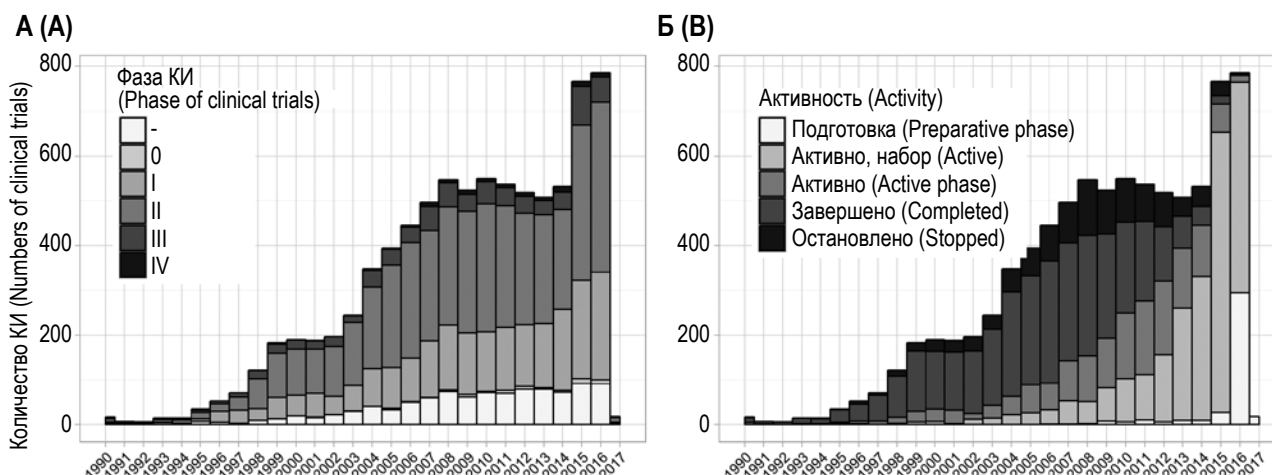


Рисунок 1. Количество клинических испытаний средств иммунотерапии онкологических заболеваний

Примечание. Приведено количество КИ, зарегистрированных в международной базе ClinicalTrials.gov, показаны данные за 1990-2017 гг. Высота столбиков соответствует количеству КИ, начатых в данный год. Разными градациями серого показано количество КИ разных стадий (А) и информация о текущем состоянии КИ (Б). Стадия «-» соответствует оригинальному значению N/A для испытаний без фаз, например, для испытаний приборов; стадия «0» соответствует разведочным испытаниям с привлечением малого количества пациентов. Для графика 1Б была использована информация из поля Status (статус) КИ. Оригинальные значения были сгруппированы в следующие категории: подготовка – Not yet recruiting; активно, набор – Available, Enrolling by invitation или Recruiting; активно – Active, not recruiting, No longer available, Temporarily not available, No longer available или Temporarily not available; завершено – Completed или Approved for marketing; остановлено – Terminated, Suspended или Withdrawn. Все данные о КИ, использованные в данном обзоре, доступны по запросу у авторов.

Figure 1. Numbers of clinical trials concerning immune therapy of oncological diseases

Note. Numbers of clinical trials concerning immune therapy of oncological diseases registered in ClinicalTrials.gov (data for 1990-2017). Height of the bars corresponds to the number of clinical trials initiated in the given year. Different shades of grey color show numbers of clinical trials at distinct stages (A), and information on current state of the trials (B). Stage «-» corresponds to original N/A value for studies without phase discretion, e.g., for studies of devices; stage 0 corresponds to exploratory studies with small groups of patients. For the graph 1B, we used information from the Clinical trial status field (Status). The original values were grouped into the following categories: Preparative phase, Not yet recruiting; Active, Available, Enrolling by invitation or Recruiting; Active phase, not recruiting, No longer available, Temporarily not available, No longer available or Temporarily not available; Completed or Approved for marketing; Stopped, Terminated, Suspended or Withdrawn. All the data on clinical trials used in this review are available from the authors by request.

испытаний пептидных и эпитопных вакцин, но лишь в 21 из них в названии КИ или действующей субстанции фигурируют термины “epitope”, “multi-epitope” или “polyepitope”.

На долю клинических испытаний терапии с использованием дендритных клеток приходится 355, из них 119 завершено, результаты 19 КИ опубликованы. На данный момент в базе зарегистрировано 140 КИ с использованием аутологических или аллогенных Т-клеток (18 завершено, результаты 2 КИ опубликованы) и 122 КИ клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (4 завершено, результаты 2 из них опубликованы). Большинство клинических испытаний посвящено разработке способов иммунотерапии меланомы, различных лимфом, лейкемии, рака молочной железы, рака легких, яичника, простаты и колоректального рака.

В КИ часто исследуется эффективность комбинации иммунотерапии с химиотерапией. Кроме того, химиотерапевтические препараты часто

применяются в контрольных группах пациентов. Наиболее часто использовались такие химиотерапевтические препараты как циклофосфамид, карбоплатин, паклитаксел, этопозид, цисплатин, флударабин, метотрексат, преднизон, цитарабин и дексаметазон. Из способов биологической терапии наиболее часто использовались препараты на основе моноклональных антител: анти-VEGF антитела бевацизумаб (Bevacizumab), анти-CD20 антитела ритуксимаб (Rituximab, широко используемого для лечения неходжкинских лимфом), анти-EGFR антитела цетуксимаб (Cetuximab), анти-HER2 антитела трастузумаб (Trastuzumab, герцептин), ингибиторы контрольных точек иммунного ответа – препараты моноклональных антител против CTLA-4 (ипилимумаб, Ipilimumab) и против PD-1 (пембролизумаб, Pembrolizumab; ниволумаб, Nivolumab), рекомбинантного G-CSF (филграстим, Filgrastim), IL-2 (алдеслейкин, Aldesleukin), GM-CSF (сарграмостим, Sargramostim), различные способы клеточной

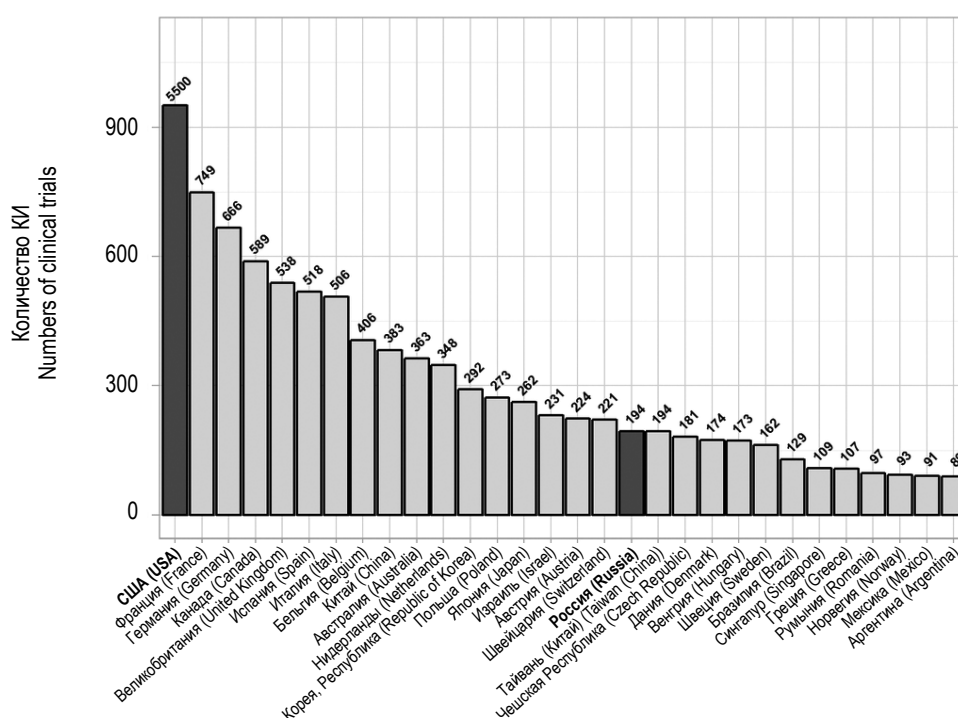


Рисунок 2. Количество КИ средств иммунотерапии онкологических заболеваний, проводимых в научных центрах различных стран

Примечание. На рисунке приведены данные для 30 стран, проводивших наибольшее количество КИ, зарегистрированных в международной базе ClinicalTrials.gov. Темным цветом выделены столбцы, соответствующие США и Российской Федерации. Над каждым столбцом цифрой указано точное количество проходивших в этой стране КИ.

Figure 2. Numbers of clinical trials concerning treatment of oncological diseases performed at research centers

Note. Numbers of clinical trials concerning treatment of oncological diseases performed at research centers from 30 countries where majority of clinical trials registered in ClinicalTrials.gov (data for 1990-2017). The bars marked in dark correspond to USA and Russian Federation. A number of clinical trials performed in the given country is shown at the top of each bar.

терапии. Наибольшее количество клинических испытаний различных способов иммунотерапии рака проводилось в США — 5500. Из клинических испытаний, зарегистрированных в системе ClinicalTrials.gov, 194 проводилось в том числе и в Российской Федерации. По результатам нашего запроса по количеству КИ Россия занимает восемнадцатое место (рис. 2).

Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа

Термином «контрольные точки иммунного ответа» (immune checkpoint) обозначают различные сигнальные пути, ограничивающие продолжительность и силу иммунного ответа, способствующие поддержке иммунологической толерантности и препятствующие развитию аутоиммунных реакций [62]. Большинство этих путей активируются в результате взаимодействия рецепторов с соответствующими лигандами и поэтому могут эффективно ингибироваться с помощью антител. Наиболее изученными

рецепторами «контрольных точек» являются цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 (CTLA-4, CD152) и белок программируемой клеточной смерти 1 (PD1 — programmed cell death protein 1, CD279). CTLA-4 ограничивает чрезмерную активацию Т-лимфоцитов на ранних этапах, его блокирование антителом приводит к активации Т-лимфоцитов [2]. PD-1 — рецептор, экспрессируемый активированными эффекторными Т-лимфоцитами, в результате его взаимодействия с лигандом (PD-L1 или PD-L2) угнетается активность Т-лимфоцитов и вызывается их апоптоз [38]. Недавно для клинического использования были одобрены ингибиторы контрольных точек иммунного ответа (immune checkpoint) — препараты моноклональных анти-CTLA4 антител (ипилиумаб, Ipilimumab) или анти-PD1 антител (ниволумаб, Nivolumab; пембролизумаб, Pembrolizumab) [31, 72]. Показано, что эти препараты уменьшают количество регуляторных Т-лимфоцитов и оказывают им-

муностимулирующее действие, увеличивают количество опухолеспецифичных цитотоксических Т-лимфоцитов. Эффективность этих биотерапевтических препаратов была показана при лечении меланомы, рака легких, рака мочевого пузыря, рака желудка, различных лимфом и т.д. [19, 77]. Данные об эффективности этих препаратов при лечении различных видов рака подробно рассмотрены в недавнем обзоре [4]. В большинстве публикаций, описывающих использование ингибиторов контрольных точек иммунного ответа, основной акцент делается на их высокой эффективности, но, к сожалению, эти иммуномодулирующие препараты обладают высокой токсичностью, обусловленной неспецифической активацией Т-лимфоцитов. В частности, клинические испытания препарата ипилимумаб показали его эффективность для относительно небольшого процента пациентов [52, 54], но при этом у 10-35% пациентов, получавших ипилимумаб, наблюдались различные побочные явления 3-5 степени тяжести [54]. Антагонисты PD-1 продемонстрировали большую эффективность, чем ипилимумаб, и кроме того оказались менее токсичными [19]. В недавнем КИ (III фазы) эффективности монотерапии ниволумабом, ипилимумабом и их комбинации у пациентов с меланомой (NCT01844505). Комбинированная терапия оказалась наиболее эффективной, наименее эффективной — монотерапия с помощью препарата ипилимумаб. Объективный клинический ответ наблюдался у 58% пациентов, получавших комбинацию препаратов, у 43,7% пациентов, получавших ниволумаб, и у 19%, получавших ипилимумаб. Полный клинический ответ — у 11,5, 8,9 и 2,2% пациентов соответственно. Частота побочных явлений 3-4 степени тяжести в группе пациентов, получавших ниволумаб, составила 16,3%, у получавших ипилимумаб — 27,5% и у пациентов с комбинированной терапией — 55% [45]. В ходе рандомизированного контролируемого исследования II фазы, в котором сравнивалась эффективность комбинированной терапии препаратами ниволумаб и ипилимумаб у пациентов с метастатической меланомой было показано, что объективный клинический ответ наблюдался у 60% пациентов, получавших оба препарата (у 22% наблюдался полный клинический ответ), и лишь у 10% пациентов, получавших только ипилимумаб (NCT01927419). У пациентов, получавших комбинированную терапию, медианное значение времени до прогрессирования болезни оказалось почти вдвое больше (8,57-8,87 мес. против 3,73-4,73 мес.). Но при этом и частота серьезных побочных эффектов (3-4 степени тяжести) среди

пациентов, получавших ниволумаб и ипилимумаб, оказалась выше, чем у пациентов, получавших только ипилимумаб (61,70% против 39,13% соответственно) [68]. Таким образом, комбинированная терапия более эффективна, но при этом вероятность возникновения побочных явлений возрастает.

Дендритно-клеточные вакцины

Дендритные клетки (ДК) — профессиональные антигенпрезентирующие клетки, представляющие Т-лимфоцитам пептидные фрагменты процессированных антигенов в комплексе с молекулами МНС I и II класса. На поверхности дендритных клеток экспрессируется большое количество костимулирующих молекул (CD40, CD80, CD86), патоген-распознающие рецепторы (TLR — Toll-like receptors). ДК контролируют активацию и дифференцировку Т-лимфоцитов. Первые публикации, в которых обсуждалась возможность использования дендритных клеток для активной специфической иммунотерапии онкологических заболеваний, появились еще в 90-х годах прошлого столетия [20, 28]. Первые публикации о клинических испытаниях дендритно-клеточных вакцин для лечения онкологических заболеваний появились еще в 1996 г. [58]. На данный момент (13.09.2016 г.) опубликовано более 350 статей, описывающих результаты клинических испытаний противораковых дендритно-клеточных вакцин; в базе КИ зарегистрировано не менее 355 исследований безопасности и эффективности ДК вакцин. Но несмотря на большое количество исследований и клинических испытаний к настоящему времени лишь одна клеточная иммунотерапевтическая вакцина была одобрена для использования в клинической практике — в начале 2010 года FDA была одобрена вакцина Sipuleucel-T (Provenge) для лечения рака простаты [34]. Sipuleucel-T — препарат аутологических антигенпрезентирующих клеток пациента, культивированных с химерным белком, состоящим из PSA, слитого с GM-CSF [54]. Результаты рандомизированного контролируемого двойного слепого исследования III фазы (NCT00065442), проведенного в 75 центрах с привлечением 512 пациентов, показали достоверное увеличение на 4 месяца медианного значения продолжительности жизни пациентов, получавших Sipuleucel-T. Однако, несмотря на достоверное увеличение продолжительности жизни пациентов, не было обнаружено ни регрессии опухолей, ни значимой индукции Т-клеточного ответа, ни отличий во времени до прогрессирования заболевания между группами пациентов, получавших препарат дендритных клеток без антигена и получавших Sipuleucel-T [54].

У 5 больных с острым миелолейкозом в результате внутрикожной вакцинации препаратом аутологичных ДК моноцитарного происхождения, электропорированных мРНК, кодирующей WT-1 (Wilm's tumor-1), наблюдалась частичная или полная молекулярная ремиссия (NCT00834002, I фаза). Клинический ответ был скоррелирован с увеличением уровня специфических к WT-1 CD8⁺T-лимфоцитов в результате вакцинации [84]. Рядом исследовательских групп было показано, что эффективность дендритно-клеточных вакцин может быть увеличена в результате использования ДК, выделенных из крови пациентов, а не выращенных *ex vivo* из моноцитов [75, 88]. В ходе I фазы клинических испытаний (NCT01690377) эффективности аутологичных миелоидных дендритных клеток, презентирующих тирозиназу и gp100, для лечения метастазирующей меланомы было показано, что клинический ответ пациентов коррелирует с активацией специфического Т-клеточного иммунного ответа. У 4 из 14 пациентов наблюдалась долговременная выживаемость без прогрессирования заболевания (12–35 месяцев). Было показано, что интранодальное введение небольших количеств активированных миелоидных ДК (в дозе 3–10 × 10⁶ клеток) обладает терапевтической эффективностью, и кратковременное экспонирование раковых антигенов миелоидным ДК (16 ч) является достаточным для их активации [75]. До недавнего времени большинство исследований пептидных и полиэпитопных вакцин было сосредоточено на использовании эпитопов, рестриктированных молекулами МНС I класса, но было показано, что использование эпитопов, презентруемых молекулами МНС II класса, улучшает эффективность дендритно-клеточных вакцин (NCT00243529) [5]. Эти результаты были подтверждены при изучении взаимодействия между ДК, CD4⁺ и CD8⁺T-клетками *in vitro* [32]. На важную роль активации специфического противоопухолевого ответа CD4⁺T-лимфоцитов указывают результаты недавних клинических испытаний (I/II фазы) пептидной вакцины из 6 Т-хелперных эпитопов — 6 пептидных фрагментов 4 раковых антигенов: MART-1, NY-ESO-1, gp100 и тирозиназы (NCT00089219) [71]. Однако, несмотря на обнадеживающие результаты, полученные в ходе доклинических испытаний и испытаний I-II фазы, в настоящее время нет сообщений ни об одном успешном испытании вакцин на основе ДК III фазы помимо результатов вакцины Sipuleucel-T [53]. Кроме того, использование этого подхода требует выполнения ряда трудоемких и дорогостоящих операций: выделения клеток пациента, их культивирование

ex vivo и т.п., что препятствует его широкому распространению [19].

Аутологичные Т-лимфоциты и клетки, несущие химерные антигенные рецепторы (CAR)

Активно разрабатываются и другие способы клеточной иммунотерапии, такие как Т-клеточные вакцины и иммунотерапия с использованием генетически модифицированных Т-лимфоцитов, несущих химерные антигенные рецепторы (CAR — chimeric antigen receptor) [19, 35, 36, 77]. Ознакомиться с принципами строения химерных антигенных рецепторов можно в недавних обзорах [25, 74]. На данный момент в базе ClinicalTrials.gov зарегистрировано не менее 205 КИ CAR- и Т-клеточной иммунотерапии онкологических заболеваний. Терапия с помощью различных анти-CD19 CAR-клеток продемонстрировала высокую эффективность, в том числе достижение полной ремиссии, у пациентов с различными формами В-клеточных лимфом и лейкемии [12, 41, 51]. В ходе недавних клинических испытаний из 30 пациентов с рецидивирующим острым лимфобластным лейкозом у 27 удалось достичь полной ремиссии в результате введения препарата аутологичных Т-лимфоцитов, трансформированных с помощью рекомбинантного ретровирусного вектора, кодирующего химерный анти-CD19 рецептор — CART19 [50, 51]. На настоящий момент в базе ClinicalTrials.gov зарегистрировано 39 КИ анти-CD19 CAR-Т-клеток из 128 КИ CAR-клеток. Но этот способ терапии обладает высокой токсичностью, связанной с системным повышением уровня воспалительных цитокинов — синдромом выброса цитокинов. В частности, у всех пациентов в результате терапии с использованием CART19 клеток (NCT01626495, NCT01029366) наблюдались побочные эффекты различной тяжести, а 27% пациентов потребовалась терапия с применением препарата тоцилизумаб, чтобы купировать тяжелую форму синдрома выброса цитокинов [50, 51]. Недавно, в июне 2016 г., завершились испытания I/II фазы анти-VEGFR2 CAR CD8⁺ лимфоцитов для лечения метастазирующей меланомы и рака почки. Терапия не увенчалась успехом — лишь у одного пациента из 24 наблюдался частичный ответ. Кроме того у всех пациентов наблюдались различные, в том числе и серьезные, побочные эффекты: гипоксия, аритмия, гепатотоксичность и т.п. (NCT01218867).

Осложнения могут быть связаны не только с неспецифическим действием высоких концентраций цитокинов, но и с экспрессией антигенов-мишеней CAR-клеток в нормальных тканях. В ходе клинических испытаний терапии почечной карциномы с помощью повторных инъек-

ций аутологичных CAR-клеток, специфичных к карбоангидразе IX, у всех 3 пациентов после 4-5 инъекций наблюдался гепатотоксичный эффект. Оказалось, что клетки эпителия желчных протоков также продуцируют карбоангидразу IX, что, по-видимому, и обуславливает развитие аутоиммунного воспаления [43, 44]. В 2010 г. были прекращены клинические испытания терапии метастазирующего HER2⁺ рака с использованием анти-HER2 CAR-клеток (NCT00924287) в связи с гибелью пациента от тяжелого воспаления легких, спровоцированного экспрессией HER2 на поверхности легочного эпителия [57]. Развитие тяжелых аутоиммунных реакций было выявлено и при использовании клеточной терапии с помощью Т-лимфоцитов, специфичных и к другим раковым антигенам. В частности, 9 HLA-A*02:01⁺ пациентам, опухоли которых экспрессировали антигены MAGE-A3, вводили модифицированные аутологичные Т-лимфоциты, экспрессирующие мышиный Т-клеточный рецептор, специфичный к эпитопу MAGE-A3 (KVAELVHFL, а.к.о. 112-120), рестриктированному HLA-A*02:01 (NCT01273181). У 5 из них наблюдалась регрессия опухолей. Но у трех пациентов возникли серьезные осложнения, и два из них умерли от некротизирующей лейкоэнцефалопатии. В очагах патологии у этих пациентов была обнаружена интенсивная инфильтрация CD8⁺Т-лимфоцитами. В ходе дальнейших исследований было показано, что несмотря на то, что MAGE-A3 в тканях мозга человека не обнаруживается, некоторые нейроны экспрессируют MAGE-A12, а возможно, и MAGE-A1, -A8, -A9. Используемый в данном клиническом испытании ТКР также способен перекрестно распознавать MAGE-A12 и MAGE-A9 [56]. При использовании Т-лимфоцитов, специфичных к карциноэмбриональному антигену (CEA), у всех 3 пациентов снижался уровень CEA в сыворотке крови, у 1 пациента наблюдалась регрессия метастазов, но на 5-8 день после введения лимфоцитов у всех пациентов развилась диарея 2-3 степени тяжести, примерно через 2 недели интенсивность колита снизилась, и через 4-6 недель состояние пациентов нормализовалось [64].

В настоящее время большое внимание уделяется исследованиям путей снижения токсичности CAR-Т-клеток. Важная роль в развитие токсических эффектов, по-видимому, связана с системным введением большого количества активированных Т-лимфоцитов, и, таким образом, локальные внутриопухолевые инъекции не должны вызывать токсических реакций. В настоящее время проводится большое количество

КИ стратегий оптимизации CAR-Т-клеточной терапии [25].

Побочные эффекты различных стратегий иммунотерапии онкологических заболеваний подробно рассмотрены в литературе [86]. Из 949 КИ с опубликованными результатами в 546 наблюдались побочные эффекты различной тяжести, серьезные осложнения были отмечены в ходе 63 КИ, и как минимум в 8 КИ у пациентов развивались фатальные осложнения (NCT00145626, NCT00157196, NCT00157209, NCT00848510, NCT01015443, NCT01417936, NCT01273181 и NCT00924287).

Онколитические вирусы

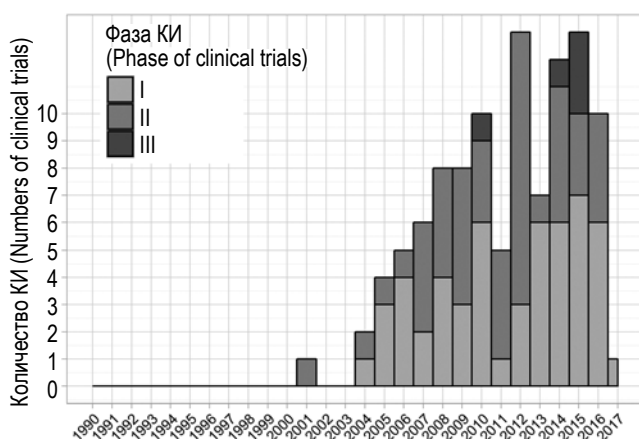
Онколитические вирусы — вирусы, поражающие преимущественно клетки различных опухолей, но не нормальных тканей, и вызывающие литическую инфекцию [3, 19]. Они разрабатываются как на основе вирусов непатогенных для человека, таких как вирус болезни Ньюкасла, реовирус, вирус долины Сенека, так и на основе аттенуированных вирусов: вируса везикулярного стоматита, вируса кори, вируса осповакцины, вируса простого герпеса [3, 14], онколитическая активность была показана для вакцинных штаммов вируса кори, в частности для штамма Edmonston [22]. Значительной онколитической активностью обладает аттенуированный штамм рабдовируса Мараба MG1 [67]. Онколитические вирусы уже применяются в клинической практике. В 2004 г. в Латвии был одобрен препарат Rigriv, созданный на основе природного штамма эховируса 7-го типа [3, 18]. Была показана его способность подавлять различные виды рака, такие как меланома, рак желудка, рак прямой и толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак почки, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, а также различные виды саркомы [3]. В ноябре 2005 года в Китае был одобрен препарат онколитического аденовируса Oncorine для комбинированной с химиопрепаратами терапии носоглоточной карциномы [47]. В 2015 году первым онколитическим вирусом, одобренным в США для лечения онкологических больных стал модифицированный онколитический герпесвирус 1-го типа, кодирующий человеческий GM-CSF — Talimogene Laherparepvec (T-VEC) [66]. В результате III фазы КИ эффективности этого препарата в сравнении с GM-CSF при лечении меланомы (NCT00769704) объективный клинический ответ наблюдался у 26,4% и 5,7% пациентов, соответственно, увеличилась продолжительность жизни пациентов. Наиболее обычными побочными явлениями при виро-терапии были усталость, озноб и повышение температуры. Побочные реакции 3-4 степени на-

блюдались у 2% пациентов, тяжелых осложнений не наблюдалось [7].

Высокая эффективность и безопасность онколитических вирусов привлекает все большее внимание исследователей. В базе данных биомедицинских публикаций PubMed на 13.09.2016 содержится 1069 статей, основной темой которых являются исследования онколитических вирусов, 213 из них — обзоры, 28 публикаций с результатами клинических испытаний. На данный момент в базе ClinicalTrials.gov зарегистрировано 107 клинических испытаний онколитической виротерапии. 44 КИ закончилось и для 5 из них результаты опубликованы, 9 испытаний было остановлено, в основном из-за нехватки добровольцев. На рисунке 3 показана информация о количестве клинических испытаний онколитических вирусов по годам. По количеству клинических испытаний онколитических вирусов лидирует США — 68 КИ. Согласно данным ClinicalTrials.gov, в РФ проводилось только 1 КИ онколитических вирусов — российские медицинские центры участвовали в III фазе КИ эффективности препарата онколитического реовиру-

са (реолизина) для лечения рака головы и шеи (NCT01166542) (рис. 4). По данным российского реестра клинических исследований лекарственных препаратов (<http://www.grls.rosminzdrav.ru/>), в настоящее время в РФ близится к завершению II фаза клинических испытаний отечественного препарата «Канцеролизин» — рекомбинантного онколитического аденовируса 5-го серотипа — «Оценка эффективности и безопасности препарата «Канцеролизин» у пациентов с распространенным плоскоклеточным раком головы и шеи, неоперабельным раком поджелудочной железы и глиобластомой головного мозга». В результате многочисленных доклинических и клинических испытаний, помимо эффективности онколитических вирусов, была показана их безопасность. Большинство побочных явлений, наблюдавшихся при виротерапии, не были серьезными (не выше третьей степени тяжести), в основном — кратковременное гриппоподобное состояние [48]. Была показана способность вирусов сенсibilизировать клетки опухоли к химиотерапии [39, 42, 79]. Во многих клинических испытаниях онколитические вирусы исполь-

А (A)



Б (B)

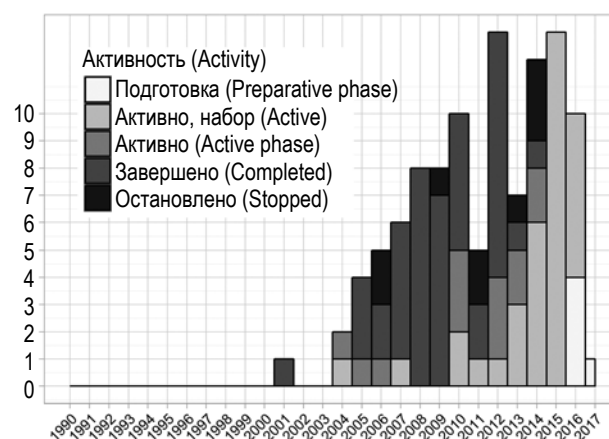


Рисунок 3. Количество клинических испытаний онколитических вирусов

Примечание. Приведено количество КИ, зарегистрированных в международной базе ClinicalTrials.gov, показаны данные за 1990-2017 гг. Высота столбиков соответствует количеству КИ, начатых в данный год. Разными градациями серого показано количество КИ разных стадий (А) и информация о текущем состоянии КИ (Б). Для графика 3Б была использована информация из поля Status (статус) КИ. Оригинальные значения были сгруппированы в следующие категории: подготовка — Not yet recruiting; активно, набор — Available, Enrolling by invitation или Recruiting; активно — Active, not recruiting, No longer available, Temporarily not available, No longer available или Temporarily not available; завершено — Completed или Approved for marketing; остановлено — Terminated, Suspended или Withdrawn. Все данные о КИ, использованные в данном обзоре, доступны по запросу у авторов.

Figure 3. Number of clinical trials with oncolytic viruses

Note. Number of clinical trials with oncolytic viruses registered in ClinicalTrials.gov (data for 1990-2017). Height of the bars corresponds to the number of clinical trials initiated in the given year. Different shades of grey color show numbers of clinical trials at distinct stages (A) and information from the Status field (B). For the 3B graph, data from the Status field was used. The original values were grouped into the following categories: Preparative phase, Not yet recruiting; Active, Available, Enrolling by invitation or Recruiting; Active phase, Active, not recruiting, No longer available, Temporarily not available, No longer available or Temporarily not available; Completed, Completed or Approved for marketing; Stopped, Terminated, Suspended or Withdrawn. All the data on clinical trials used in this review are available from the authors by request.

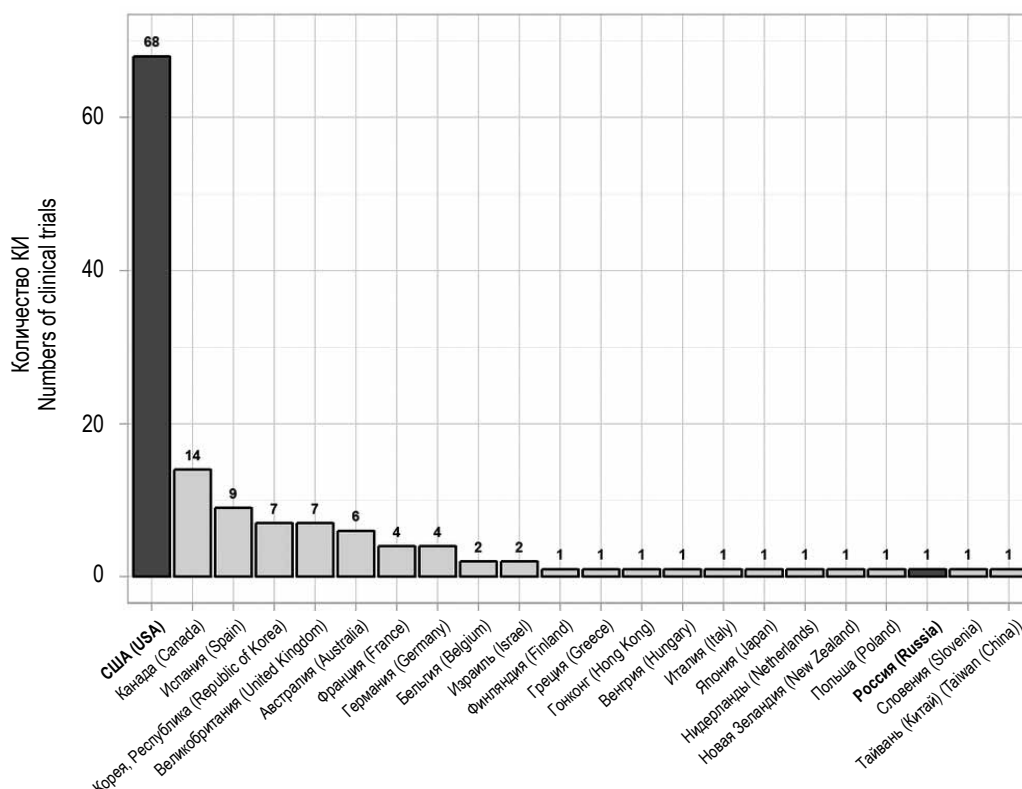


Рисунок 4. Количество КИ онколитических вирусов, проводимых в научных центрах различных стран

Примечание. На рисунке приведены данные о количестве КИ, зарегистрированных в международной базе ClinicalTrials.gov, проводимых в научных центрах различных стран. Темным цветом выделены столбцы, соответствующие США и Российской Федерации. Над каждым столбцом цифрой указано точное количество проходивших в этой стране КИ.

Figure 4. Number of clinical trials with oncolytic viruses, performed at research centers

Note. Number of clinical trials with oncolytic viruses, performed at research centers from 30 countries where majority of clinical trials registered in ClinicalTrials.gov. The bars marked in dark correspond to USA and Russian Federation. A number of clinical trials performed in the given country is shown at the top of each bar.

зуются в комбинации с химиотерапией, в частности: рекомбинантный онколитический вирус кори, кодирующий симпотер Na^+/I^- (MV-NIS), в сочетании с циклофосфамидом использовался в КИ NCT00450814; онколитический вирус осповакцины JX-594 в сочетании с сорафенибом — в КИ NCT01171651 и NCT02562755; аденовирус DNX2401 и темозоломид в КИ NCT01956734 и т.п. Комбинация реовируса с препаратами платины и таксанами обладает заметной эффективностью при лечении рака головы и шеи [73]. Результаты I фазы клинических испытаний показали терапевтический потенциал онколитической терапии (герпесвируса G207) в сочетании с лучевой терапией для лечения злокачественных глиом (NCT00157703) [49]. Была показана эффективность рекомбинантного онколитического аденовируса в сочетании с лучевой терапией для лечения рака простаты (NCT00583492, II фаза) [21]. Проводятся клинические испытания безопасности и эффективности онколитической виротерапии в сочетании с рекомбинантными

цитокинами (DNX-2401 + $\text{IFN}\gamma$, NCT02197169), колониестимулирующими факторами (реовирус + сарграмостим (GM-CSF), NCT02444546), ингибиторами иммунных контрольных точек — в сочетании с ипилимумаб (NCT02307149) и с пембролизумаб (NCT02565992, NCT02798406, NCT02824965), моноклональными антителами против эндотелиального ростового фактора VEGF (Bevacizumab, NCT01622543) и т.п. Исследуется эффективность виротерапии после хирургического удаления опухолей (NCT00805376, NCT02031965). По крайней мере в 31 из найденных нами в базе данных 107 КИ онколитических вирусов хотя бы в одной из групп пациентов использовалась комбинированная терапия.

Онколитическая активность вируса может быть увеличена в результате модификации его поверхностных белков, связывающихся с клеточными рецепторами, как это было показано для рекомбинантного аденовируса, в который встраивался фрагмент гена гликопротеина вируса везикулярного стоматита (VSV-G). Поскольку ви-

рус везикулярного стоматита способен заражать гораздо большее количество типов клеток, чем аденовирус дикого типа, новый рекомбинантный вирус (RdB-1L-VSVG) также показал активность против широкого спектра линий раковых клеток и большую активность *in vivo* [91]. Коинфекция различными онколитическими вирусами также может обладать усиленным терапевтическим эффектом, как это было показано в мышинных ксенотрансплантных моделях, с использованием клеточных линий глиобластомы человека (U87 и U373) показали, что при комбинированной инфекции реовирусом (серотипа 3) и вирусом Ньюкасла (Hitcher-B1) или реовирусом и парвовирусом H1 наблюдается синергический противоопухолевый эффект [6].

Высокая эффективность онколитических вирусов, по-видимому, объясняется их плеiotропным действием, так, помимо прямого цитолитического действия на раковые клетки, ряд онколитических вирусов способен специфично разрушать кровеносные сосуды в опухоли. В частности, способность подавлять неоангиогенез была показана для рекомбинантного онколитического герпесвируса 1 типа (G207). Введение препарата G207 — ксенотрансплантата рабдомиосаркомы человека — внутрь опухоли привело к разрушению кровеносных сосудов в опухоли и к ее регрессии. Ультроструктурные исследования показали наличие вирусных частиц в опухолевых клетках и в эндотелиальных клетках обработанных G207 ксенотрансплантатов, но не в соседних нормальных тканях [15]. Аналогичная способность была показана и для рекомбинантного онколитического вируса осповакцины JX-594 со встроенным геном человеческого GM-CSF (Pexa-Vec) [10]. Многочисленные исследования показали, что основным фактором эффективности онколитической виротерапии является способность вирусов стимулировать иммунные реакции. Молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMP — danger associated molecular patterns) и опухолеассоциированные антигены, высвобождаемые из лизированных опухолевых клеток, стимулируют активацию как врожденных неспецифических иммунных реакций, так и формирование антиген-специфического противоопухолевого ответа [11, 83]. Важную роль активации иммунного ответа подтверждают, в частности, эксперименты, проведенные в мышинной модели. Введение препарата онколитического аденовируса Delta24-RGD увеличило долгосрочную выживаемость мышей, стимулировало локальную продукцию воспалительных цитокинов и хемокинов, усиливало инфильтрацию опухоли макрофагами

и Т-лимфоцитами, кроме того, индукция протективного иммунного ответа была подтверждена при повторном введении ксенотрансплантата опухоли. Но все эти эффекты были полностью блокированы введением дексаметазона, сильного иммунодепрессанта [40]. На индукцию противоопухолевого иммунного ответа указывает и то, что виротерапия имеет долговременный терапевтический эффект. Показано, что после терапии препаратом Реолизин около 30% пациентов оставались в живых более 2-х лет [85]. В недавней статье подробно описывается случай пациента, у которого традиционное лечение рецидива глиомы оказалось неэффективным. В результате онколитической терапии (внутриопухолевой инъекции 120 мкл вирусной суспензии, содержащей 1×10^7 БОЕ G207) и 4 последующих курсов химиотерапии болезнь стабилизировалась и пациент прожил еще 7.5 лет, при этом рецидивов не было в течение 6 лет [87].

Иммуностимулирующая активность онколитических вирусов может быть усилена включением генов, кодирующих различные цитокины, хемокины, костимулирующие молекулы и т.п., такие как GM-CSF [19], IL-15, CCL5 [60], CD40L [16]. Наиболее часто для этих целей используется GM-CSF — колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов. Этот цитокин привлекает естественные клетки-киллеры и антигенпредставляющие клетки, а также активирует АПК и стимулирует их созревание [69]. Для стимуляции противоопухолевого иммунитета и подавления ассоциированной с опухолью иммунологической толерантности в состав генома рекомбинантного онколитического аденовируса Delta24-RGD был введен ген GM-CSF. После однократного введения Ad5-D24-RGD-GMCSF у 3 из 6 пациентов прогрессирующая болезнь стабилизировалась, у большей части пациентов снизился уровень опухолевых маркеров, в то время как у всех пациентов, получавших Ad5-D24-RGD, заболевание прогрессировало [65]. Ген, кодирующий GM-CSF, встроен в геном онколитического вируса осповакцины JX-594 (Pexa-Vec). Онколитическая и иммунотерапевтическая активность JX-594 была продемонстрирована в ходе II фазы клинических испытаний при лечении печеночноклеточной карциномы (NCT00554372) [29]. Также ген GM-CSF встроен в геном рекомбинантного онколитического герпесвируса T-VEC (Talimogene Laherparepvec), недавно одобренного FDA для клинического использования [17]. ONCOS-102 химерный онколитический аденовирус тоже кодирует GM-CSF человека. Его безопасность и иммуностимулиру-

ющая активность были показаны в ходе I фазы клинических испытаний (NCT01598129) [70].

В настоящее время проходят клинические испытания I фазы рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, кодирующего IFN β человека (NCT01628640). Недавно начался набор пациентов для I фазы клинических испытаний онколитического аденовируса Ad5-yCD/mutTKSR39rep-hIL12, кодирующего IL-12 человека для терапии рака простаты (NCT02555397). Завершена I фаза клинических испытаний рекомбинантного онколитического вируса оспы канареек со встроенным геном IL-12 (ALVAC-IL12) при лечении меланомы. Как в инъецированных, так и в неинъецированных подкожных опухолевых узелках пациентов наблюдалось увеличение экспрессии IL-12 и IFN γ , увеличение Т-клеточной инфильтрации; у одного пациента наблюдался полный клинический ответ [82]. В ходе экспериментов *in vivo* на лабораторных животных была показана эффективность и ряда других иммуностимулирующих факторов (IL-2, IL-18, CD40L, CD80, FLT3L, 4-1BBL, белков теплового шока и т.п.) [48].

Повторные инъекции онколитического вируса могут усилить иммунный ответ. В группе пациентов, получивших однократную внутриопухолевую инъекцию химерного онколитического аденовируса CGTG-102, кодирующего GM-CSF (ONCOS-102, Ad5/3-D24-GM-CSF), медиана выживаемости составила 111 дней, в группе, получившей серию из трех инъекций в течение 10 недель — 277 дней. Наблюдалась существенная корреляция между уровнем противовирусных и противоопухолевых Т-клеток, что указывает на то, что вирусный онколизис может привести к расширению спектра узнаваемых эпитопов и нарушению опухолеассоциированной иммунологической толерантности [37].

Онколитические вирусы как вакцинная платформа

Вирусы являются привлекательной вакцинной платформой, поскольку реплицирующийся вирус обладает высокой иммуногенностью. Показано, что кроме лизиса опухолевых клеток онколитические вирусы стимулируют развитие опухолеспецифичного Т-клеточного ответа, по крайней мере столь же эффективно, как и блокаторы иммунных контрольных точек [89]. С помощью введения в геном онколитического вируса раковых антигенов можно дополнительно повысить эффективность индукции противоопухолевого иммунного ответа. Вирусы, кодирующие раковые антигены (например, MAGE-A3, MART-1, CEA), стимулируют антиген-специфичные иммунные

реакции [66]. Рекомбинантный вирус кори, кодирующий раковый антиген CEA (carcino-embryonic antigen), проходящий в настоящее время I фазу клинических испытаний для лечения рака яичника (NCT00408590), показал свою безопасность и терапевтическую активность: у 14 из 21 пациента болезнь стабилизировалась, увеличилась продолжительность жизни пациентов [22]. Кроме того, было показано, что наличие вируснейтрализующих антител у пациентов не снижает терапевтической эффективности вируса [22]. В настоящее время проводятся клинические испытания рекомбинантных онколитических вирусов, экспрессирующих антиген меланомы MAGE-A3: рекомбинантных аденовируса (AdMA3) и вируса Мараба MG1 (MG1MA3) (NCT02285816, NCT02879760).

Очень перспективными являются поксвирусные векторы — они безопасны и могут быть использованы для включения нескольких трансонов. Относительно недавно на основе рекомбинантного вируса осповакцины и вируса птичьей оспы (fowlpox) была разработана вакцинная платформа TRICOM (TRIad of COstimulatory Molecules, экспрессирующая триаду иммуностимулирующих молекул: B7.1, ICAM-1 и LFA-3), предназначенная для экспрессии целевых раковых антигенов. Для первичной и бустерной иммунизации при этом используются разные вирусы (вирус осповакцины и вирус оспы птиц) [46]. При использовании трех костимулирующих молекул интенсивность иммунного ответа на экспрессируемые вакцинным вектором опухолевые антигены намного выше, чем при использовании этих молекул по отдельности или в парах [23]. На основе этой платформы была создана вакцина PANVAC, кодирующая карциноэмбриональный антиген (CEA) и MUC-1, избыточно экспрессируемые большинством обычных карцином. Пилотное исследование показало, что вакцина хорошо переносится больными. Антиген-специфические иммунные реакции на MUC-1 и/или CEA после вакцинации были обнаружены у 9 из 16 пациентов, у некоторых пациентов развивался продолжительный клинический ответ, происходил регресс опухолей [26]. Продолжается III фаза испытаний вакцины PROSTVAC, также созданной на основе платформы TRICOM, экспрессирующей антиген PSA (NCT01322490). 59 из 104 пациентов, прошедших тестирование на Т-клеточные реакции, продемонстрировали более чем 2-кратное (у половины пациентов наблюдалось 5-кратное) по сравнению с начальным уровнем увеличение PSA-специфических

Т-клеток через 4 недели после вакцинации. У 68% пациентов наблюдались иммунные реакции на опухолевые антигены, не присутствовавшие в вакцине (в результате распространения эпитопов — epitope spreading) [27]. При этом стоит отметить, что при измерении системного уровня иммунного ответа на PSA есть возможность недооценить истинный уровень терапевтического иммунного ответа, так как не учитываются Т-лимфоциты, мигрировавшие в опухоль, и, кроме того, не измеряется противоопухолевый иммунный ответ, сформировавшийся в результате распространения эпитопов [27].

Кроме того, вирусные векторы могут быть использованы для трансдукции дендритных клеток. В частности, было показано, что дендритные клетки HLA-A1⁺ доноров, инфицированные рекомбинантным ALVAC, несущим минигены, кодирующие эпитопы раковых антигенов MAGE-A1 и MAGE-A3, рестриктированные HLA-A1, индуцируют специфический цитотоксический Т-клеточный ответ более эффективно, чем те же дендритные клетки, пульсированные этими пептидами [81]. Недавно была разработана система, позволяющая адсорбировать пептиды на поверхности аденовируса — PeptiCRAd. Было показано, что покрытый пептидами вирус сохраняет свою инфекционность. PeptiCRAd, нагруженные эпитопами опухолевых антигенов — TRP2 и gp100 — уменьшают рост как инъецированной опухоли, так и вторичных необработанных меланом. В мышинной ксенографтной модели меланомы человека PeptiCRAd, несущий эпитопы MAGE-A1 и экспрессирующий GM-CSF, увеличил долю CD8⁺ Т-лимфоцитов, специфичных к MAGE-A1, и вызывал регрессию опухолей [13]. Для обеспечения адресной доставки, например в случае, когда инъекция внутрь опухоли затруднена, можно использовать для доставки онколитических вирусов инфицированные клетки, например мезенхимные стволовые клетки, обладающие опухолетропностью, как это было показано для вируса Delta24-RGD. Мышам имплантировали ксенотранспланты глиомы человека, меченной люциферазой (для мониторинга состояния опухоли по биолюминесценции), а затем внутриартериально вводили мезенхимные стволовые клетки, зараженные онколитическим вирусом. Анализ размера опухоли с помощью визуализации биолюминесценции показал ингибирование роста глиомы и ликвидацию опухолей в животных, получавших hMSC-Delta24, по сравнению с контрольной группой. Наблюдалось увеличение медианы выживаемости

от 42 дней в контрольной группе до 75.5 дней в экспериментальной [90].

Заключение

Использование онколитических вирусов открывает новый этап в развитии подходов к терапии онкологических заболеваний. Важным шагом на пути к созданию эффективных и безопасных противораковых препаратов стало одобрение использования рекомбинантного онколитического герпесвируса T-VEC в клинической практике для лечения меланомы. Многочисленные исследования показали высокую эффективность данного метода лечения в сочетании с высокой безопасностью. Онколитические вирусы обладают комплексной активностью, действуют на опухоли на различных уровнях: они оказывают прямое цитотоксическое действие на раковые клетки, некоторые онколитические вирусы также способны подавлять неоваскуляризацию, специфически разрушая кровеносные сосуды в опухолях, в результате высвобождения из лизированных клеток опухоли раковых и вирусных антигенов, молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением, активируются неспецифические и специфические иммунные реакции и эффективно борются с метастазами. Показано, что по эффективности стимуляции иммунного ответа онколитическая виротерапия сопоставима с использованием ингибиторов контрольных точек иммунного ответа. Иммуностимулирующая активность онколитических вирусов может быть усилена встраиванием генов, кодирующих различные воспалительные цитокины, колоние-стимулирующие факторы, костимулирующие молекулы. В наших исследованиях используется оригинальная вакцинная платформа, созданная на основе рекомбинантного онколитического вируса осповакцины штамма ЛИВП. Для обеспечения избирательной репликации в раковых клетках у этого вируса были удалены гены, кодирующие тимидинкиназу и вирусный ростовой фактор, в его геном были встроены гены, кодирующие GM-CSF для стимуляции противоопухолевого иммунитета и TRAIL для индукции апоптоза инфицированных клеток [1]. В состав генома этого вируса могут быть введены гены, кодирующие целевые раковые антигены или искусственные полиэпитопные конструкции. С помощью введения в геном онколитических вирусов генов, кодирующих раковые антигены, можно активировать мощный противоопухолевый иммунный ответ. Кроме того, использование онколитических вирусов не требует таких сложных и дорогостоящих операций, как клеточная терапия.

Список литературы / References

1. Максютов Р.А., Трегубчак Т.В., Денисова Н.И., Максютов А.З., Гаврилова Е.В. Создание современной платформы, содержащей набор онколитических вирусов с иммуностимулирующими свойствами // Российский иммунологический журнал, 2013. Т. 7, № 16. С. 456-459. [Maksyutov R.A., Tregubchak T.V., Denisova N.I., Maksyutov A.Z., Gavrilova E.V. Creating a modern platform comprising a set of oncolytic viruses with immune-stimulating properties. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Immunological Journal*, 2013, Vol. 7, no. 16, pp. 456-459. (In Russ.)]
2. Моисеенко В.М., Волков, Н.М. Важнейшие события в онкологии в 2014 году: иммунотерапия злокачественных опухолей // Практическая онкология, 2015. Т. 16, № 1. С. 6-12. [Moiseenko V.M., Volkov N.M. The most important events in the oncology in 2014: cancer immunotherapy. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology*, 2015, Vol. 16, no. 1, pp. 6-12. (In Russ.)]
3. Нетёсов С.В., Кочнева Г.В., Локтев В.Б., Святченко В.А., Сергеев А.Н., Терновой В.А., Тикунова Н.В., Шишкина Л.Н., Чумаков П.М. Онколитические вирусы: достижения и проблемы // Медицинский алфавит, 2011. № 3. С. 26-33. [Netesov S.V., Kochneva G.V., Loktev V.B., Sviatchenko V.A., Sergeev A.N., Ternovoi V.A., Tikunova N.V., Shishkina L.N., Chumakov P.M. Oncolytic viruses: achievements and problems. *Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet*, 2011, no. 3, pp. 26-33. (In Russ.)]
4. Румянцев А.А., Тюляндин С.А. Эффективность ингибиторов контрольных точек иммунного ответа в лечении солидных опухолей // Практическая онкология, 2016. Т. 17, № 2. С. 74-89. [Rumyantsev A.A., Tyulandin S.A. Efficacy of immune checkpoints inhibitors in the treatment of solid tumors. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology*, 2016, Vol. 17, no. 2, pp. 74-89. (In Russ.)]
5. Aarntzen E.H.J.G., De Vries I.J.M., Lesterhuis W.J., Schuurhuis D., Jacobs J.F.M., Bol K., Schreiber G., Mus R., De Wilt J.H.W., Haanen J.B.A.G., Schadendorf D., Croockewit A., Blokx W.A.M., Van Rossum M.M., Kwok W.W., Adema G.J., Punt C.J.A., Figdor C.G. Targeting CD4⁺ T-helper cells improves the induction of antitumor responses in dendritic cell-based vaccination. *Cancer Res.*, 2013, Vol. 73, no. 1, pp. 19-29.
6. Alkassar M., Gartner B., Roemer K., Graesser F., Rommelaere J., Kaestner L., Haeckel I., Graf N. The combined effects of oncolytic reovirus plus Newcastle disease virus and reovirus plus parvovirus on U87 and U373 cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurooncol.*, 2011, Vol. 104, no. 3, pp. 715-727.
7. Andtbacka R.H.I., Kaufman H.L., Collichio F., Amatruda T., Senzer N., Chesney J., Delman K.A., Spitler L.E., Puzanov I., Agarwala S.S., Milhem M., Cranmer L., Curti B., Lewis K., Ross M., Guthrie T., Linette G.P., Daniels G.A., Harrington K., Middleton M.R., Miller W.H., Zager J.S., Ye Y., Yao B., Li A., Doleman S., VanderWalde A., Gansert J., Coffin R.S. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2015, Vol. 33, no. 25, pp. 2780-2788.
8. Antony G.K., Dudek A.Z. Interleukin 2 in cancer therapy. *Curr. Med. Chem.*, 2010, Vol. 17, no. 29, pp. 3297-3302.
9. Bei R., Scardino A. TAA polyepitope DNA-based vaccines: a potential tool for cancer therapy. *J. Biomed. Biotech.*, 2010, Vol. 2010, p. 102758.
10. Breitbach C.J., Arulanandam R., De Silva N., Thorne S.H., Patt R., Daneshmand M., Moon A., Ilkow C., Burke J., Hwang T.-H., Heo J., Cho M., Chen H., Angarita F.A., Addison C., McCart J.A., Bell J.C., Kirn D.H. Oncolytic vaccinia virus disrupts tumor-associated vasculature in humans. *Cancer Res.*, 2013, Vol. 73, no. 4, pp. 1265-1275.
11. Breitbach C.J., Lichty B.D., Bell J.C. Oncolytic viruses: therapeutics with an identity crisis. *EBioMedicine*, 2016, Vol. 9, pp. 31-36.
12. Brentjens R.J., Davila M.L., Riviere I., Park J., Wang X., Cowell L.G., Bartido S., Stefanski J., Taylor C., Olszewska M., Borquez-Ojeda O., Qu J., Wasielewska T., He Q., Bernal Y., Rijo I. V., Hedvat C., Kobos R., Curran K., Steinherz P., Jurcic J., Rosenblat T., Maslak P., Frattini M., Sadelain M. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 177, p. 177ra38.
13. Capasso C., Hirvinen M., Garofalo M., Romaniuk D., Kuryk L., Sarvela T., Vitale A., Antopolsky M., Magarkar A., Viitala T., Suutari T., Bunker A., Yliperttula M., Urtti A., Cerullo V. Oncolytic adenoviruses coated with MHC-I tumor epitopes increase the antitumor immunity and efficacy against melanoma. *Oncoimmunology*, 2016, Vol. 5, no. 4, p. e1105429.
14. Chiocca E.A., Rabkin S.D. Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2, no. 4, pp. 295-300.
15. Cinatl J.J., Michaelis M., Driever P.H., Cinatl J., Hrabeta J., Suhan T., Doerr H.W., Vogel J.-U. Multimutated herpes simplex virus g207 is a potent inhibitor of angiogenesis. *Neoplasia*, 2004, Vol. 6, no. 6, pp. 725-735.

16. Diaconu I., Cerullo V., Hirvinen M.L.M., Escutenaire S., Ugolini M., Pesonen S.K., Bramante S., Parviainen S., Kanerva A., Loskog A.S.I., Eliopoulos A.G., Pesonen S., Hemminki A. Immune response is an important aspect of the antitumor effect produced by a CD40L-encoding oncolytic adenovirus. *Cancer Res.*, 2012, Vol. 72, no. 9, pp. 2327-2338.
17. Dizon D.S., Krilov L., Cohen E., Gangadhar T., Ganz P.A., Hensing T.A., Hunger S., Krishnamurthi S.S., Lassman A.B., Markham M.J., Mayer E., Neuss M., Pal S.K., Richardson L.C., Schilsky R., Schwartz G.K., Spriggs D.R., Villalona-Calero M.A., Villani G., Masters G. Clinical Cancer Advances 2016: Annual report on progress against cancer from the American Society Of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.*, 2016, Vol. 34, no. 9, pp. 987-1011.
18. Doniņa S., Strēle I., Proboka G., Auziņš J., Alberts P., Jonsson B., Venskus D., Muceniece A. Adapted ECHO-7 virus Rigvir immunotherapy (oncolytic virotherapy) prolongs survival in melanoma patients after surgical excision of the tumour in a retrospective study. *Melanoma Res.*, 2015, Vol. 25, no. 5, pp. 421-426.
19. Farkona S., Diamandis E.P., Blasutig I.M. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Medicine*, 2016, Vol. 14, pp. 73.
20. Flamand V., Sornasse T., Thielemans K., Demanet C., Leo O., Urbain J., Moser M. Vaccination with tumor-antigen-pulsed dendritic cells induces *in vivo* resistance to a B cell lymphoma. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1993, Vol. 329, pp. 611-616.
21. Freytag S.O., Stricker H., Lu M., Elshaikh M., Aref I., Pradhan D., Levin K., Kim J.H., Peabody J., Siddiqui F., Barton K., Pegg J., Zhang Y., Cheng J., Oja-Tebbe N., Bourgeois R., Gupta N., Lane Z., Rodriguez R., DeWeese T., Movsas B. Prospective randomized phase 2 trial of intensity modulated radiation therapy with or without oncolytic adenovirus-mediated cytotoxic gene therapy in intermediate-risk prostate cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2014, Vol. 89, no. 2, pp. 268-276.
22. Galanis E., Hartmann L.C., Cliby W.A., Long H.J., Peethambaram P.P., Barrette B.A., Kaur J.S., Haluska P.J.J., Aderca I., Zollman P.J., Sloan J.A., Keeney G., Atherton P.J., Podratz K.C., Dowdy S.C., Stanhope C.R., Wilson T.O., Federspiel M.J., Peng K.-W., Russell S.J. Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res.*, 2010, Vol. 70, no. 3, pp. 875-882.
23. Garnett C.T., Greiner J.W., Tsang K.-Y., Kudo-Saito C., Grosenbach D.W., Chakraborty M., Gulley J.L., Arlen P.M., Schlom J., Hodge J.W. TRICOM vector based cancer vaccines. *Curr. Pharm. Des.*, 2006, Vol. 12, no. 3, pp. 351-361.
24. Goldenberg M.M. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin. Ther.*, 1999, Vol. 21, no. 2, pp. 309-318.
25. Gross G., Eshhar Z. Therapeutic potential of T cell chimeric antigen receptors (CARs) in cancer treatment: Counteracting Off-Tumor toxicities for safe CAR T cell therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2016, Vol. 56, pp. 59-83.
26. Gulley J.L., Arlen P.M., Tsang K.-Y., Yokokawa J., Palena C., Poole D.J., Remondo C., Cereda V., Jones J.L., Pazdur M.P., Higgins J.P., Hodge J.W., Steinberg S.M., Kotz H., Dahut W.L., Schlom J. Pilot study of vaccination with recombinant CEA-MUC-1-TRICOM poxviral-based vaccines in patients with metastatic carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2008, Vol. 14, no. 10, pp. 3060-3069.
27. Gulley J.L., Madan R.A., Tsang K.Y., Jochems C., Marte J.L., Farsaci B., Tucker J.A., Hodge J.W., Liewehr D.J., Steinberg S.M., Heery C.R., Schlom J. Immune impact induced by PROSTVAC (PSA-TRICOM), a therapeutic vaccine for prostate cancer. *Cancer Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2, no. 2, pp. 133-141.
28. Gyure L.A., Barfoot R., Denham S., Hall J.G. Immunity to a syngeneic sarcoma induced in rats by dendritic lymph cells exposed to the tumour either *in vivo* or *in vitro*. *Br. J. Cancer*, 1987, Vol. 55, no. 1, pp. 17-20.
29. Heo J., Reid T., Ruo L., Breitbach C.J., Rose S., Bloomston M., Cho M., Lim H.Y., Chung H.C., Kim C.W., Burke J., Lencioni R., Hickman T., Moon A., Lee Y.S., Kim M.K., Daneshmand M., Dubois K., Longpre L., Ngo M., Rooney C., Bell J.C., Rhee B.-G., Patt R., Hwang T.-H., Kirn D.H. Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat. Med.*, 2013, Vol. 19, no. 3, pp. 329-336.
30. Heron M., Tejada-Vera B. Deaths: leading causes for 2005. *Natl. Vital Stat. Rep.*, 2009, Vol. 58, no. 8, pp. 1-97.
31. Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F., Weber R.W., Sosman J.A., Haanen J.B., Gonzalez R., Robert C., Schadendorf D., Hassel J.C., Akerley W., van den Eertwegh A.J., Lutzky J., Lorigan P., Vaubel J.M., Linette G.P., Hogg D., Ottensmeier C.H., Lebbé C., Peschel C., Quirt I., Clark J.I., Wolchok J.D., Weber J.S., Tian J., Yellin M.J., Nichol G.M., Hoos A., Urban W.J. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2010, Vol. 363, no. 8, pp. 711-723.
32. Hoyer S., Prommersberger S., Pfeiffer I.A., Schuler-Thurner B., Schuler G., Dörrie J., Schaft N. Concurrent interaction of DCs with CD4(+) and CD8(+) T cells improves secondary CTL expansion: It takes three to tango. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 12, pp. 3543-3559.

33. Iurescia S., Fioretti D., Fazio V.M., Rinaldi M. Epitope-driven DNA vaccine design employing immunoinformatics against B-cell lymphoma: a biotech's challenge. *Biotechnol. Adv.*, 2011, Vol. 30, no. 1, pp. 372-383.
34. Jähnisch H., Füßel S., Kiessling A., Wehner R., Zastrow S., Bachmann M., Rieber E.P., Wirth M.P., Schmitz M. Dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer. *Clin. Dev. Immunol.*, 2010, Vol. 2010, pp. 517493.
35. Jeanbart L., Swartz M.A. Engineering opportunities in cancer immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, Vol. 112, no. 47, pp. 14467-14472.
36. June C.H. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J. Clin. Invest.*, 2007, Vol. 117, no. 6, pp. 1466-1476.
37. Kanerva A., Nokisalmi P., Diaconu I., Koski A., Cerullo V., Liikanen I., Tahtinen S., Oksanen M., Heiskanen R., Pesonen S., Joensuu T., Alanko T., Partanen K., Laasonen L., Kairemo K., Pesonen S., Kangasniemi L., Hemminki A. Antiviral and antitumor T-cell immunity in patients treated with GM-CSF-coding oncolytic adenovirus. *Clin. Cancer Res.*, 2013, Vol. 19, no. 10, pp. 2734-2744.
38. Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Ann. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 26, pp. 677-704.
39. Kirn D. Replication-selective oncolytic adenoviruses: virotherapy aimed at genetic targets in cancer. *Oncogene*, 2000, Vol. 19, no. 56, pp. 6660-6669.
40. Kleijn A., Kloezevan J., Treffers-Westerlaken E., Fulci G., Leenstra S., Dirven C., Debets R., Lamfers M. The *in vivo* therapeutic efficacy of the oncolytic adenovirus Delta24-RGD is mediated by tumor-specific immunity. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 5, pp. e97495.
41. Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Feldman S.A., Wilson W.H., Spaner D.E., Maric I., Stetler-Stevenson M., Phan G.Q., Hughes M.S., Sherry R.M., Yang J.C., Kammula U.S., Devillier L., Carpenter R., Nathan D.-A.N., Morgan R.A., Laurencot C., Rosenberg S.A. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 12, pp. 2709-2720.
42. Kuryk L., Haavisto E., Garofalo M., Capasso C., Hirvinen M., Pesonen S., Ranki T., Vassilev L., Cerullo V. Synergistic anti-tumor efficacy of immunogenic adenovirus ONCOS-102 (Ad5/3-D24-GM-CSF) and standard of care chemotherapy in preclinical mesothelioma model. *Int. J. Cancer*, 2016, Vol. 139, no. 8, pp. 1883-1893.
43. Lamers C.H., Sleijfer S., van Steenbergen S., van Elzakker P., van Krimpen B., Groot C., Vulto A., den Bakker M., Oosterwijk E., Debets R., Gratama J.W. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Mol. Ther.*, 2013, Vol. 21, no. 4, pp. 904-912.
44. Lamers C.H.J. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous t-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: First Clinical Experience. *J. Clin. Oncol.*, 2006, Vol. 24, no. 13, pp. e20-e22.
45. Larkin J., Chiarion-Sileni V., Gonzalez R., Grob J.J., Cowey C.L., Lao C.D., Schadendorf D., Dummer R., Smylie M., Rutkowski P., Ferrucci P.F., Hill A., Wagstaff J., Carlino M.S., Haanen J.B., Maio M., Marquez-Rodas I., McArthur G.A., Ascierto P.A., Long G.V., Callahan M.K., Postow M.A., Grossmann K., Sznol M., Dreno B., Bastholt L., Yang A., Rollin L.M., Horak C., Hodi F.S., Wolchok J.D. Combined Nivolumab and Ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2015, Vol. 373, no. 1, pp. 23-34.
46. Levy B., Panicalli D., Marshall J. TRICOM: enhanced vaccines as anticancer therapy. *Expert Rev. Vaccines*, 2004, Vol. 3, no. 4, pp. 397-402.
47. Liang M. Clinical development of oncolytic viruses in China. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2012, Vol. 13, no. 9, pp. 1852-1857.
48. Lichty B.D., Breitbach C.J., Stojdl D.F., Bell J.C. Going viral with cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer.*, 2014, Vol. 14, no. 8, pp. 559-567.
49. Markert J.M., Razdan S.N., Kuo H.-C., Cantor A., Knoll A., Karrasch M., Nabors L.B., Markiewicz M., Agee B.S., Coleman J.M., Lakeman A.D., Palmer C.A., Parker J.N., Whitley R.J., Weichselbaum R.R., Fiveash J.B., Gillespie G.Y. A phase 1 trial of oncolytic HSV-1, G207, given in combination with radiation for recurrent GBM demonstrates safety and radiographic responses. *Mol. Ther.*, 2014, Vol. 22, no. 5, pp. 1048-1055.
50. Maude S.L., Frey N., Shaw P.A., Aplenc R., Barrett D.M., Bunin N.J., Chew A., Gonzalez V.E., Zheng Z., Lacey S.F., Mahnke Y.D., Melenhorst J.J., Rheingold S.R., Shen A., Teachey D.T., Levine B.L., June C.H., Porter D.L., Grupp S.A. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2014, Vol. 371, no. 16, pp. 1507-1517.
51. Maude S.L., Teachey D.T., Porter D.L., Grupp S.A. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2015, Vol. 125, no. 26, pp. 4017-4023.

52. McDermott D., Haanen J., Chen T.-T., Lorigan P., O'Day S. Efficacy and safety of ipilimumab in metastatic melanoma patients surviving more than 2 years following treatment in a phase III trial (MDX010-20). *Ann. Oncol.*, 2013, Vol. 24, no. 10, pp. 2694-2698.
53. Melief C.J.M., van Hall T., Arens R., Ossendorp F., van der Burg S.H. Therapeutic cancer vaccines. *J. Clin. Invest.*, 2015, Vol. 125, no. 9, pp. 3401-3412.
54. Mellman I., Coukos G., Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 2011, Vol. 480, no. 7378, pp. 480-489.
55. Metcalf D. The colony-stimulating factors and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2010, Vol. 10, no. 6, pp. 425-434.
56. Morgan R.A., Chinnasamy N., Abate-Daga D., Gros A., Robbins P.F., Zheng Z., Dudley M.E., Feldman S.A., Yang J.C., Sherry R.M., Phan G.Q., Hughes M.S., Kammula U.S., Miller A.D., Hessman C.J., Stewart A.A., Restifo N.P., Quezado M.M., Alimchandani M., Rosenberg A.Z., Nath A., Wang T., Bielekova B., Wuest S.C., Akula N., McMahon F.J., Wilde S., Mosetter B., Schendel D.J., Laurencot C.M., Rosenberg S.A. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J. Immunother.*, 2013, Vol. 36, no. 2, pp. 133-151.
57. Morgan R.A., Yang J.C., Kitano M., Dudley M.E., Laurencot C.M., Rosenberg S.A. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol. Ther.*, 2010, Vol. 18, no. 4, pp. 843-851.
58. Murphy G., Tjoa B., Ragde H., Kenny G., Boynton A. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate*, 1996, Vol. 29, no. 6, pp. 371-380.
59. Nazarkina Z.K., Khar'kova M.V., Antonets D.V., Morozkin E.S., Bazhan S.I., Karpenko L.I., Vlasov V.V., Ilyichev A.A., Laktionov P.P. Design of polyepitope DNA vaccine against breast carcinoma cells and analysis of its expression in dendritic cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2016, Vol. 160, no. 4, pp. 486-490.
60. Nishio N., Diaconu I., Liu H., Cerullo V., Caruana I., Hoyos V., Bouchier-Hayes L., Savoldo B., Dotti G. Armed oncolytic virus enhances immune functions of chimeric antigen receptor-modified T cells in solid tumors. *Cancer Res.*, 2014, Vol. 74, no. 18, pp. 5195-5205.
61. Palucka K., Banchereau J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity*, 2013, Vol. 39, no. 1, pp. 38-48.
62. Pardoll D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2012, Vol. 12, no. 4, pp. 252-264.
63. Parker B.S., Rautela J., Hertzog P.J. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2016, Vol. 16, no. 3, pp. 131-144.
64. Parkhurst M.R., Yang J.C., Langan R.C., Dudley M.E., Nathan D.-A.N., Feldman S.A., Davis J.L., Morgan R.A., Merino M.J., Sherry R.M., Hughes M.S., Kammula U.S., Phan G.Q., Lim R.M., Wank S.A., Restifo N.P., Robbins P.F., Laurencot C.M., Rosenberg S.A. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol. Ther.*, 2011, Vol. 19, no. 3, pp. 620-626.
65. Pesonen S., Diaconu I., Cerullo V., Escutenaire S., Raki M., Kangasniemi L., Nokisalmi P., Dotti G., Guse K., Laasonen L., Partanen K., Karli E., Haavisto E., Oksanen M., Karioja-Kallio A., Hannuksela P., Holm S.-L., Kauppinen S., Joensuu T., Kanerva A., Hemminki A. Integrin targeted oncolytic adenoviruses Ad5-D24-RGD and Ad5-RGD-D24-GMCSF for treatment of patients with advanced chemotherapy refractory solid tumors. *Int. J. Cancer*, 2012, Vol. 130, no. 8, pp. 1937-1947.
66. Pol J., Buqué A., Aranda F., Bloy N., Cremer I., Eggermont A., Erbs P., Fucikova J., Galon J., Limacher J.M., Preville X., Sautès-Fridman C., Spisek R., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L. Trial Watch – Oncolytic viruses and cancer therapy. *OncoImmunology*, 2016, Vol. 5, no. 2, e1117740.
67. Pol J.G., Zhang L., Bridle B.W., Stephenson K.B., Rességuier J., Hanson S., Chen L., Kazhdan N., Bramson J.L., Stojdl D.F., Wan Y., Lichty B.D. Maraba virus as a potent oncolytic vaccine vector. *Mol. Ther.*, 2014, Vol. 22, no. 2, pp. 420-429.
68. Postow M.A., Chesney J., Pavlick A.C., Robert C., Grossmann K., McDermott D., Linette G.P., Meyer N., Giguere J.K., Agarwala S.S., Shaheen M., Ernstoff M.S., Minor D., Salama A.K., Taylor M., Ott P.A., Rollin L.M., Horak C., Gagnier P., Wolchok J.D., Hodi F.S. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2015, Vol. 372, no. 21, pp. 2006-2017.
69. Ranki T., Joensuu T., Jäger E., Karbach J., Wahle C., Kairemo K., Alanko T., Partanen K., Turkki R., Linder N., Lundin J., Ristimäki A., Kankainen M., Hemminki A., Backman C., Diemel K., von Euler M., Haavisto E., Hakonen T., Juhila J., Jaderberg M., Priha P., Vassilev L., Vuolanto A., Pesonen S. Local treatment of a pleural mesothelioma tumor with ONCOS-102 induces a systemic antitumor CD8(+) T-cell response, prominent infiltration of CD8(+) lymphocytes and Th1 type polarization. *Oncoimmunology*, 2014, Vol. 3, no. 10, e958937.

70. Ranki T., Pesonen S., Hemminki A., Partanen K., Kairemo K., Alanko T., Lundin J., Linder N., Turkki R., Ristimäki A., Jäger E., Karbach J., Wahle C., Kankainen M., Backman C., von Euler M., Haavisto E., Hakonen T., Heiskanen R., Jäderberg M., Juhila J., Priha P., Suoranta L., Vassilev L., Vuolanto A., Joensuu T. Phase I study with ONCOS-102 for the treatment of solid tumors – an evaluation of clinical response and exploratory analyses of immune markers. *J. Immunother. Cancer*, 2016, Vol. 4, p. 17.
71. Reed C.M., Cresce N.D., Mauldin I.S., Slingluff C.L., Olson W.C. Vaccination with melanoma helper peptides induces antibody responses associated with improved overall survival. *Clin. Cancer Res.*, 2015, Vol. 21, no. 17, pp. 3879-3887.
72. Robert C., Ribas A., Wolchok J.D., Hodi F.S., Hamid O., Kefford R., Weber J.S., Joshua A.M., Hwu W.J., Gangadhar T.C., Patnaik A., Dronca R., Zarour H., Joseph R.W., Boasberg P., Chmielowski B., Mateus C., Postow M.A., Gergich K., Ellassaïss-Schaap J., Li X.N., Iannone R., Ebbinghaus S.W., Kang S.P., Daud A. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet*, 2014, Vol. 384, no. 9948, pp. 1109-1117.
73. Roulstone V., Twigger K., Zaidi S., Pencavel T., Kyula J.N., White C., McLaughlin M., Seth R., Karapanagiotou E.M., Mansfield D., Coffey M., Nuovo G., Vile R.G., Pandha H.S., Melcher A.A., Harrington K.J. Synergistic cytotoxicity of oncolytic reovirus in combination with cisplatin-paclitaxel doublet chemotherapy. *Gene Ther.*, 2013, Vol. 20, no. 5, pp. 521-528.
74. Sadelaar M., Brentjens R., Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov.*, 2013, Vol. 3, no. 4, pp. 388-398.
75. Schreibelt G., Bol K.F., Westdorp H., Wimmers F., Aarntzen E.H.J.G., Duiveman-de Boer T., van de Rakt M.W.M.M., Scharenborg N.M., de Boer A.J., Pots J.M., Olde Nordkamp M.A.M., van Oorschot T.G.M., Tel J., Winkels G., Petry K., Blokx W.A.M., van Rossum M.M., Welzen M.E.B., Mus R.D.M., Croockewit S.A.J., Koornstra R.H.T., Jacobs J.F.M., Kelderman S., Blank C.U., Gerritsen W.R., Punt C.J.A., Figdor C.G., de Vries I.J.M. Effective clinical responses in metastatic melanoma patients after vaccination with primary myeloid dendritic cells. *Clin. Cancer Res.*, 2016, Vol. 22, no. 9, pp. 2155-2166.
76. Sennikov S.V., Shevchenko J.A., Kurilin V.V., Khantakova J.N., Lopatnikova J.A., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Bakulina A.Y., Sidorov S.V., Khristin A.A., Maksyutov A.Z. Induction of an antitumor response using dendritic cells transfected with DNA constructs encoding the HLA-A*02:01-restricted epitopes of tumor-associated antigens in culture of mononuclear cells of breast cancer patients. *Immunol. Res.*, 2016, Vol. 64, no. 1, pp. 171-180.
77. Sharma P., Allison J.P. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell*, 2015, Vol. 161, no. 2, pp. 205-214.
78. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J. Clin.*, 2015, Vol. 65, no. 1, pp. 5-29.
79. Skelding K.A., Barry R.D., Shafren D.R. Enhanced oncolysis mediated by Coxsackievirus A21 in combination with doxorubicin hydrochloride. *Invest. New Drugs*, 2012, Vol. 30, no. 2, pp. 568-581.
80. Tagliamonte M., Petrizzo A., Tornesello M.L., Buonaguro F.M., Buonaguro L. Antigen-specific vaccines for cancer treatment. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2014, Vol. 10, no. 11, pp. 3332-3346.
81. Trakatelli M., Tougouz M., Lambermont M., Heenen M., Velu T., Bruyns C. Immune characterization of clinical grade-dendritic cells generated from cancer patients and genetically modified by an ALVAC vector carrying MAGE minigenes. *Cancer Gene Ther.*, 2005, Vol. 12, no. 6, pp. 552-559.
82. Triozzi P.L., Strong T. V., Bucy R.P., Allen K.O., Carlisle R.R., Moore S.E., Lobuglio A.F., Conry R.M. Intratumoral administration of a recombinant canarypox virus expressing interleukin 12 in patients with metastatic melanoma. *Hum. Gene Ther.*, 2005, Vol. 16, no. 1, pp. 91-100.
83. Tsun A., Miao X.N., Wang C.M., Yu D.C. Oncolytic immunotherapy for treatment of cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2016, Vol. 909, pp. 241-283.
84. Van Tendeloo V.F., Van de Velde A., Van Driessche A., Cools N., Anguille S., Ladell K., Gostick E., Vermeulen K., Pieters K., Nijs G., Stein B., Smits E.L., Schroyens W.A., Gadisseur A.P., Vrelust I., Jorens P.G., Goossens H., de Vries I.J., Price D.A., Oji Y., Oka Y., Sugiyama H., Berneman Z.N. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, no. 31, pp. 13824-13829.
85. Villalona-Calero M.A., Lam E., Otterson G.A., Zhao W., Timmons M., Subramaniam D., Hade E.M., Gill G.M., Coffey M., Selvaggi G., Bertino E., Chao B., Knopp M. V. Oncolytic reovirus in combination with chemotherapy in metastatic or recurrent non-small cell lung cancer patients with KRAS-activated tumors. *Cancer*, 2016, Vol. 122, no. 6, pp. 875-883.
86. Weber J.S., Yang J.C., Atkins M.B., Disis M.L. Toxicities of immunotherapy for the practitioner. *J. Clin. Oncol.*, 2015, Vol. 33, no. 18, pp. 2092-2099.

87. Whisenhunt T.R.J., Rajneesh K.F., Hackney J.R., Markert J.M. Extended disease-free interval of 6 years in a recurrent glioblastoma multiforme patient treated with G207 oncolytic viral therapy. *Oncolytic Virotherapy*, 2015, Vol. 4 pp. 33-38.
88. Wimmers F., Schreibelt G., Sköld A.E., Figdor C.G., De Vries I.J.M. Paradigm shift in dendritic cell-based immunotherapy: From *in vitro* generated monocyte-derived DCs to naturally circulating DC subsets. *Front. Immunol.*, 2014, no. 5, p. 165.
89. Woller N., Gürlevik E., Fleischmann-Mundt B., Schumacher A., Knocke S., Kloos A.M., Saborowski M., Geffers R., Manns M.P., Wirth T.C., Kubicka S., Kühnel F. Viral Infection of Tumors Overcomes Resistance to PD-1-immunotherapy by Broadening Neoantigenome-directed T-cell Responses. *Mol. Ther.*, 2015, Vol. 23, no. 10, pp. 1630-1640.
90. Yong R.L., Shinojima N., Fueyo J., Gumin J., Vecil G.G., Marini F.C., Bogler O., Andreeff M., Lang F.F. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer Res.*, 2009, Vol. 69, no. 23, pp. 8932-8940.
91. Yoon A.-R., Hong J., Yun C.-O. A vesicular stomatitis virus glycoprotein epitope-incorporated oncolytic adenovirus overcomes CAR-dependency and shows markedly enhanced cancer cell killing and suppression of tumor growth. *Oncotarget*, 2015, Vol. 6, no. 33, pp. 34875-34891.

Авторы:

Непомнящих Т.С. — к.б.н., старший научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Антонец Д.В. — к.б.н., старший научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Максютов Р.А. — к.б.н., врио генерального директора ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Authors:

Nepomnyashchikh T.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Welfare, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Antonets D.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Welfare, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Maksyutov R.A., PhD (Biology), Acting General Director, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Welfare, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Поступила 22.09.2016
Принята к печати 28.09.2016

Received 22.09.2016
Accepted 28.09.2016

ПРОТИВОРАКОВАЯ ДНК-ВАКЦИНАЦИЯ: ПРИНЦИП И ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА

Стёганцева М.В., Мелешко А.Н.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, д. Боровляны, Минская обл., Республика Беларусь

Резюме. Традиционные методы лечения онкологических заболеваний приближаются к пределу своей эффективности. Стремительное развитие иммунологии и экспериментальной иммунотерапии привело к первым успехам вакцинации против опухолей. Последняя декада знаменательна переходом вакцинации из лаборатории в онкологическую клинику и ростом популярности ДНК-вакцин. На сегодняшний день накоплен большой массив экспериментальных данных и результатов клинических испытаний, связанных с разнообразными способами получения и применения ДНК-вакцин. В данном обзоре рассмотрены принципы получения ДНК-вакцин, разнообразие их конструкций, механизм действия, формы и способы доставки в организм.

Ключевые слова: онкология, иммунотерапия, антигены, вакцина, противоопухолевый иммунитет

ANTICANCER DNA VACCINATION: PRINCIPLE AND PERSPECTIVES OF THE METHOD

Stegantseva M.V., Meleshko A.N.

Belarussian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany Village, Minsk Region, Republic of Belarus

Abstract. Conventional strategies for cancer treatment are close to their efficiency limits. Meanwhile, rapid development of experimental immunology and immunotherapy led to first successful experiences in antitumor vaccination. Over last decade, remarkable results were obtained by means of anticancer vaccination being implemented into clinical settings thus causing popularity and growth of interest to tumor-specific DNA vaccines. In this review, we discuss basic principles of a DNA vaccine construction, their structural characteristics and diversity, mechanisms of their biological action, pharmaceutical forms and delivery routes into the body.

Keywords: oncology, immunotherapy, antigens, vaccine, antitumor immunity

Проблема терапии онкологических заболеваний занимает важное место в сфере здравоохранения. Традиционные методы лечения включают химиотерапию цитостатическими и таргетными препаратами, хирургию и лучевую терапию.

Эффективность такого лечения зависит от типа опухоли, стадии и доступности терапевтических средств. В большинстве случаев традиционных методов оказывается недостаточно для достижения длительной ремиссии, и лечение сопро-

Адрес для переписки:

Стёганцева Мария Владимировна
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии
223053, Республика Беларусь, Минская обл., д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43.
Тел.: +375 (29) 374-77-09.
Факс: +375 (17) 265-42-22.
E-mail: stsegantsevam@gmail.com

Address for correspondence:

Stegantseva Maria V.
Belarussian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology
223053, Republic of Belarus, Minsk Region, Borovlyany Village, Frunzenskaya str., 43.
Phone: +375 (29) 374-77-09.
Fax: +375 (17) 265-42-22.
E-mail: stsegantsevam@gmail.com

Образец цитирования:

М.В. Стёганцева, А.Н. Мелешко «Противораковая ДНК-вакцинация: принцип и возможности метода» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 145–156.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-145-156

© Стёганцева М.В., Мелешко А.Н., 2017

For citation:

M.V. Stegantseva, A.N. Meleshko "Anticancer DNA vaccination: principle and perspectives of the method", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 145–156. doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-145-156

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-2-145-156

воздаётся серьезными побочными эффектами. В связи с этим остается необходимость в новых стратегиях лечения, способах увеличения продолжительности и качества жизни. Одно из наиболее активно развивающихся направлений представляет иммунотерапия. Наиболее важным преимуществом иммунотерапии перед традиционными методами лечения является минимальное проявление побочных эффектов при достаточно высокой эффективности [72]. Основной целью данного вида лечения является задействование ресурсов собственной иммунной системы, ее активация и направленное на опухоль специфическое действие. За последние два десятилетия сформировалось множество направлений иммунотерапии. Выделяют пассивную иммунотерапию антителами, иммунотоксинами и биспецифическими антителами [20], относимую также к таргетной терапии; иммуномодуляцию, цитокинотерапию [3], лектины [2]; клеточную терапию, включающую НК-клетки, ЛАК-терапию [7] и адаптивный перенос донорских лимфоцитов (DLI) [18]. Наконец, активная иммунотерапия, включающая различные варианты вакцинации, искусственные антигенпрезентирующие клетки [17], генетически модифицированные лимфоциты (T-CAR) [29].

Противоопухолевые вакцины в зависимости от формы антигена можно разделить на клеточные, белковые и ДНК-вакцины. Клеточные вакцины подразумевают использование ослабленных, разрушенных или даже генно-модифицированных аутологичных опухолевых клеток, а также дендритных клеток [50]. Наиболее исследуемыми являются аутологичные дендритные клетки (ДК), которые могут быть «нагружены» любым антигенным белком или опухолевым лизатом *ex vivo*, а затем перелиты обратно пациенту, где они мигрируют в лимфоузел и презентуют таргетный антиген Т-лимфоцитам [14].

Белковые и пептидные препараты вакцин получают из материала опухоли, но чаще используют рекомбинантные белки или синтетические пептиды [46]. Их вводят в виде белковых конъюгатов или в составе с адъювантом. Наконец, ДНК-вакцины представляют собой генетические конструкции (плазмиды), кодирующие определенный антиген. Экспрессия антигенного белка в этом случае происходит в организме после вакцинации. Особенности, механизм действия и способы доставки ДНК-вакцин рассматриваются в этом обзоре.

Опухоль-ассоциированные антигены

Опухолевые антигены — это белки, экспрессия которых формирует уникальный фенотип опухолевых клеток и/или не свойственна нормальным клеткам. Антигены, пригодные для вакцинации, должны распознаваться цитотоксическими Т-лимфоцитами, однако это зависит от природы

антигена. Они могут обладать высокой или низкой опухолевой специфичностью [13].

К антигенам с высокой специфичностью относятся вирусные антигены, продукты мутированных генов, а также антигены, экспрессирующиеся в зародышевых центрах. Вирусы часто являются причиной возникновения опухоли, соответственно, вирусные белки экспрессируются опухолевыми клетками и могут распознаваться Т-лимфоцитами как чужеродные [70]. Примером может служить вирус папилломы человека (ВПЧ), ассоциированный с рядом онкологических заболеваний (рак яичников, шейки матки, гепатокарцинома и т.д.), антигены которого являются приоритетной мишенью для вакцинации. Мутации в генах, в частности в онкосупрессорах, приводят к смещению рамки считывания и синтезу белка, обладающего антигенными свойствами и являющегося потенциальной мишенью для CD8⁺Т-лимфоцитов [38]. К этой же группе можно отнести транслокации между генами с образованием химерного транскрипта, который кодирует абсолютно новый белок с полезными для опухоли свойствами (BCR-ABL, TEL-AML1) [75, 76]. К высокоспецифичным антигенам также относятся зародышевые антигены из нескольких семейств MAGE, BAGE, GAGE, LAGE (NY-ESO1) и SSX. Все они располагаются на X-хромосоме и экспрессируются в норме только в зародышевых клетках и клетках трофобласта [19]. Их высокая экспрессия в опухолевых клетках связана с деметилированием промоторов данных генов и является характерной для многих солидных опухолей [63].

К антигенам с низкой специфичностью относятся дифференцировочные антигены и гены с aberrантной экспрессией [70]. Представители данной группы не могут считаться истинными антигенами из-за своей аутологичной природы. Дифференцировочные антигены происходят от белков, которые экспрессируются как в опухоли, так и в соответствующей здоровой ткани. Большинство идентифицированных дифференцировочных антигенов найдены в клетках меланомы и вовлечены в синтез меланина. К ним относятся gp100, MelanA/MART-1, gp75, TRP2 и др. [78]. Антигены, которые характеризуются опухоль-специфической повышенной экспрессией по сравнению со здоровыми тканями, также представляются потенциальными кандидатами для вакцинации. Например, клетки нейробластомы характеризуются повышенной экспрессией генов тирозин гидроксилазы и Survivin (BIRC-5) [5], а многие эпителиальные опухоли отличаются сверхэкспрессией гена эпителиального фактора роста ERBB2 [27]. Наибольшую сложность составляет определение того пограничного уровня экспрессии между нормальными и опухолевыми клетками, с которого начинается распознавание

Т-лимфоцитами. Значительным недостатком низкоспецифических антигенов является наличие аутоиммунных осложнений, как результата развития специфического иммунного ответа.

Основы противоопухолевого иммунитета

Противоопухолевый иммунитет включает те же клетки и механизмы, что и противовирусный иммунитет. Иммунологическое распознавание опухолевых клеток опосредовано рецепторами Т-лимфоцитов при презентации опухолевых антигенов в составе комплекса МНС-I или II классов. Эффекторное звено противоопухолевого иммунитета включает продукцию антител В-клетками, цитокинов группы Th1, а также активацию цитотоксических CD8-лимфоцитов. В отличие от противoinфекционного иммунитета, иммунитет против опухоли, как правило, подавлен и не эффективен. Причинами этого являются: центральная толерантность лимфоцитов к аутологичным антигенам; снижение экспрессии молекул МНС опухолевыми клетками [30], а также активной иммуносупрессией, вызванной самой опухолью [73].

Согласно теории «иммунного редактирования» (immunoediting), в противоопухолевом иммунном ответе можно выделить три стадии: элиминация, равновесие и избегание [66]. Первый этап предполагает распознавание антигена и его полное уничтожение. Сканирование клеток на признаки перерождения осуществляется совместно компонентами врожденного и приобретенного иммунитета. Представители адаптивного звена CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) распознают антигены, связанные с МНС I класса, который экспрессируется практически на всех ядерных клетках, и реагируют на видоизмененные собственные антигены. Данный механизм может быть неэффективен в случае, когда опухолевые клетки имеют тот же спектр антигенной экспрессии и фенотипически не отличаются от нормальных, в результате, в силу ауто толерантности иммунитета, злокачественные клетки принимаются за свои и игнорируются. Клетки же с отличным от здоровых антигенным репертуаром (мутационные изменения, аберрантная экспрессия) зачастую характеризуются низкой экспрессией молекул МНС I класса, которая достигается нарушением процесса сборки функциональной молекулы, а также процессинга антигена [43]. Натуральные киллеры (NK), клетки врожденного иммунитета, в свою очередь, распознают отсутствие на поверхности клеток «своих» МНС-I, а также активаторных молекул MICA, MICB, Ulbp-1,2,3. В ответ опухолевые клетки начинают экспрессировать неклассические молекулы МНС-I — HLA-E, которые оказывают ингибирующее действие, а в растворимой форме приводят к дистанционной активации NK-клеток [33]. В таком случае происходит неполная элиминация

опухолевых клеток, и система переходит в фазу равновесия, когда скорость роста опухоли только сдерживается иммунной системой. В этот период злокачественные клетки накапливают мутации, и под давлением иммунитета отбираются наиболее полезные из них, позволяющие ингибировать активность иммунных клеток [35]. В результате наступает стадия избегания, когда иммунная система больше не в состоянии сдерживать прогрессию опухоли.

Первые эксперименты по вакцинации против опухоли были сомнительны, но широкое развитие экспериментальных моделей позволило достичь терапевтической эффективности. Накопленные экспериментальные данные позволяют выделить те условия, выполнение которых позволяет преодолеть иммунологическую толерантность опухоли:

1. Наличие сильных (доминантных) эпитопов МНС-I в составе антигена [54].
2. Активация врожденного иммунитета для обеспечения костимуляции [15].
3. Привлечение дендритных клеток, макрофагов, или доставка вакцины в локусы антигенпрезентирующих клеток.
4. Обеспечение надежной помощи Т-хэлперов 1 типа за счет структуры вакцины и содержание в ней эпитопов распознавания МНС-II [54, 56].

Все эти аспекты учитываются в конструкции ДНК-вакцины и выборе способа ее доставки.

ДНК-вакцины: принцип и история создания

Родоначальниками ДНК-вакцинации принято считать Tang и коллег, которые в 1992 году показали, что инъекция плазмиды, содержащей гормон роста человека, способна вызывать гуморальный иммунный ответ против гормона, что свидетельствует о том, что ДНК может быть использована для индукции специфического иммунного ответа [67]. С этого момента мировое научное сообщество захлестнула волна исследований, которая имела два доминирующих течения: противoinфекционная и противораковая вакцинация. В рамках противораковой вакцинации намечались две стратегии: первая подразумевала поддержание собственного иммунитета посредством внесения генов активирующих цитокинов (IL-2, IL-12) [12], вторая же была нацелена на индукцию гуморального и клеточного иммунитета против вносимого антигена [12, 52]. Уже в 1994 году начались клинические испытания генетических вакцин против меланомы и других солидных опухолей [25]. За последние два десятилетия данная отрасль науки существенно обогатилась, и на сегодняшний день ДНК-вакцина представляет собой сложную многокомпонентную генетическую конструкцию, каждое звено которой выполняет определенную функцию.

Как же устроена ДНК-вакцина? «Костяк» конструкции представлен плазмидным век-

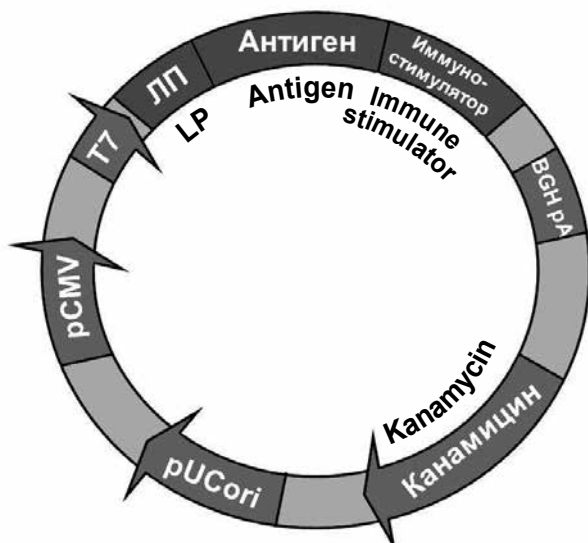


Рисунок 1. Схематическое изображение ДНК-вакцины
Примечание. ЛП – лидерный пептид, BGH pA – сайт полиаденилирования, pUCori – точка начала репликации, pCMV – эукариотический промотор, T7 – бактериальный промотор.

Figure 1. Schematic view of DNA vaccine

Note. LP, leader peptide; BGH pA, polyadenylation site; pUCori, replication starting point; pCMV, eukaryotic promoter; T7, bacterial promoter.

тором, в который по рестрикционным сайтам встроена полноразмерная кДНК интересующего нас опухолевого антигена или ее часть (рис. 1). Важными составляющими самого вектора являются наличие мощного промотора, который обеспечит длительную экспрессию трансгена, например промотор цитомегаловируса (pCMV), наличие точек начала репликации для бактерий (pUCori) и эукариот (SV40 ori), а также ген устойчивости к антибиотику для селекции клонов. Наиболее часто используется селекция по канамицину и ампициллину. Самыми распространенными векторами являются pING, pcDNA3 (3.1) и pCMV. Существует ряд требований и к встраиваемой кДНК. Безусловно, она должна начинаться со старт-кодона (ATG) и заканчиваться одним из терминирующих кодонов (TAG, TAA). Иногда рекомендуют достраивать несколько стоп-кодонов подряд, чтобы транскрипция наверняка закончилась в конце кодируемого гена. Следует учитывать также тот факт, что в самом транскрипте может содержаться несколько старт-кодонов, и чтобы трансляция началась именно с первого, его обозначают консенсусной последовательностью Козак, которая является важным элементом для инициации трансляции. Для обеспечения проникновения ДНК-вакцины в ядро клетки, часто к конструкции «пришивают» пептид ядерной локализации, который распознается транспортными системами клетки [77].

Индукция антительного иммунного ответа существенно усиливается для секретируемых белков. Для этого в состав конструкции иногда включают лидерный пептид, который способствует транспорту таргетного белка из клетки [56].

В последнее время популярностью пользуются мультиэпитопные конструкции [9], которые содержат несколько опухоль-ассоциированных антигенов, и последовательность иммуностимулятора для усиления иммуногенности, и/или ген цитокина, который должен задавать направление развитию иммунного ответа. Зачастую используют IL-2 и IL-12 для сдвига иммунного ответа в сторону Th1 [21]. Такое разнообразие компонентов вакцины и позволяет ей индуцировать полноценный специфический иммунный ответ против опухоли.

Механизм действия ДНК-вакцин

Механизм действия ДНК-вакцин до сих пор до конца не изучен и зависит от множества факторов: компонентов вакцины, пути введения, носителей ДНК, локализации антигена и др. После инъекции препарата ДНК попадает в межклеточное пространство и может трансфектировать либо стромальные клетки, либо напрямую проникать в местные профессиональные антигенпрезентирующие клетки (пАПК), например ДК. Наиболее распространенным путем проникновения нуклеиновых кислот в клетку является эндоцитоз, в результате чего образуется эндосома с pH = 6. Данная среда не является разрушительной для генетического материала, и, прежде чем эндосома сольется с лизосомой, ДНК высвобождается из везикулы и мигрирует в ядро, избегая тем самым ферментативного разрушения [37]. В ядре происходит транскрипция закодированного антигена и высвобождение транслированного белка в цитоплазму или секреция его из клетки, в зависимости от того, как это предусмотрено конструкцией вакцины. Цитоплазматический белок с большей вероятностью будет презентирован в составе МНС-I, секреторный – поглощаться другими клетками и презентирован в составе МНС-II. Несмотря на стремление достичь с помощью вакцинации цитотоксического иммунного ответа против внутриклеточных белков, секреторные антигены более эффективны в дизайне ДНК-вакцин, так как вовлекают больше клеток в контакт с белком [54]. В случае ДК это приводит к их созреванию и миграции в близлежащий лимфатический узел, где и происходит презентация антигена «наивным» CD8⁺Т-лимфоцитам. Однако, прямая трансфекция ДК плазмидной ДНК редкое событие, наиболее вероятна активация АПК через стромальные клетки. Клетки стромы, например мышечные клетки, могут высвобождать наработанный Ag во внеклеточное пространство, где он поглощается ДК и, как экзогенный Ag, пре-

зентрируется в составе МНС-II класса «наивным» $CD4^+$ Т-лимфоцитам. В зависимости от спектра цитокинов в микроокружении и костимуляторных сигналов от ДК $CD4^+$ Т-лимфоциты могут дифференцироваться в различные подтипы хелперных клеток (Th). Фолликулярные Th праймируют В-лимфоциты к переходу в плазматические клетки, а спектр продуцируемых ими цитокинов может влиять на переключение изотипов антител (Аг). Под действием интерлейкина-12 (IL-12), гамма-интерферона ($IFN\gamma$) и интерферонов I типа ($IFN-I$) $CD4^+$ Т-клетки дифференцируются в Th 1 типа (Th1), которые, в свою очередь, продуцируют $IFN\gamma$ и IL-2. Первый служит медиатором воспаления и аттрактантом для новых иммунных клеток, а второй является главным активатором $CD8^+$ Т-лимфоцитов [16]. Кроме того, ДК способны презентировать экзогенный Аг, полученный от близлежащих клеток, в комплексе с МНС-I класса $CD8^+$ Т-лимфоцитам. Это возможно благодаря явлению под названием «кросс-презентация» [24, 55]. Одним из главных индукторов кросс-презентации является $IFN-I$, секретируемый стромальными клетками при поглощении Аг [16].

Важным компонентом ДНК-вакцины, способным вызывать активацию врожденного иммунитета, является наличие патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP, от англ. Pathogen associated molecular patterns), а именно не метилированные CpG динуклеотиды, которые с высокой плотностью содержатся в вирусной и бактериальной ДНК и, в частности, в плазмидной ДНК (пДНК). Они обеспечивают первый «сигнал угрозы», который получает иммунная система при инфекции. Эти сигнальные участки детектируются рецептором TLR9, расположенным в стромальных и дендритных клетках [32]. В связи с тем что врожденный иммунитет развивается значительно быстрее и стимулирует адаптивный иммунный ответ, целесообразным является искусственное внесение в ДНК-конструкцию дополнительных CpG нуклеотидов, а также использование в качестве адъювантов генов вирусных частиц.

Кроме самого опухоль-ассоциированного антигена, в конструкцию могут быть закодированы гены различных цитокинов и хемокинов, что позволит создать первоначальное микроокружение и направить развитие ИО. На сегодняшний день для доклинических исследований применяют ДНК-вакцины с IL-2 [45], IL-12 [65], MIP3A [49], GM-CSF [6] и др. Другим способом стимуляции иммунного ответа является включение ксеногенной последовательности бактериального или вирусного белка, содержащего сильные эпитопы МНС-II для распознавания $CD4$ -лимфоцитами. Наиболее часто используют фрагмент С столбнячного токсина (FrCTT) [53], реже исполь-

зуют другие гены: GFP, белок капсида вируса Х-картофеля (PVXCP) [57].

Теоретически мультикомпонентные ДНК-вакцины должны вызывать полноценный иммунный ответ, однако большое значение имеет место введения препарата. Среди наиболее часто описанных можно выделить: внутривенный, внутримышечный, внутрикожный и доставка к слизистым. Преимущества внутривенного введения заключаются в быстром распределении вакцины по организму и контакте с большим количеством иммунных клеток. В то же время кровь является достаточно агрессивной средой для плазмидной ДНК, которая быстро деградирует под действием ферментов. Недостатком внутримышечной доставки пДНК является отсутствие на поверхности миоцитов важных костимуляторных молекул, необходимых для успешной презентации антигена в комплексе с МНС-I класса $CD8^+$ Т-лимфоцитам [62]. Комплексообразование Аг с МНС-II класса также затруднено, т.к. в мышечной ткани ДК и резидентные макрофаги встречаются довольно редко. Тем не менее принято полагать, что сама по себе инъекция вызывает образование воспалительного инфильтрата, который несет пАПК, поглощающие Аг. С этой точки зрения наиболее удачным является внутрикожное введение, в связи с тем, что оно является первым защитным барьером на пути чужеродных микроорганизмов и содержит большое количество макрофагов, или клеток Лангерганса [1]. То же можно отнести и к доставке вакцин к слизистым оболочкам. Самыми популярными на сегодняшний день являются вагинальная, интраназальная и слизистая оболочка рта и кишечника [48].

Отдельно следует отметить два инновационных пути введения ДНК-вакцин: внутрь опухоли (интратуморально) [51] и в близлежащий к опухоли лимфоузел [28, 64]. Оба метода имеют высокую эффективность по сравнению с более стандартными, но при этом связаны с рядом неудобств. Так, опухоль не всегда выступает над поверхностью тела и визуальна доступна, а инъекция в лимфоузел должна проводиться под контролем УЗИ.

Преимущества и недостатки ДНК-вакцин

ДНК-вакцинация, как и любой вид терапии, имеет свои преимущества и недостатки (табл. 1). ДНК как материал вакцины обеспечивает ее безопасность и минимальные проявления побочных эффектов, связанных в основном с кодируемым антигеном. Процесс производства вакцины прост, экономичен и обеспечивает должную чистоту конечного продукта, что сокращает нежелательные иммунные реакции, в отличие, например, от белковых вакцин, производство и очистка которых весьма затратна. ДНК обладает достаточно высокой стабильностью и не требует особых условий содержания, что облегчает

транспортировку и хранение вакцины. Главным преимуществом ДНК-вакцины является пластичность ее дизайна, т.к. компоненты можно менять и комбинировать в зависимости от целей исследования методами генной инженерии. Конструкция может включать один или несколько антигенов, гены-костимуляторы, различные регуляторные элементы, а также кодировать белки, определяющие транспортировку и метаболизм экспрессируемого антигена. Стоит также отметить, что специфический антиген, закодированный в виде молекулы ДНК, внутри клетки будет подвергнут такому же гликозилированию и посттрансляционным модификациям, как и «родные» белки. Благодаря такому многообразию компонентов ДНК-вакцина может индуцировать клеточное и гуморальное звено как адаптивного, так и врожденного иммунитета [74].

Главным и, пожалуй, единственным существенным недостатком ДНК-вакцин является низкая иммуногенность, которая обусловлена рядом причин. Часть пДНК разрушается в межклеточном пространстве. Молекулы ДНК несут отрицательный заряд, что препятствует их проникновению через положительно заряженную липидную мембрану клетки. В случае успешного эндоцитоза пДНК попадает в эндосому, рН которой постоянно падает, соответственно,

высвобождение из эндосомы является важным фактором на пути достижения ядра [37]. Несмотря на такое количество препятствий, даже введение «голой» пДНК доказало свою эффективность в доклинических исследованиях [26]. В связи с этим основные усилия исследователей направлены на разработку способов повышения иммуногенности ДНК-вакцин путем облегчения внутриклеточного трафика и создания микроокружения, способствующего быстрому реагированию иммунной системы.

Способы доставки ДНК-вакцин

Одним из методов усиления эффективности ДНК-вакцинации является подбор оптимального способа доставки. За последний десяток лет предложено множество носителей пДНК, которые способны не только «провести» вакцину в ядро клетки, но и обеспечить ей дополнительную иммуногенность. Согласно природе каждого из переносчиков нуклеиновых кислот, их можно разделить на химические, физические и биологические (табл. 2).

Первая группа химических носителей, которые могут быть как синтетическими, так и природными соединениями, представлена катионными полимерами, такими как полиэтиленимин (ПЭИ), полилизин, хитозан, и др. Механизм их действия заключается в наличии высокой кон-

ТАБЛИЦА 1. ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ДНК-ВАКЦИН

TABLE 1. BENEFITS AND LIMITATIONS OF DNA VACCINES

Преимущества Benefits	Характеристика Characteristics	Недостатки Limitations
Безопасность Safety	Побочных эффектов на данный момент в ходе клинических испытаний не выявлено, биodeградируемы, не токсичны No side effects are revealed during clinical trials so far, biodegradable, non-toxic	Не известны последствия длительной персистенции чужеродного генетического материала в организме Lack of information on the long-term consequences of foreign genetic substance in the body
Простота в изготовлении и экономичность Simplicity of production and low-cost procedures	Дизайн конструкции полностью зависит от цели исследования и может включать несколько антигенов, гены-костимуляторы, регуляторные элементы Design of the genetic construct entirely depends on the purpose of the study which may include several antigens, costimulator genes, regulatory elements	Для достижения напряженного иммунитета требуется несколько инъекций Several injections are required to develop efficient immune response
Иммуногенность Immunogenicity	Индукуют как врожденный, так и приобретенный иммунитет (клеточный и гуморальный) The DNA vaccines induce both innate and adaptive immunity (i.e., cellular and humoral response)	Необходимо использование иммуностимуляторов Immunostimulatory agents should be used
Стабильность Stability	Высокая термоустойчивость, длительное время экспрессии High thermostability, long-term expression	Легко разрушаются в межклеточном пространстве и внутриклеточно Prone to degradation both in extracellular space and intracellularly

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ МЕТОДОВ ДОСТАВКИ ДНК-ВАКЦИН
TABLE 2. CHARACTERISTICS OF DELIVERY TECHNIQUES FOR DNA-BASED VACCINES

Группа Class of methods	Метод Method	Решаемые проблемы Problems resolved	Побочные эффекты Side effects
Химические Chemical	Катионные полимеры Cationic polymers	Облегчают транспорт через мембрану клетки Easier transportation via cell membrane Высвобождение из эндосомы Endosomal release Защищают от нуклеаз Nuclease protection Увеличивают цитоплазматическую мобильность Higher cytoplasmic mobility Низкая стоимость Low costs	Микротромбы при системном введении Microthrombi arise upon systemic injections Лимфопения Lymphopenia Повышения уровня печеночных ферментов, некроз печени Increased liver enzymes in serum, liver necrosis Некоторые представители не биodeградируемы Some species are bio-nondegradable Дозозависимая токсичность Dose-dependent toxicity
	Липиды Lipids	Высокий процент комплексования с ДНК High-rate complexing with DNA Облегчают транспорт через мембрану клетки Easier transportation via cell membrane Высвобождение из эндосомы (некоторые) Endosomal release (in some models) Биodeградируемы Biodegradable	Токсичны Toxicity problems
Биологические Biological	Аттенуированные бактерии Attenuated bacteria	Прямая доставка в клетки хозяина Direct delivery to the host cells Предохраняет от деградации Prevents from degradation Активируют врожденный и адаптивный иммунитет Activation of innate and adaptive immunity	Побочные эффекты (диарея) Side effects (diarrhea)
	«Тени» «Cell ghosts»	Обладают тропностью к АПК Exhibit tropicity for antigen-presenting cells (APC) Предохраняет от деградации Prevent from degradation Активируют врожденный и адаптивный иммунитет Activation of innate and adaptive immunity	Не описаны Not described
Физико-механические Physico-mechanical	Баллистическая трансфекция (генная пушка) Ballistic transfection (gene gun)	Прямая трансфекция АПК и сателлитных клеток Direct transfection of APC and satellite cells Эффективно в низких концентрациях Effective at low concentrations	Дискомфорт во время процедуры Discomfort during the procedure
	Электропорация Electroporation	Прямая трансфекция АПК и сателлитных клеток Direct transfection of APC and satellite cells Эффективно в низких концентрациях Effective at low concentrations Возможность использования нескольких эпитопов для вакцинации An opportunity for several epitopes participating in vaccination Невысокая стоимость Reasonable costs	Дискомфорт во время процедуры Discomfort during the procedure
	Татуаж Tattooing	Большая площадь поверхности Big vaccination area Формирование «сигналов угрозы» Formation of «alert (threat) signals»	Дискомфорт во время процедуры Discomfort during the procedure

центрации положительно заряженных атомов азота, которые способны электростатически связывать отрицательно заряженные фосфатные группы нуклеиновых кислот [31]. Это приводит к конденсации ДНК и образованию так называемого полиплекса. Все потенциальные катионные переносчики, кроме ПЭИ, показали незначительную эффективность даже *in vitro*, т.к. последний характеризуется наибольшей плотностью заряда и высокой степенью комплексования с ДНК [23]. Образование положительно заряженного полиплекса облегчает проникновение пДНК через отрицательно заряженную фосфолипидную мембрану, защищает от эндонуклеаз в цитоплазме клетки, а также обеспечивает избежание эндосомального лизиса, т.к. ПЭИ выступает в роли акцептора протонов. Имеются сведения, что полимер может взаимодействовать с фибриллами актина, изменяя структуру цитоскелета, тем самым увеличивая проницаемость ядерной мембраны для крупных молекул. При всех своих преимуществах ПЭИ имеет ряд существенных недостатков. Во-первых, он не подвергается метаболизму и, соответственно, не выводится из организма, а накапливается в печени, что может приводить к повышению уровня печеночных ферментов, а в высоких дозах к некрозу печени [10]. При системном введении ПЭИ многократно усиливает адгезивную способность лейкоцитов за счет повышения экспрессии рецептора CD11b, а также приводит к агрегации тромбоцитов и микротромбам [10].

В связи с высокой трансфецирующей активностью ПЭИ ученые пытаются преодолеть его негативные свойства. Для вакцинации предлагается использование линейного ПЭИ с низкой молекулярной массой (8-25 kDa), обладающего наименьшей токсичностью [36]. Проведен ряд исследований по созданию биodeградируемых форм ПЭИ за счет присоединения к нему другого соединения посредством соответствующих химических групп: эстеразной, дисульфидной, амидной и др. [8]. Также используется создание вокруг полиплекса микросферы, которая сможет экранировать его от внешней среды, предотвращая побочные эффекты. Kodama et al. предложили комплексовать ПЭИ/ДНК с полинуклеотидами, среди которых полицитидиновая кислота (PolyC) оказалась наиболее эффективной [34]. Также полиплексы «одевают» в полиэтиленгликоль (ПЭГ), фолат-ПЭГ и др. [59].

Ко второй группе химических носителей относятся катионные липиды. Принцип их действия такой же, как и у катионных полимеров. За счет электростатического взаимодействия образуется комплекс липид/ДНК, или липоплекс [39]. Преимущества липидных носителей заключается в высокой степени комплексования

с пДНК независимо от ее количества, в отличие от, например, ПЭИ, значительная часть которого остается в несвязанном состоянии и может повреждать клетки [31]. Все используемые для ДНК-трансфекции липиды отличаются только катионной группой головки, линкером и липофильным хвостом молекулы — три главные структуры, которые всегда присутствуют в липидах, используемых для трансфекции. Среди наиболее исследованных можно выделить 1,2-диолеил-3-триметиламониум (DOTAP) [11]. Катионные липиды часто используются в комбинации с нейтральными вспомогательными липидами, такими как L-альфа-диолеилфосфатидилэтаноламин или холестерол, для усиления трансфецирующих способностей комплекса [79]. Существенным недостатком липидов является их токсичность.

С целью преодолеть недостатки данных методов ученые разрабатывают все более сложные и многофункциональные конструкции для доставки ДНК. Так, Veiman et al. сконструировали вектор для доставки, который подразумевает комплекс ДНК с белком, обеспечивающим проникновение в клетку (cell penetrating peptide), и с субстратом для металлопротеиназ, которые должны разъединить комплекс. Все это «одеют» в микросферу из ПЭГ. Показано, что данный вектор усиливает экспрессию антигена преимущественно в опухолевых клетках, избегая нормальных тканей [68].

Также стоит отметить одну из последних разработок по доставке ДНК на основе липидов — солидные липидные наночастицы (СЛН) [44]. Они усиливают доставку в АПК, обеспечивают проникновение комплекса в клетку, а также защищают его от деградации. Это коллоидные системы, которые состоят из физиологически адаптированных компонентов. Они имеют крайне низкую степень токсичности и показывают отличные результаты в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. СЛН являются одними из наночастиц, одобренных для клинического применения на людях [59].

Биологические способы доставки ДНК-вакцин представлены генно-модифицированными и аттенуированными бактериями, а также их оболочками. Данный метод представляется очень перспективным, т.к. сами по себе бактерии являются очень сильным триггером для иммунной системы и вызывают развитие как гуморального, так и клеточного иммунитета. Кроме того, некоторые бактерии способны доставлять антиген напрямую в клетки. Суть данного процесса заключается в том, что бактерия, несущая трансген, проникает в клетку хозяина, зачастую АПК, где вокруг нее формируется лизосома. Бактерия разрушается, высвобождая плазмиду в цитоплазму клетки. Затем пДНК мигрирует в ядро, где и происходит транскрипция и последующая

трансляция интересующего нас белка. К наиболее используемым для вакцинации внутриклеточным патогенным микроорганизмам относятся *Salmonella* и *Listeria monocytogenes* [47, 60], в отдельных случаях испытывали *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* и *E. coli* [40, 61]. Достоинствами такого способа доставки вакцин является прямая доставка в клетки-мишени, защита от нуклеаз и лизосомальных ферментов. Бактерии — это природные носители РАР, что модулирует врожденный и запускает адаптивный иммунитет [48].

Физико-механические способы доставки включают достаточно дорогостоящие и порой болезненные методы, по эффективности сопоставимые с химическими. Основной целью данных методов является прямая трансфекция АПК. В случае «генной пушки» пДНК комплексируется с золотыми микрочастицами, которые под действием сжатого гелия бомбардируют эпидермис, пробивая клетки Лангерганса. Согласно последним исследованиям данный метод более эффективен, нежели внутримышечные инъекции [41].

Электропорация (ЭП) применяется как для внутрикожной, так и для внутримышечной доставки. ЭП использует короткие электрические импульсы для дестабилизации клеточной мембраны. Это приводит к фазовым переходам мембраны и образованию транзиторных пор, которые позволяют макромолекулам, таким как ДНК, проникать внутрь клетки [22]. Электротрансфекция мышечных клеток более продуктивна по сравнению с кожей, т.к. экспрессия трансгена продолжается до нескольких месяцев

вместо нескольких недель. Это обусловлено скоростью обновления клеток. В целом электропорация представляется довольно перспективным направлением, и разработано уже несколько коммерческих систем, применяемых для проведения клинических исследований: DERMA VAX™, TriGrid и др.

Одним из новых веяний в области ДНК-вакцин является татуаж для внутрикожной доставки препарата. Verstrepen et al. показали эффективность данной методики в исследованиях на мышах и не человекообразных приматах. Иммуногенность такого рода доставки, вероятно, обусловлена «сигналами угрозы», которые формируются в результате механического повреждения кожи татуировочной иглой. На данный момент проходят клинические испытания, которые должны показать, насколько эффективна данная методика применительно к людям [69].

Среди прочих следует упомянуть такие методы, как Jet-инжекторы, ультразвук и микроиглы [58, 71].

Заключение

На протяжении уже двух десятков лет продолжают исследования ДНК-вакцин. Многочисленные клинические испытания подтверждают целесообразность и рентабельность их использования. Ввиду значительных преимуществ ДНК-вакцин необходимы дальнейшие исследования по повышению иммуногенности данного вида иммунотерапии.

Список литературы / References

1. Попов Ю.А., Микшис Н.И. Генетические (ДНК) вакцины // Проблемы особо опасных инфекций, 2010. Т. 105. С. 20-24. [Popov Yu.A., Mikshis N.I. Genetic (DNA) vaccines. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Plague Problems*, 2010, Vol. 105, pp. 20-24. (In Russ.)]
2. Южакова Д.В., Ширманова М.В., Сергеева Т.Ф., Загайнова Е.В., Лукьянов К.А. Иммуноterapia злокачественных новообразований // Современные технологии в медицине, 2016. Т. 8, № 1. С. 173-182. [Yuzhakova D.V., Shirmanova M.V., Sergeeva T.F., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A. Immunotherapy of Cancer. *Sovremennyye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2016, Vol. 8, no. 1, pp. 173-182. (In Russ.)]
3. Ardolino M., Hsu J., Raulet D.H. Cytokine treatment in cancer immunotherapy. *Oncotarget*, 2015, Vol. 6, no. 23, pp. 19346-19347.
4. Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995, Vol. 92, no. 16, pp. 7297-7301.
5. Brodeur G.M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, Vol. 3, no. 3, pp. 203-216.
6. Chang D.Z., Lomazow W., Somberg C.J., Stan R., Perales M.A. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor: an adjuvant for cancer vaccines. *Hematology*, 2004, Vol. 9, no. 3, pp. 207-215.
7. Cheng M., Chen Y., Xiao W., Sun R., Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell. Mol. Immunol.*, 2013, Vol. 10, no. 3, pp. 230-252.
8. Cho C.S. Design and development of degradable polyethylenimines for delivery of DNA and small interfering RNA. *ISRN Materials Science*, 2012, Vol. 2012, pp. 1-24.
9. Cho H.I., Celis E. Design of immunogenic and effective multi-epitope DNA vaccines for melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, Vol. 61, no. 3, pp. 343-351.
10. Chollet P., Favrot M.C., Hurbin A., Coll J.L. Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J. Gene Med.*, 2002, Vol. 4, no. 1, pp. 84-91.

11. Christensen D., Korsholm K.S., Andersen P., Agger E.M. Cationic liposomes as vaccine adjuvants. *Expert. Rev. Vaccines*, 2011, Vol. 10, no. 4, pp. 785-796.
12. Conry R.M., LoBuglio A.F., Kantor J., Schlom J., Loechel F., Moore S.E., Sumerel L.A., Barlow D.L., Abrams S., Curiel D.T. Immune response to a carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine. *Cancer. Res.*, 1994, Vol. 54, no. 5, pp. 1164-1168.
13. Coulie P.G., Eynde B.J., Bruggen P., Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2014, Vol. 14, no. 2, pp. 135-146.
14. Datta J., Terhune J.H., Lowenfeld L., Cintolo J.A., Xu S., Roses R.E., Czerniecki B.J. Optimizing dendritic cell-based approaches for cancer immunotherapy. *Yale. J. Biol. Med.*, 2014, Vol. 87, no. 4, pp. 491-518.
15. Dempsey A., Bowie A.G. Innate immune recognition of DNA: A recent history. *Virology*, 2015, Vol. 479-480, pp. 146-152.
16. Desmet C.J., Ishii K.J. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 479-491.
17. Eggermont L.J., Paulis L.E., Tel J., Figdor C.G. Towards efficient cancer immunotherapy: advances in developing artificial antigen-presenting cells. *Trends Biotechnol.*, 2014, Vol. 32, no. 9, pp. 456-465.
18. El-Jurdi N., Reljic T., Kumar A., Pidala J., Bazarbachi A., Djulbegovic B., Kharfan-Dabaja M.A. Efficacy of adoptive immunotherapy with donor lymphocyte infusion in relapsed lymphoid malignancies. *Immunotherapy*, 2013, Vol. 5, no. 5, pp. 457-466.
19. Fratta E., Corals., Covre A., Parisi G., Colizzi F., Danielli R., Nicolay H.J., Sigalotti L., Maio M. The biology of cancer testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol. Onc.*, 2011, Vol. 5, no. 2, pp. 164-182.
20. Geresu M.A., Sultan A.F., Seifudin K.A., Gezahegne M.K. Immunotherapy against cancer: A comprehensive review. *J. Cancer Res. Exp. Oncol.*, 2016, Vol. 8, no. 2, pp. 15-25.
21. Giedlin M.A. Cytokines as vaccine adjuvants: the use of interleukin-2. Ed. O'Hagan D.T. *Vaccine Adjuvants*, 2000, Vol. 42, pp. 283-297.
22. Gothelf A., Gehl J. What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2012, Vol. 8, no. 11, pp. 1694-1702.
23. Grant E.V., Thomas M., Fortune J., Klivanov A.M., Letvin N.L. Enhancement of plasmid DNA immunogenicity with linear polyethylenimine. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 11, pp. 2937-2948.
24. Heath W.R., Belz G.T., Behrens G.M., Smith C.M., Forehan S.P., Parish I.A., Davey G.M., Wilson N.S., Carbone F.R., Villadangos J.A. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol. Rev.*, 2004, Vol. 199, no. 1, pp. 9-26.
25. Hersh E.M., Akporiaye E., Harris D., Stopeck A.T., Unger E.C., Warneke J.A., Kradjian S.A. Phase I study of immunotherapy of malignant melanoma by direct gene transfer. *Hum. Gene Ther.*, 1994, Vol. 5, no. 11, pp. 1371-1384.
26. Herweijer H., Wolff J.A. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Therapy*, 2003, Vol. 10, no. 6, pp. 453-458.
27. Hynes N.E., Lane H.A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, 2005, Vol. 5, no. 7, pp. 341-354.
28. Jeanbart L., Ballester M., Titta A., Cortesy P., Romero P., Hubbell J.A., Swartz M.A. Enhancing efficacy of anticancer vaccines by targeted delivery to tumor-draining lymph nodes. *Cancer Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2, no. 5, pp. 436-447.
29. Khalil D.N., Smith E.L., Brentjens R.J., Wolchok J.D. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Onc.*, 2016, Vol. 13, no. 5, pp. 273-290.
30. Khanna R. Tumor surveillance: missing peptides and MHC molecules. *Immunol. Cell Biol.*, 1998, Vol. 76, no. 1, pp. 20-26.
31. Kichler A., Behr J.P., Erbacher P. Polyethylenimines: a family of potent polymers for nucleic acid delivery. Ed. Huang L., Hung M.C., Wagner E. *Nonviral Vectors for Gene Therapy*, 1999, pp. 191-206.
32. Kobiyama K., Jounai N., Aoshi T., Tozuka M., Takeshita F., Coban C., Ishii K.J. Innate immune signaling by and genetic adjuvants for DNA vaccination. *Vaccines*, 2013, Vol. 1, no. 3, pp. 278-292.
33. Kochan G., Escors D., Breckpot K., Guerrero-Setas D. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression. *Oncoimmunol.*, 2013, Vol. 2, no 11, pp. e26491-e26498.
34. Kodama Y., Ohkubo C., Kurosaki T., Egashira K., Sato K., Fumoto S., Nishida K., Higuchi N., Kitahara T., Nakamura T., Sasaki H. Secure and effective delivery system of plasmid dna coated by polynucleotide. *J. Drug Target.*, 2014, Vol. 23, no. 1, pp.43-51.
35. Koh Y.T., García-Hernández M.L., Kast W.M. Tumor immune escape mechanisms. Ed. Teicher B. *Cancer Drug Resistance*, 2006, pp. 577-602.
36. Kunath K., Harpe A., Fischer D., Petersen H., Bickel U., Voigt K., Kissel T. Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and *in vivo* distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J. Control. Release*, 2003, Vol. 89, no. 1, pp. 113-125.
37. Liang W., Lam K.W. Endosomal escape pathways for non-viral nucleic acid delivery systems. *J. Control. Release*, 2012, Vol. 151, no. 3, pp. 220-228.
38. Linnebacher M., Gebert J., Rudy W. Frameshift peptide derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int. J. Cancer*, 2001, Vol. 93, no. 1, pp. 6-11.

39. Ma B., Zhang S., Jiang H., Zhao B., Lu H. Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *J. Control. Release*, 2007, Vol. 123, pp. 184-194.
40. Mariri A., Tibor A., Lestrade P., Mertens P., Bolle X., Letesson J.J. *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* bacterioferritin or P39 antigen. *Infect. Immun.*, 2002, Vol. 70, no. 4, pp. 1915-1923.
41. McAllister J., Prohl D. Comparison of DNA vaccine delivery systems: intramuscular injection versus gene gun administration. *DSTO*, 2004, Vol. 0567, pp. 1-9.
42. McCreery T.P., Sweitzer R.H., Unger E.C., Sullivan S. DNA Delivery to cells *in vivo* by ultrasound gene delivery to mammalian cells. Ed. Heiser W.C. *Methods in Molecular Biology*, 2004, Vol. 245, pp. 293-298.
43. Melero I., Gaudernack G., Gerritsen W., Huber C., Parmiani G., Scholl S., Thatcher N., Wagstaff J., Zielinski C., Faulkner I., Mellstedt H. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat. Rev. Clin. Onc.*, 2014, Vol. 11, pp. 509-524.
44. Mukherjee S., Ray S., Thakur R.S. Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. *Indian J. Pharm. Sci.*, 2009, Vol. 71, no. 4, pp. 349-358.
45. Overwijk W.W., Theoret M.R., Restifo N.P. The future of interleukin-2: enhancing therapeutic anticancer vaccines. *Cancer J. Sci. Am.*, 2000, Vol. 6, no. 1, pp. S76-S80.
46. Parmiani G., Russo V., MacCalli C., Parolini D., Rizzo N., Maio M. Peptide-based vaccines for cancer therapy. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2014, Vol. 10, no. 11, pp. 3175-3178.
47. Paterson Y., Guirnalda P.D., Wood L.M. *Listeria* and *Salmonella* bacterial vectors of tumor-associated antigens for cancer immunotherapy. *Semin. Immunol.*, 2010, Vol. 22, no. 3, pp. 183-189.
48. Pereira V.B., Zurita-Turk M., Saraiva T.L., Castro C.P. DNA vaccine approach: from concepts to applications. *World J. Vaccin.*, 2014, Vol. 4, no. 2, pp. 50-71.
49. Qin H., Cha S., Neelapu S.S., Lou Y., Wei J., Liu Y.J., Kwak L.W. Vaccine site inflammation potentiates idiotype DNA vaccine-induced therapeutic T cell-, and not B cell-, dependent antilymphoma immunity. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 19, pp. 4142-4149.
50. Radhakrishnan A.K. Advances in immunotherapy using dendritic cells. *JSME*, 2012, Vol. 6, pp. 113-117.
51. Radkevich-Brown O., Piechocki M.P., Back J.B., Weise A.M., Pilon-Thomas S., Wei W.Z. Intratumoral DNA electroporation induces anti-tumor immunity and tumor regression. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2010, Vol. 59, no. 3, pp. 409-417.
52. Restifo N.P., Minev B.R., Taggarse A.S., McFarland B.J., Wang M., Irvine K.R. Enhancing the recognition of tumour associated antigens. *Folia Biol.*, 1994, Vol. 40, no. 1-2, pp. 74-88.
53. Rice J., Elliott T., Buchan S., Stevenson F.K. DNA fusion vaccine designed to induce cytotoxic T cell responses against defined peptide motifs: implications for cancer vaccines. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 3, pp. 1558-1565.
54. Rice J., Ottensmeier C.H., Stevenson F.K. DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, 2008, Vol. 8, no. 2, pp. 108-120.
55. Rock K.L., Shen L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol. Rev.*, 2005, Vol. 207, no. 1, pp. 166-183.
56. Savelyeva N., Allen A., Chotprakaikiat W., Harden E., Jobsri J., Godeseth R., Wang Y., Stevenson F., Ottensmeier C. Linked CD4 T cell help: broadening immune attack against cancer by vaccination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2016 [Epub ahead of print].
57. Savelyeva N., Zhu D., Stevenson F.K. Engineering DNA vaccines that include plant virus coat proteins. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 2003, Vol. 20, no. 1, pp. 101-116.
58. Seok H.Y., Suh H., Baek S., Kim Y.C. Microneedle applications for DNA vaccine delivery to the skin. *Methods Mol. Biol.*, 2014, Vol. 1143, pp. 141-158.
59. Shah M.A. Nanoparticles for DNA vaccine delivery. *J. Biomed. Nanotech.*, 2014, Vol. 10, no. 9, pp. 2332-2349.
60. Shahabi V., Maciag P.C., Rivera S., Wallecha A. Live, attenuated strains of *Listeria* and *Salmonella* as vaccine vectors in cancer treatment. *Bioeng. Bugs.*, 2010, Vol. 1, no. 4, pp. 235-243.
61. Shata M.T., Hone D.M. Vaccination with a *Shigella* DNA vaccine vector induces antigen-specific CD8⁺T cells and antiviral protective immunity. *J. Virol.*, 2001, Vol. 75, no. 20, pp. 9665-9670.
62. Shedlock D.J., Weiner D.B. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J. Leuk. Biol.*, 2000, Vol. 68, no. 6, pp. 793-806.
63. Sigalotti L., Fratta E., Coral S. Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.*, 2004, Vol. 64, no. 24, pp. 9167-9171.
64. Smith K.A. Multivalent immunity targeting tumor-associated antigens by intra-lymph node DNA-prime, peptide-boost vaccination. *Cancer Gene Ther.*, 2011, Vol. 18, no. 1, pp. 63-76.
65. Song K., Chang Y., Prud'homme G.J. IL-12 plasmid-enhanced DNA vaccination against carcinoembryonic antigen (CEA) studied in immune-gene knockout mice. *Gene Therapy*, 2000, Vol. 7, no. 18, pp. 1527-1535.
66. Swann J.B. Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest.*, 2007, Vol. 117, no. 5, pp. 1137-1146.
67. Tang D.C., DeVit M., Johnston S.A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*, 1992, Vol. 356, no. 6365, pp. 152-154.
68. Veiman K.L., Künnapuu K., Lehto T., Kiisholts K., Pärn K., Langel Ü., Kurrikoff K. PEG shielded MMP sensitive CPPs for efficient and tumor specific gene delivery *in vivo*. *J. Control. Release*, 2015, Vol. 209, pp. 238-247.
69. Verstrepen B.E., Bins A.D., Rollier C.S., Mooij P., Koopman G., Sheppard N.C., Sattentau Q., Wagner R., Wolf H., Schumacher T.N., Heeney J.L., Haanen J.B. Improved HIV-1 specific T-cell responses by short-interval

DNA tattooing as compared to intramuscular immunization in non-human primates. *Vaccine*, 2008, Vol. 26, no. 26, pp. 346-351.

70. Vigneron N. Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *BioMed. Res. Int.*, 2015, Vol. 2015, pp. 1-17.

71. Walther W., Fichtner I., Schlag P.M., Stein U.S. Nonviral jet-injection technology for intratumoral *in vivo* gene transfer of naked DNA. Ed. Walther W., Stein U.S. *Gene Therapy of Cancer*, 2009, Vol. 542, pp. 195-208.

72. Weir G.M., Liwski R.S., Mansour M. Immune modulation by chemotherapy or immunotherapy to enhance cancer vaccines. *Cancers*, 2011, Vol. 3, no. 3, pp. 3114-3142.

73. Whiteside T.L., Mandapathil M., Szczepanski M., Szajnik M. Mechanisms of tumor escape from the immune system: Adenosine-producing Treg, exosomes and tumor-associated TLRs. *Bull. Cancer*, 2011, Vol. 98, no. 2, pp. 25-31.

74. Williams J.A. Vector design for improved DNA vaccine efficacy, safety and production. *Vaccines*, 2013, Vol. 1, no. 3, pp. 225-249.

75. Yotnda P., Firat H., Garcia-Pons F. Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Invest.*, 1998, Vol. 101, no. 10, pp. 2290-2296.

76. Yotnda P., Garcia F., Peuchmaur M. Cytotoxic T cell response against the chimeric ETV6-AML1 protein in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Invest.* 1998, Vol. 102, no. 2, pp. 455-462.

77. Zanta M.A., Belguise-Valladier P., Behr J.P. Gene delivery: A single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *PNAS*, 1998, Vol. 96, no. 1, pp. 91-96.

78. Zeuthen J., Kirkin A.F. Recognition of human tumours: melanoma differentiation antigens. Ed. Robins R.A., Rees R.C., *Cancer Immunol.*, 2001, Vol. 30, pp 59-72.

79. Zhang S., Xu Y., Wang B., Qiao W., Liu D., Li Z. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J. Control. Release*, 2004, Vol. 100, no. 2, pp. 165-180.

Авторы:

Стёганцева М.В. — магистр биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий, Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минская обл., д. Боровляны, Республика Беларусь

Мелешко А.Н. — к.б.н., заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований, Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минская обл., д. Боровляны, Республика Беларусь

Authors:

Stegantseva M.V., MBs, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Genetic Research, Belarussian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany Village, Minsk Region, Republic of Belarus

Meleshko A.N., PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Genetic Research, Belarussian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany Village, Minsk Region, Republic of Belarus

Поступила 09.11.2016

Отправлена на доработку 24.11.2016

Принята к печати 10.12.2016

Received 09.11.2016

Revision received 24.11.2016

Accepted 10.12.2016

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ КОНЬЮГИРОВАННЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ЛИГАНДОВ И БЕЛКА-НОСИТЕЛЯ CRM197

Богомолова Е.Г.¹, Добровольская О.А.¹, Федорова Е.А.¹, Кондрашкина А.М.¹,
Колмаков Н.Н.¹, Ищук С.А.¹, Духовлинов И.В.¹, Симбирцев А.С.^{1,2}

¹ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА
России, Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика
И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В настоящее время отсутствуют эффективные средства лечения ряда социально значимых бактериальных и грибковых заболеваний. β -(1 $\rightarrow$ 3)-глюканы, то есть полисахариды, состоящие из остатков глюкозы, связанных между собой β -(1 $\rightarrow$ 3)-гликозидными связями, являются принципиальными компонентами клеточной стенки грибов и дрожжей, в том числе таких опасных возбудителей госпитальных инфекций, как *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* и других. В то же время β -(1 $\rightarrow$ 3)-глюканы отсутствуют в организме млекопитающих и человека, что делает их перспективными компонентами конъюгированных углевод-белковых вакцин для профилактики и лечения грибковых инфекций. Белок CRM197 является производным дифтерийного токсина и характеризуется единичной мутацией, а именно заменой глицина на глутаминовую кислоту в положении 52, что полностью элиминирует его токсичность. Белок CRM197 нетоксичен, тем не менее сохраняет те же воспалительные и иммуностимулирующие свойства, что и дифтерийный токсин. В настоящее время данный белок широко используется в качестве безопасного носителя в конъюгированных вакцинах. Классическим способом получения CRM197 является выделение их из лизогенных культур *Corynebacterium diphtheriae*. Альтернативой классическому способу получения CRM197 является экспрессия его гена в клетках *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens*. Преимущество использования *Escherichia coli* в качестве продуцента состоит в том, что данный метод является более простым и дешевым и позволяет получать рекомбинантный CRM197 в короткие сроки с использованием непатогенного микроорганизма. Целью данного исследования было изучение антигенной активности экспериментальных образцов конъюгированных вакцин на основе синтетических олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197 в реакции конкурентного ИФА. Двукратная иммунизация экспериментальными образцами конъюгированных вакцин на основе олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197 лабораторных мышей линии Balb/c вызывает формирование высокого титра специфических антител. Все исследованные образцы конъюгированных вакцин на основе олигоглюкозидов с различным содержанием мономерных звеньев в цепи (пентасахариды, гептасахариды, наносахариды, а также ундекасахариды) при их двукратном введении вызывали формирование у иммунизированных животных титра антител на уровне 1:51200. Высокая авидность формирующихся антител к своим олигосахаридным лигандам была показана в реакции конкурентного ИФА. Полученные данные говорят о целесообразности дальнейших доклинических исследований экспериментальных образцов конъюгированных вакцин против грибов *Candida* и *Aspergillus*, а также выбора наиболее иммуногенного и эффективного варианта вакцины из исследуемых.

Ключевые слова: конъюгированные вакцины, рекомбинантный CRM197, антигенная активность, мыши Balb/c

Адрес для переписки:

Богомолова Елена Григорьевна
ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России
197110, Россия, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7.
Тел.: 8 (921) 631-17-89.
E-mail: bogomolovaele@inbox.ru

Address for correspondence:

Bogomolova Elena G.
Research Institute of Highly Pure Biopreparations,
Russian Federal Agency for Medicine and Biology
197110 Russian Federation, St. Petersburg, Pudozhskaya str., 7.
Phone: 7 (921) 631-17-89.
E-mail: bogomolovaele@inbox.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Богомолова, О.А. Добровольская, Е.А. Федорова, А.М. Кондрашкина, Н.Н. Колмаков, С.А. Ищук, И.В. Духовлинов, А.С. Симбирцев «Изучение антигенной активности экспериментальных образцов конъюгированных вакцин на основе синтетических олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 157–164.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-157-164

© Богомолова Е.Г. и соавт., 2017

For citation:

E.G. Bogomolova, O.A. Dodrovolskaya, E.A. Fedorova, A.M. Kondrashkina, N.N. Kolmakov, S.A. Ishchuk, I.V. Dukhovlinov, A.S. Simbirtsev "Antigenic activity assays of experimental conjugate vaccines based on synthetic oligosaccharide ligands and CRM197 carrier protein", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 157–164.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-157-164

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-2-157-164

ANTIGENIC ACTIVITY ASSAYS OF EXPERIMENTAL CONJUGATE VACCINES BASED ON SYNTHETIC OLIGOSACCHARIDE LIGANDS AND CRM197 CARRIER PROTEIN

Bogomolova E.G.^a, Dodrovolskaya O.A.^a, Fedorova E.A.^a, Kondrashkina A.M.^a, Kolmakov N.N.^a, Ishchuk S.A.^a, Dukhovlinov I.V.^a, Simbirtsev A.S.^{a,b}

^a Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

^b Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. So far, there is no effective treatment for a number of socially significant bacterial and fungal diseases. β -(1 $\rightarrow$ 3) glucans are polysaccharides consisting of glucose units linked together with β -(1 $\rightarrow$ 3)-glycoside bonds. They are principal components of the fungal cell wall including such dangerous nosocomial pathogens as *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and others. At the same time, β -(1 $\rightarrow$ 3) glucans are absent in humans and other mammals, thus making them to be promising components of carbohydrate-protein conjugate vaccines for prevention and treatment of fungal infections. The CRM197 protein is a non-toxic derivative of diphtheria toxin, which is widely used as a safe carrier for conjugate vaccines. The CRM197 extraction from lysogenic *C. diphtheriae* cultures is a classic way of its production. An alternative to the classic method is a transgene-driven CRM197 protein expression in *E. coli*, *B. subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*. The advantage for using *Escherichia coli* in this case is that this method is more simple and inexpensive, and allows of producing recombinant CRM197 within short terms employing a non-pathogenic microorganism. The purpose of this study was to investigate antigenic activity in the samples of experimental conjugate vaccines based on synthetic oligosaccharide ligands and CRM197 carrier protein, by means of a competitive ELISA. A double immunization of laboratory Balb/c mice with experimental samples of conjugate vaccines based on oligosaccharide ligands and CRM197 protein caused induction of specific antibodies at high titers. All the samples of oligoglucoside-based conjugate vaccines with different contents of monomeric units (pentasaccharides, heptasaccharides, nanosaccharides, and undecasaccharides) caused the formation high antibody titer at the level 1: 51,200, following tandem injections. High avidity of antibodies to their oligosaccharide ligands was shown by competitive ELISA reaction. These data suggest a relevance of further pre-clinical trials of conjugate vaccines against *Candida* and *Aspergillus*, as well as selection of the most immunogenic and effective version of the conjugate vaccine.

Keywords: conjugate vaccines, recombinant CRM197, antigenic activity, Balb/c mice

Исследование выполнено в рамках НИОКР, выполняемых по соглашению № 14.579.21.0022 с Минобрнауки РФ о предоставлении субсидии из федерального бюджета для прикладных научных исследований по лоту шифр 2014-14-579-0001 по теме: «Разработка конъюгированных вакцин на основе синтетических углеводных лигандов против возбудителей госпитальных инфекций». Соглашение о выделении субсидий № 14.579.21.0022 от 05 июня 2014 г. Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI57914X0022.

Введение

В настоящее время отсутствуют эффективные средства лечения ряда социально значимых бактериальных и грибковых заболеваний. В случае некоторых бактериальных патогенов, плесневых грибов и дрожжей целесообразность и актуальность разработки вакцин диктуется их возрастающей резистентностью к действию антибиотиков.

Действие имеющихся вакцин против перечисленных типов патогенов во многих случаях основано на индуцировании иммунного ответа против полисахаридных антигенов, представленных на их клеточной стенке. Примерами таких вакцин являются гемофильная (педиатрическая вакцина против *Haemophilus influenza* типа b) [4], пневмококковая вакцина (олиговалентная вакцина против ряда серотипов *Streptococcus pneumoniae*) [3] и целый ряд других, являющихся ключевыми составляющими вакцинопрофилактики населения в мире. Однако многие вакцинные продукты, критически важные для отечественного здраво-

охранения, в России не производятся и представлены только зарубежными препаратами, которые к тому же не вполне отвечают современным требованиям и нуждаются в модификации. В подавляющем большинстве случаев указанные вакцины имеют в своей основе антигенные полисахариды, выделенные из бактериальных источников. Применение нативных полисахаридов для получения вакцин имеет ряд недостатков, связанных с трудностями культивирования соответствующих микроорганизмов и выделения, очистки и стандартизации полисахаридов. Кроме этого, конъюгация полисахаридов с иммуногенными белками-носителями в данном случае протекает неспецифично.

-(1 $\rightarrow$ 3)-глюканы, то есть полисахариды, состоящие из остатков глюкозы, связанных между собой -(1 $\rightarrow$ 3)-гликозидными связями, являются принципиальными компонентами клеточной стенки грибов и дрожжей, в том числе таких опасных возбудителей госпитальных инфекций, как *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* и дру-

гих. В то же время $-(1\rightarrow3)$ -глюканы отсутствуют в организме млекопитающих и человека. Все это делает $-(1\rightarrow3)$ -глюканы перспективными компонентами конъюгированных углеводов-белковых вакцин для профилактики и лечения грибковых инфекций.

$-(1\rightarrow3)$ -глюканы, в особенности выделенные из различных природных источников, могут значительно отличаться друг от друга по своей молекулярной массе, количеству и расположению разветвлений вдоль основной цепи, что существенно влияет на их вторичную и третичную структуру, растворимость в воде и другие свойства. Препараты природных $-(1\rightarrow3)$ -глюканов могут существенно варьироваться по степени чистоты и гомогенности. Это ограничивает применение природных $-(1\rightarrow3)$ -глюканов для разработки конъюгированных противогрибковых вакцин. Решением проблемы является использование синтетических олигосахаридных фрагментов $-(1\rightarrow3)$ -глюканов строго определенного строения, высокой степени чистоты и содержащих в заданном положении спейсерную группу, позволяющую проводить конъюгацию с белками-носителями разных типов специфично, контролируемо и воспроизводимо, как требует производство по стандартам GMP.

Белок CRM197 является нетоксичным производным дифтерийного токсина, характеризующимся одной мутацией, а именно заменой глицина на глутаминовую кислоту в положении 52, что нивелирует его токсичность. Данный белок, являясь нетоксичным, в то же время сохраняет те же воспалительные и иммуностимулирующие свойства, что и дифтерийный токсин, в результате чего CRM197 широко используется в качестве безопасного носителя в конъюгированных вакцинах [2]. Как и дифтерийный токсин дикого типа, CRM197 включает два домена: фрагмент А (каталитический) и фрагмент В, соединенные дисульфидным мостиком. Фрагмент В содержит субдомены, один из них связывает HB-EGF клеточный рецептор, другой участвует в процессе проникновения внутрь клетки.

Классическим способом получения CRM197 и других нетоксичных вариантов дифтерийного токсина является выделение их из лизогенных культур *Corynebacterium diphtheriae*. Альтернативой классическому способу получения CRM197 является экспрессия его гена в клетках *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* [8, 12]. Преимущество использования *Escherichia coli* в качестве продуцента состоит в том, что данный метод является более простым и дешевым и позволяет получать рекомбинантный CRM197 в короткие сроки с использованием непатогенного микроорганизма. Использование высокопродуктивного штамма-продуцента рекомбинантного белка CRM197 на основе клеток *E. coli* позволяет сократить время ферментации и получить белок с высоким выходом. Структура получаемого белка обуславливает увеличение эффективности вакцинации.

Целью данной работы было изучение антигенной активности экспериментальных образцов

конъюгированных вакцин на основе синтетических олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197 в реакции конкурентного ИФА.

Материалы и методы

1. Препараты для иммунизации

В качестве препаратов использовали экспериментальные образцы конъюгированных вакцин на основе синтетических олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197. Глюкозидные лиганды были синтезированы в ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского» РАН [11], белок получен по ранее разработанной методике в ФГУП «Государственный НИИ ОЧБ» ФМБА России [1].

2. Лабораторные животные

В экспериментах были использованы самки мышей линии BALB/c 9-12-недельного возраста в количестве 25 голов, которые содержались в стандартном виварии. Использовались мыши из питомника РАМН «Рапполово» Ленинградской области.

Животные содержались в соответствии с правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Мыши находились по 10 особей в пластиковые клетки фирмы VELAZ на подстилке из мелкой древесной стружки.

Кормление животных — дважды в день. Регламентирующий документ на содержание животных: «Лабораторные животные». — М., 2003. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и Приказу МЗ СР РФ № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

3. Иммунизация

Иммунизация животных экспериментальными образцами конъюгированных вакцин, а также контрольным препаратом осуществлялась шприцевым методом, при этом оцениваемые препараты вводились в квадрицепс левой конечности в объеме 500 мкл. После инъекции место введения обрабатывалось раствором диоксида хлора (Clidox-S; Pharmacol, Naugatuck, Conn).

Схема иммунизации предусматривала двукратное введение иммунобиологических препаратов. Повторное введение каждого препарата осуществляли спустя 14 суток после первичной иммунизации. Иммунизационная доза олигосахарида составляла 10 мкг. В качестве адъюванта использовали гель алюминия гидроксида Alhydrogel '85' 2% (Brenntag Biosector, Дания) в количестве 0,5 мл на одну инъекционную дозу.

4. Наблюдение за животными в процессе исследования

Наблюдение за животными проводилось ежедневно с начала опыта; в день введения препаратов — в течение 2 часов после инъекций. При осмотрах внимание обращали на общее состояние животных. Любые отклонения от нормального состояния фиксировали.

5. Получение материала на исследование

На четырнадцатый день после второй иммунизации осуществляли эвтаназию животных путем

эвтаназии в CO₂-камере с последующим гильотинированием и получением крови. Из цельной крови готовили сыворотки. Полученные сыворотки крови иммунизированных животных были использованы для оценки антигенной активности экспериментальных образцов конъюгированных вакцин на основе синтетических олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197 *in vitro* в реакции конкурентного ИФА.

6. Определение антигенной активности экспериментальных образцов конъюгированных вакцин на основе синтетических олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197 *in vitro* в реакции конкурентного ИФА

Для оценки антигенной активности экспериментальных образцов конъюгированных вакцин произведено определение титра антител в сыворотках крови иммунизированных животных. Для оценки рабочего титра антител сывороток иммунизированных животных 96-луночные планшеты с высокой сорбционной способностью (Greiner, Германия) были покрыты целевым антигеном (антигены для ИФА на основе синтетических олигосахаридных лигандов, конъюгированных с бычьим сывороточным альбумином), выдержаны ночь при температуре +4 °C, отмыты 3 раза 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2-7,4, 0,1% Tween 20. В лунки планшета добавили по 100 мкл 2-кратных разведений сывороток (начиная с 1:100) в блокирующем буфере (0,01М натрий фосфатном буфере, pH 7,2-7,4, 5% БСА), инкубировали в течение 2 часов при постоянном перемешивании при комнатной температуре и отмыли 3 раза 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2-7,4, 0,1% Tween 20. Далее в лунки вносили по 100 мкл конъюгата. В качестве конъюгата использовали моноклональные крысиные антимышинные IgG (Invitrogen, США) в разведении 1:1000, меченые пероксидазой хрена. После инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании, лунки планшета отмывали трижды 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2-7,4, 0,1% Tween 20. Далее в лунки вносили по 100 мкл субстрата. В качестве субстрата использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин — ТМБ (BD Bioscience). После инкубации с субстратом и остановки реакции производили учет результатов с использованием планшетного спектрофотометра при длине волны 450 нм. За рабочий титр принимали наибольшее разведение сыворотки, которое дает оптическую плотность, по крайней мере в 2 раза большую, чем сыворотка неиммунизированных мышей в том же разведении.

После определения рабочего титра сывороток иммунизированных животных, проводили конкурентный ИФА для определения антигенной активности экспериментальных образцов конъюгированных вакцин. Для этого 96-луночные планшеты с высокой сорбционной способностью (Greiner, Германия) покрывали целевым антигеном (антигены для ИФА на основе синтетических олигосахаридных лигандов, конъюгированных с бычьим сывороточным альбумином), выдерживали ночь при температуре +4 °C, отмывали

3 раза 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2-7,4, 0,1% Tween 20. Далее во все лунки вносили рабочее разведение сыворотки в 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2-7,4, 0,1% Tween 20 в объеме 90 мкл в расчете на лунку. В первые два ряда к сыворотке прибавляли 10 мкл фосфатно-солевого буфера, а в остальные опытные лунки — соответствующие исследуемые ингибиторные олигосахариды — конкурирующие антигены в концентрации 0,1, 1 или 10 мкг в расчете на лунку в фосфатно-солевом буфере. После инкубации в течение 1 ч при 37° планшеты трижды отмывали 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2-7,4, 0,1% Tween 20. Далее в лунки вносили по 100 мкл конъюгата. В качестве конъюгата использовали моноклональные крысиные антимышинные IgG (Invitrogen, США) в разведении 1:1000, меченые пероксидазой хрена. После инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании, лунки планшета трижды отмывали 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2-7,4, 0,1% Tween 20. Далее в лунки вносили по 100 мкл субстрата. В качестве субстрата использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин — ТМБ (BD Bioscience). После инкубации с субстратом и остановки реакции производили учет результатов с использованием планшетного спектрофотометра при длине волны 450 нм. Торможение (то есть ингибирование) рассчитывали по формуле: 100% — x, где 100% — оптическая плотность сыворотки (ОП450) до внесения антигена, x — активность сыворотки (%) после прибавления антигена. Чем больше уровень ингибирования, тем выше антигенная активность экспериментальных образцов конъюгированных вакцин.

Результаты

Для изучения антигенной активности экспериментального образца конъюгированной вакцины против грибов *Candida* и *Aspergillus* на основе пентасахаридного лиганда и белка-носителя CRM197 животных иммунизировали внутримышечно дважды с интервалом в две недели. В качестве адьюванта был использован гидроксид алюминия.

При двукратной внутримышечной иммунизации конъюгатом пентасахаридов и белка-носителя CRM197 лабораторных мышей линии Balb/c наблюдается формирование высокого титра антител, а именно 1:51200 (рис. 1).

В реакции конкурентного ИФА с использованием пентасахаридов в качестве ингибиторов показан уровень торможения, который составил 68% при добавлении ингибитора в концентрации 10 мкг/лунку, что говорит о высокой антигенной активности исследуемого образца конъюгированной вакцины (рис. 2).

При двукратной внутримышечной иммунизации конъюгатом гептасахаридов и белка-носителя CRM197 лабораторных мышей линии Balb/c наблюдается формирование высокого титра антител, а именно 1:51200 (рис. 3)

В реакции конкурентного ИФА с использованием гептасахаридов в качестве ингибиторов показан уровень торможения, который составил

89% при добавлении конкурента в концентрации 10 мкг/лунку, что говорит о высокой антигенной активности исследуемого образца конъюгированной вакцины (рис. 4).

Для изучения антигенной активности экспериментального образца конъюгированной вакцины против грибов *Candida* и *Aspergillus* на основе наносахаридного лиганда и белка-носителя CRM197 животных иммунизировали внутримышечно дважды с интервалом в две недели. В качестве адъюванта был использован гидроксид алюминия.

При двукратной внутримышечной иммунизации конъюгатом наносахаридов и белка-носителя CRM197 лабораторных мышей линии Balb/c наблюдается формирование высокого титра антител, а именно 1:51200 (рис. 5).

В реакции конкурентного ИФА с использованием наносахаридов в качестве ингибиторов показан уровень торможения, который 81% при добавлении его в концентрации 10 мкг/лунку, что говорит о высокой антигенной активности исследуемого образца конъюгированной вакцины (рис. 6).

При двукратной внутримышечной иммунизации конъюгатом ундекасахарида и белка-носителя CRM197 лабораторных мышей линии Balb/c наблюдается формирование высокого титра антител, а именно 1:51200 (рис. 7).

В реакции конкурентного ИФА с использованием ундекасахаридов в качестве ингибиторов показан уровень торможения, который составил 73% при добавлении ингибитора в концентрации 10 мкг/лунку, что говорит о высокой антигенной активности исследуемого образца конъюгированной вакцины (рис. 8).

Обсуждение

C. albicans является комменсалом человека, взаимодействие данного микроорганизма с иммунной системой хозяина играет важную роль как в развитии комменсализма, так и патологических состояний — инфекций. Системные кандидозы, являющиеся госпитальными инфекциями, возникают в основном вследствие таких медицинских процедур, как переливание крови, иммуносупрессивной терапии, хирургических вмешательств и использования широкого спектра антибиотиков. В последние годы проводится все больше и больше исследований, подтверждающих иммуногенность и эффективность различных разрабатываемых противокандидозных вакцин. В качестве кандидатных вакцин используют полисахариды клеточной стенки гриба, белки, а также живые аттенуированные штаммы *Candida* [10].

Исследуемая кандидатная конъюгированная углевод-белковая вакцина, описанная в данной работе, имеет ряд преимуществ по сравнению с вакцинами на основе полисахаридов. Вакцины на основе полисахаридов эффективны для формирования защиты взрослых от бактериальных инфекций, однако они не столь эффективны в случае группы риска, к которой относятся младенцы, дети раннего возраста, пожилые и люди с ослабленным иммунитетом [5]. Конъюгирование полисахаридных компонентов вакцин

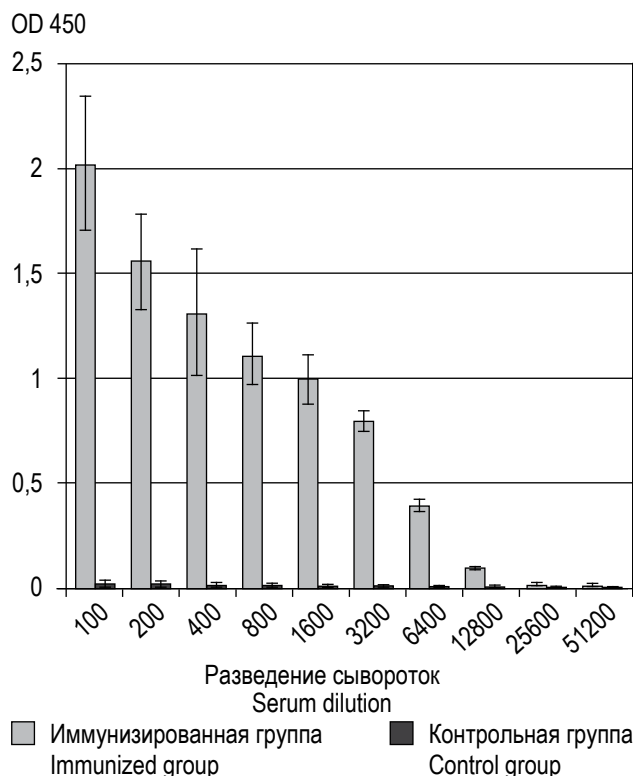


Рисунок 1. Диаграмма титра антител сывороток животных, иммунизированных конъюгатом пентасахаридного лиганда и белка-носителя CRM197

Figure 1. Diagram of serum antibody titers in the animals immunized with a conjugate of pentasaccharide ligand and CRM197 carrier protein

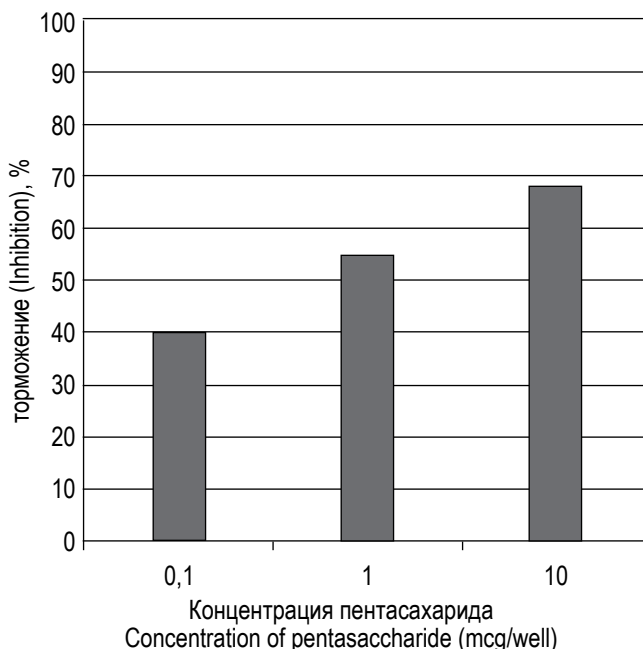


Рисунок 2. Диаграмма торможения конкурентного ИФА при добавлении различных концентраций пентасахарида

Figure 2. Diagram of competitive ELISA inhibition at different pentasaccharide concentrations

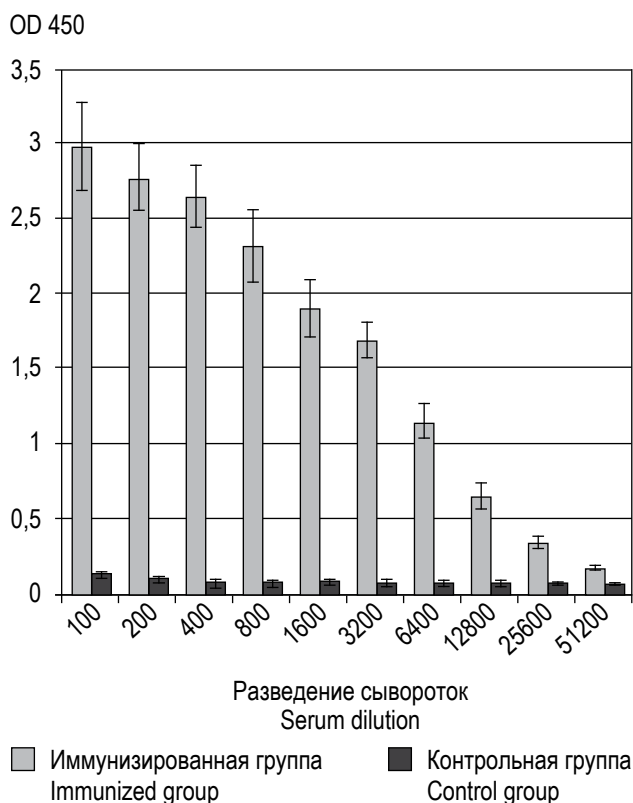


Рисунок 3. Диаграмма титра антител сывороток животных, иммунизированных конъюгатом гептасакхаридного лиганда и белка-носителя CRM197

Figure 3. Diagram of serum antibody titers in the animals immunized with a conjugate of heptasaccharide ligand and CRM197 carrier protein.

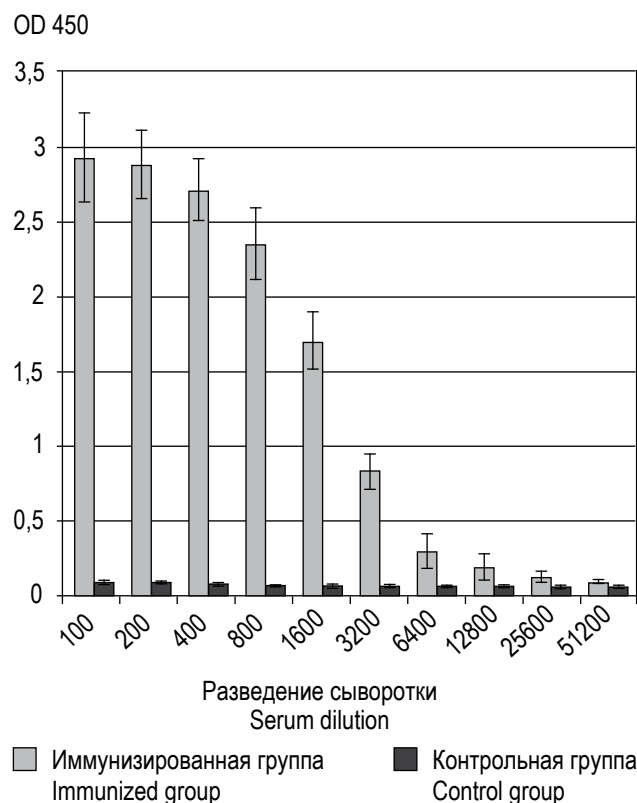


Рисунок 5. Диаграмма титра антител сывороток животных, иммунизированных конъюгатом наносакхаридного лиганда и белка-носителя CRM197

Figure 5. Diagram of serum antibody titers in the animals immunized with the conjugate of nanosaccharide ligand and CRM197 carrier protein

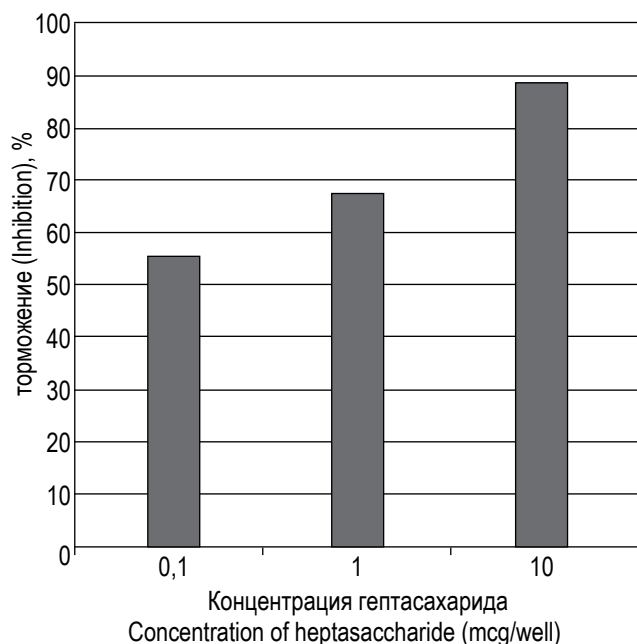


Рисунок 4. Диаграмма торможения конкурентного ИФА при добавлении различных концентраций гептасакхарид

Figure 4. Diagram of competitive ELISA inhibition at different heptasaccharide concentrations

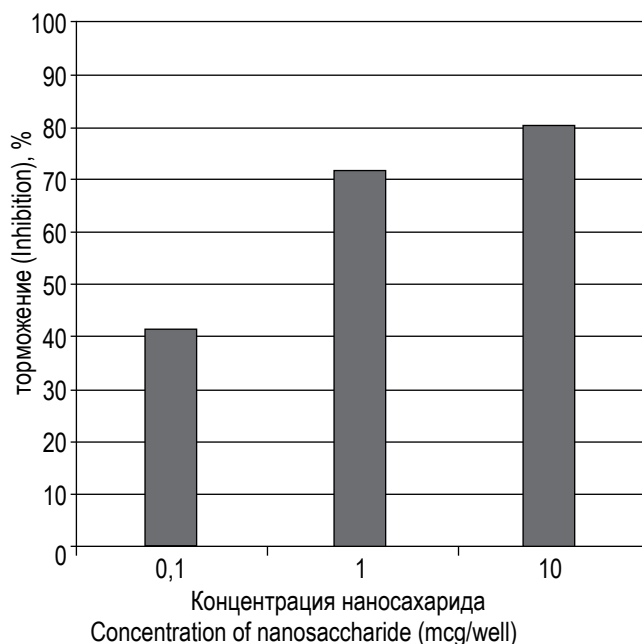


Рисунок 6. Диаграмма торможения конкурентного ИФА при добавлении различных концентраций наносакхарид

Figure 6. Diagram of competitive ELISA inhibition at different nanosaccharide concentrations

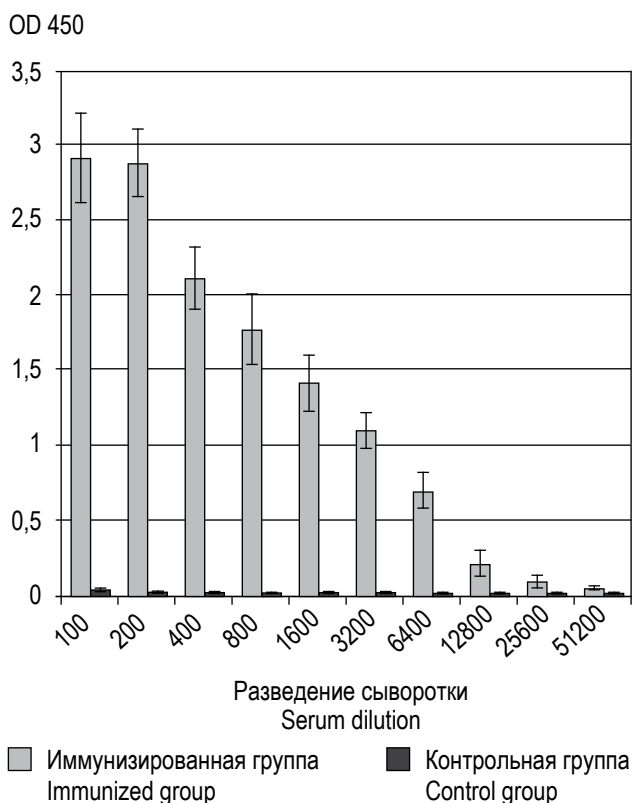


Рисунок 7. Диаграмма титра антител сывороток животных, иммунизированных конъюгатом ундекасахаридного лиганда и белка-носителя CRM197

Figure 7. Diagram of serum antibody titers in the animals immunized with the conjugate of undecasaccharide ligand and CRM197 carrier protein

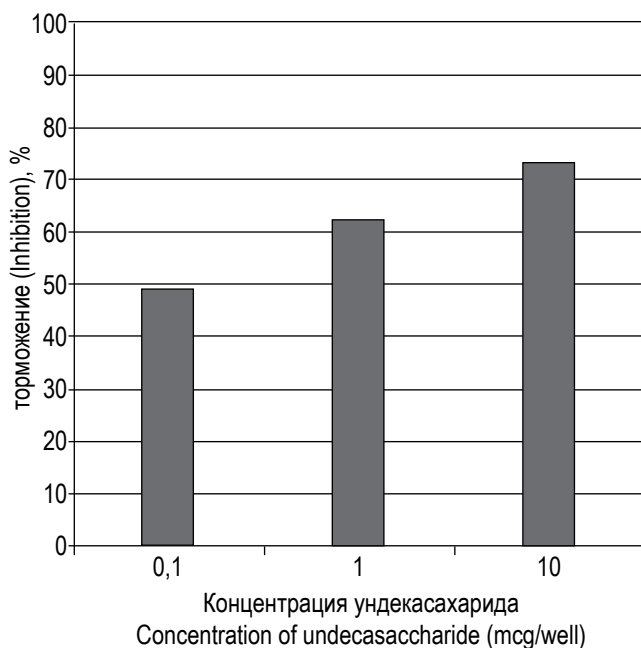


Рисунок 8. Диаграмма торможения конкурентного ИФА при добавлении различных концентраций ундекасахарида

Figure 8. Diagram of competitive ELISA inhibition at different undecasaccharide concentrations

с белком-носителем приводит к активации Т-зависимого иммунного ответа и, таким образом, в значительной степени повышает иммуногенность препарата. Экспериментальные исследования показали, что при использовании в качестве белка-носителя CRM197 наблюдаются повышенные уровни IgG на целевой полисахаридный антиген. Также происходит увеличение синтеза таких цитокинов, как IL-4 и IL-5, являющихся маркерами индукции Т-хелперов 2 типа. Следует отметить, что показана безопасность вакцинации полисахаридными вакцинами, конъюгированными с CRM197, младенцев из группы риска [9].

Другим примером госпитальной инфекции является инвазивный аспергиллез, вызываемый в подавляющем большинстве случаев грибами *Aspergillus fumigatus* и некоторыми другими представителями данного рода. Заболевание тяжело поддается лечению и в большинстве случаев имеет летальный исход. В литературе имеются данные о разработке кандидатных противоаспергиллезных вакцин на основе культуральных фильтратов аспергиллуса, а также его белковых компонентов [6].

Ранее было установлено, что иммунизация лабораторных мышей конъюгатом (1→3)-глюкозидного лиганда с бычьим сывороточным альбумином вызывает выработку специфических антител, которые распознают поверхностные олигосахариды *Aspergillus fumigatus* [7]. Результаты, полученные в нашей работе, согласуются с указанными данными. Двукратная иммунизация экспериментальными образцами конъюгированных вакцин на основе олигосахаридных лигандов и белка-носителя CRM197 лабораторных мышей линии Balb/c вызывает формирование высокого титра специфических антител. Все исследованные образцы конъюгированных вакцин на основе олигоглюкозидов с различным содержанием мономерных звеньев в цепи (пентасахариды, гептасахариды, наносахариды, а также ундекасахариды) при их двукратном введении вызвали формирование у иммунизированных животных титра антител на уровне 1:51200. Высокая avidность формирующихся антител к своим олигосахаридным лигандам была показана в реакции конкурентного ИФА. При этом следует заметить, что наибольший процент торможения иммуноферментной реакции был получен в группах, иммунизированных гептасахаридным и наносахаридным конъюгатом с белком-носителем, 89 и 81% соответственно, при использовании конкурентных олигоглюкозидов в концентрации 10 мкг на лунку, что говорит о высокой иммуногенности оцениваемых кандидатных вакцин.

Полученные данные говорят о целесообразности дальнейших доклинических исследований экспериментальных образцов конъюгированных вакцин против грибов *Candida* и *Aspergillus*, а также выбора наиболее иммуногенного и эффективного варианта вакцины из исследуемых.

Список литературы / References

1. Духовлинов И.В., Федорова Е.А., Богомолова Е.Г., Добровольская О.А., Черняева Е.Н., Аль-Шехадат Р.И., Симбирцев А.С. Получение рекомбинантного белка CRM197 в клетках *E. coli*. Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 1. С. 37-44. [Dukhovlinov I.V., Fedorova E.A., Bogomolova E.G., Dobrovolskaya O.A., Chernyaeva E.N., Al-Shekhadat R.I., Simbirtsev A.S. Production of recombinant protein CRM197 in *Escherichia coli*. *Infektsiya i immunitet* = Russian Journal of Infection and Immunity, 2015, Vol. 5, no. 1, pp. 37-44. (in Russ.).] <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2015-1-37-44>
2. Blanchard-Rohner G. The B-cell response to a primary and booster course of MenACWY-CRM197 vaccine administered at 2, 4 and 12 months of age. *Vaccine*, 2013, Vol. 31, no. 20, pp. 2441-2448.
3. CDC. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee: prevention of pneumococcal disease. *MMWR*, 1997, no. 46, p. 8.
4. Clements D.A., Gilbert G.L. Immunization for the prevention of *Haemophilus influenzae* type b infections: a review. *Aust. N. Z. J. Med.* 1990, no. 20, pp. 828-834.
5. Dagan R., Poolman J., Siegrist C.-A. Glycoconjugate vaccines and immune interference: A review. *Vaccine*. 2010, Vol. 28, no. 34, pp. 5513-5523.
6. Ito J.I. T cell immunity and vaccines against invasive fungal diseases. *Immunological Investigations*. 2011, Vol. 40, pp. 825-838.
7. Komarova B.S., Orekhova M.V., Tsvetkov Y.E., Beau R., Aimananda V., Latgé J.P., Nifantiev N.E. Synthesis of a pentasaccharide and neoglycoconjugates related to fungal α -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan and their use in the generation of antibodies to trace *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Chemistry*. 2015, Vol. 21, no. 3, pp. 1029-1035.
8. Retallack D.M. Reliable protein production in a *Pseudomonas fluorescens* expression system. *Protein Expr. Purif.* 2012, Vol. 81, no. 2, pp. 157-165.
9. Van den Biggelaar A.H.J. et al. Pneumococcal conjugate vaccination at birth in a high-risk setting: no evidence for neonatal T-cell tolerance. *Vaccine*, 2011, Vol. 29, no. 33, pp. 5414-5420.
10. Wang X.J., Sui X., Yan L., Wang Y., Cao Y.B., Jiang Y.V. Vaccines in the treatment of invasive candidiasis. *Virulence*, 2015, Vol. 6, no. 4, pp. 309-315.
11. Yashunsky D.V., Tsvetkov Y.E., Grachev A.A., Chizhov A.O., Nifantiev N.E. Synthesis of 3-aminopropyl glycosides of linear β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucosyloligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 2016, Vol. 419, no. 8, p. 17.
12. Zhou J. Secretory expression of recombinant diphtheria toxin mutants in *B. Subtilis*. *J. Tongji Med. Univ. Tong Ji Yi Ke Xue Xue Bao*, 1999, Vol. 19, no. 4, pp. 253-256.

Авторы:

Богомолова Е.Г. — младший научный сотрудник, лаборатория генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Добровольская О.А. — младший научный сотрудник, лаборатория генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Федорова Е.А. — научный сотрудник, лаборатория генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Кондрашкина А.М. — старший лаборант, лаборатория генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Колмаков Н.Н. — старший научный сотрудник, лаборатория генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Ищук С.А. — инженер первой категории, лаборатория генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Духовлинов И.В. — к.б.н., начальник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Симбирцев А.С. — д.м.н., профессор, директор ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Поступила 05.10.2016

Принята к печати 20.10.2016

Authors:

Bogomolova E.G., Junior Research Associate, Laboratory of Genetically Engineered Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Dobrovolskaya O.A., Junior Research Associate, Laboratory of Genetically Engineered Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Fedorova E.A., Research Associate, Laboratory of Genetically Engineered Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Kondrashkina A.M., Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Genetically Engineered Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Kolmakov N.N., Senior Research Associate, Laboratory of Genetically Engineered Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Ishchuk S.A., First Rank Engineer, Laboratory of Genetically Engineered Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Dukhovlinov I.V., PhD (Biology), Chief, Laboratory of Genetically Engineered Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Russian Federal Agency for Medicine and Biology; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Received 05.10.2016

Accepted 20.10.2016

КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ АГОНИСТА PPAR α ФЕНОФИБРАТА У БОЛЬНЫХ С ДИАБЕТ-АССОЦИИРОВАННЫМ ОСТЕОАРТРИТОМ: ПЕРЕКРЕСТНОЕ ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Ширинский В.С., Казыгашева Е.В., Калиновская Н.Ю.,
Ширинский И.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

Резюме. В открытом, рандомизированном, перекрестном исследовании приняло участие 16 женщин с диабет-ассоциированным остеоартритом (ДАОА). Средний возраст больных был 65,54 ($\pm 5,41$) лет, у них выявлялась избыточная масса тела (средний индекс массы тела — $35,82 \pm 5,74$ кг/м²). Пациенты в течение длительного времени страдали остеоартритом ($14,54 \pm 7,6$ лет) и сахарным диабетом ($13,08 \pm 3,43$ лет). Клинические и рентгенологические признаки гонартроза выявлены у 100% пациентов, у всех больных зарегистрирована третья рентгенологическая стадия ОА коленного сустава по Kellgren—Lawrence. После рандомизации одна группа больных ($n = 9$) принимала фенофибрат в дозе 145 мг в сутки в течение 12 недель, другая группа ($n = 7$) — препарат сравнения — хондроитина сульфат в дозе 1000 мг в сутки, также в течение 12 недель. Затем, после двухнедельного периода «отмывки», первая группа больных начинала прием препарата сравнения, вторая — фенофибрат. Клиническое обследование проводилось ежемесячно, а лабораторное — на первом и последнем визитах. Первичной конечной точкой был уровень боли по визуальной аналоговой шкале (ВАШ), вторичными конечными точками были показатели шкал KOOS, WOMAC, ICOAP и др. Также изучалось влияние фенофибрата на содержание сывороточных биомаркеров — IL-6, IL-18, IL-10, липидов, СРБ. Сравнительный эффект фенофибрата оценивался с помощью метода генерализованных оценивающих уравнений (generalized estimating equation, GEE) с коррекцией по последовательности назначенной терапии.

Установлено, что клинический эффект от приема фенофибрата больными ДАОА не отличался от эффекта хондроитина сульфата. Однако фенофибрат обладал более широким спектром действия, нормализуя липидный профиль. Так, прием фенофибрата был ассоциирован с повышением содержания ЛПВП (β -коэффициент = $-0,19$, $p = 0,02$), уменьшением уровня общего холестерина (β -коэффициент = $-0,78$, $p = 0,01$), и триглицеридов (β -коэффициент = $-0,85$, $p = 0,002$). Помимо этого, прием фенофибрата был ассоциирован с уменьшением лабораторного показателя системного воспаления СОЭ (β -коэффициент = $-7,76$, $p = 0,01$). Изменения содержания цитокинов после курса терапии фенофибратом не отличались от изменений при приеме препарата сравнения.

Адрес для переписки:

Ширинский Валерий Степанович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»,
630047, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (923) 107-51-00.
Факс: 8 (383) 228-25-47.
E-mail: valery.shirinsky@gmail.com

Address for correspondence:

Shirinsky Valery S.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630047, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (923) 107-51-00.
Fax: 7 (383) 228-25-47.
E-mail: valery.shirinsky@gmail.com

Образец цитирования:

В.С. Ширинский, Е.В. Казыгашева, Н.Ю. Калиновская,
И.В. Ширинский «Клиническая эффективность
и безопасность применения агониста PPAR фенофибрата
у больных с диабет-ассоциированным остеоартритом:
перекрестное пилотное исследование» // Медицинская
иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 165–174.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-165-174

© Ширинский В.С. и соавт., 2017

For citation:

V.S. Shirinsky, E.V. Kazygasheva, N.Yu. Kalynovskaya,
I.V. Shirinsky "Clinical efficiency and safety of Fenofibrate,
a PPAR agonist, in the patients with diabetes-associated
osteoarthritis: a cross-over pilot study", *Medical Immunology*
(Russia)/*Meditinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 2,
pp. 165–174.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-165-174

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-2-165-174

Заключается, что результаты этого пилотного исследования дают основания для дальнейшего изучения эффективности и плеiotропного действия агонистов PPAR α в масштабных контролируемых клинических испытаниях.

Ключевые слова: остеоартрит, коморбидность, сахарный диабет 2 типа, рецепторы активируемые пероксисомным пролифератором α , липиды, цитокины, воспаление

CLINICAL EFFICIENCY AND SAFETY OF FENOFIBRATE, A PPAR α AGONIST, IN THE PATIENTS WITH DIABETES-ASSOCIATED OSTEOARTHRITIS: A CROSS-OVER PILOT STUDY

Shirinsky V.S., Kazygasheva E.V., Kalynovskaya N.Yu., Shirinsky I.V.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Sixteen female patients with diabetes-associated osteoarthritis (DAOA) participated in an open-label, randomized, cross-over study. The mean patients' age was 65.5 (± 5.4) years, the patients were obese (mean body mass index, 35.8 ± 5.7 kg/m²). They suffered from durable osteoarthritis (14.5 ± 7.6 years) associated with diabetes mellitus (13.08 ± 3.43 years). Clinical and radiographic signs of knee OA were observed in 100% of the cases, all the patients had Kellgren–Lawrence grade III radiographic changes. First group of patients (n = 9) was randomized to Fenofibrate (145 mg/day for 12 weeks), the second group (n = 7) received chondroitine sulfate (1000 mg/day for 12 weeks). Then, following a two-week washout period, the first group was switched to chondroitine sulfate and the second group, to fenofibrate. Clinical examination was performed monthly, and laboratory evaluation was performed at the baseline and by the end of each treatment course. pain level according to VAS scale was used as the primary endpoint, whereas KOOS, WOMAC, ICOAP and other scores served as secondary endpoints. We have also assessed effects of Fenofibrate upon serum biomarkers (IL-6, IL-18, IL-10, lipid profiles, and CRP concentrations). Comparative effect of Fenofibrate was evaluated by means of generalized estimating equation (GEE) models adjusted for the treatment sequence.

It was shown that clinical effects of Fenofibrate in patients with DAOA did not significantly differ from those of chondroitine sulfate. However, fenofibrate had broader spectrum of effects including improvement of lipid profiles. E.g., Fenofibrate treatment was associated with increased HDL levels (β coefficient, -0.19; p = 0.02), a decrease in total cholesterol (β coefficient, -0.78; p = 0.01), and triglycerides (β coefficient, 0.85; p = 0.002). In addition, Fenofibrate therapy was associated with a decrease in ESR, a laboratory biomarker of systemic inflammation (β coefficient, -7.76; p = 0.01). Cytokine changes following the Fenofibrate treatment did not differ from those registered after chondroitine sulfate therapy. In conclusion, the results of this pilot study provide a rationale for further studies of PPAR α agonists and their pleiotropic effects in large-scale controlled clinical trials.

Keywords: osteoarthritis, comorbidity, type 2 diabetes, peroxisome proliferator-activated receptors α , lipids, cytokines, inflammation

Введение

Остеоартрит (ОА) является одной из актуальных проблем клинической медицины вследствие большой распространенности, а также в связи с повышенной частотой коморбидной патологии: ожирения, сахарного диабета (СД), ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии, инсулинорезистентности, дислипидемии [1, 3, 4]. Клинико-патогенетическая разнородность ОА дает основание обсуждать наличие особых субтипов болезни, в частности ОА, ассоциированного с сахарным диабетом (ДАОА) [9, 14], патогенетической роли гипергликемии, конечных продуктов гликирования и инсулинорезистентности в инициации и прогрессии этого фенотипа

ОА и сопутствующих заболеваний. Установлено, что больные ДАОА характеризуются тяжелыми клиническими проявлениями суставного синдрома, который ассоциируется с более выраженными показателями системного воспаления, тяжести коморбидности и проатерогенными изменениями липидов сыворотки периферической крови [8, 10]. Большое число коморбидных заболеваний у больных ДАОА [5, 8], низкая приверженность к приему избыточного количества препаратов, которые рекомендуют разные специалисты, повышенный риск серьезных нежелательных явлений лечения требуют новых подходов к терапии больных этой группы. Ранее нами было обоснованы принципы «узловой» терапии синтропных коморбидных заболеваний, кото-

рые подразумевают поиск таких терапевтических «узлов-мишеней», которые обладают большим числом межмолекулярных связей и, благодаря этому, многоцелевыми эффектами при фармакологическом воздействии [7]. К числу таких узлов относятся ядерные рецепторы, активируемые пероксисомным пролифератором α (peroxisome proliferator-activated receptors — PPAR α), фармакологическими агонистами которых являются фибраты, в частности фенофибрат. Липидкорригирующие свойства фибратов, выявленные у больных с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний [11], предполагают возможность улучшения липидного профиля при назначении препаратов этой группы и у больных ДАОА. Помимо действия фибратов на липидный обмен, установлены их противовоспалительные, иммуномодулирующие и антиатерогенные свойства, в том числе при использовании у больных эрозивным ОА [25, 26]. Задачей исследования являлась оценка сравнительной эффективности, безопасности, фармакодинамики применения фенофибрата и референтного препарата хондроитина сульфат у больных ДАОА.

Материалы и методы

В открытом рандомизированном исследовании приняло участие 16 женщин, наблюдающихся в Диабетологическом центре города Новосибирска и у ревматолога. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИФКИ, все пациенты подписали форму добровольного информированного согласия. Основными критериями включения были:

- возраст 50–70 лет;
- диагноз ОА коленного сустава, удовлетворяющий критериям ACR [12], продолжительность болезни не имеет значения;
- установленный диагноз СД 2 типа, продолжительность болезни не имеет значения.

Больные не должны были получать нестероидные противовоспалительные и симптом-модифицирующие препараты, опиатные анальгетики в течение месяца до начала исследования и во время его проведения. Допускался прием ацетоминифена в стандартных дозировках. В качестве антидиабетического средства больные длительно получали метформин и инсулин в разных дозировках, что позволяло всем пациентам контролировать содержание глюкозы крови.

На рисунке 1 представлен дизайн исследования. Как следует из рисунка, после рандомизации одна группа больных принимала фенофибрат (трайкор) 145 мг в сутки в течение 12 недель, другая группа препарат сравнения — хондроитина

сульфат в дозе 1000 мг в сутки, так же в течение 12 недель. Затем, после двухнедельного периода «отмывки», первая группа больных начинала прием препарата сравнения, вторая — фенофибрат. Продолжительность лечения после смены препарата составила 12 недель. Клиническое обследование проводилось на каждом из четырех визитов, а лабораторное — на первом и последнем визитах. Первичной конечной точкой был уровень боли по визуально-аналоговой шкале (ВАШ); вторичные конечные точки — оценка функционального статуса суставов по шкалам KOOS (Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score) (субшкалы, оценивающие симптомы, нарушение функции при обычных активностях и при занятиях спортом, изменения качества жизни) [23], WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index) (субшкалы, оценивающие уровень боли, скованность, нарушение функции и суммарный балл всех субшкал) [13], характеристика постоянной боли (ICOAP) [21], число болезненных и припухших суставов. Для оценки уровня системного воспаления определяли содержание IL-6, IL-18, IL-10 (Вектор-Бест, Россия; в сыворотке ПК, с помощью стандартных наборов для ИФА, согласно инструкции фирм производителей), СРБ (Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия), СОЭ методом Вестергрена (Kimased, Италия). Уровень липидов в сыворотке ПК определяли стандартным методом. Непрерывные базовые характеристики представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение, т.к. эта разновидность описательной статистики является предпочтительной даже в случае ненормального распределения данных [19]. Для лонгитудинального анализа использовался метод генерализованных оценивающих уравнений (generalized estimating equations, GEE). Для оценки сравнительного влияния фенофибрата на лонгитудинальное изменение показателей использовался параметр фенофибрат*время (как фактор). В-коэффициент для этого параметра указывает на среднее изменение показателя каждые четыре недели при приеме фенофибрата по сравнению с приемом хондроитина сульфата. GEE-модели оценивались с помощью робастных стандартных ошибок, подсчитанных с помощью метода “sandwich”. Для коррекции моделей по повторяемым измерениям применялась корреляционная структура «exchangeable». Несмотря на то, что выбор корректной корреляционной структуры является условием использования моделей GEE, метод устойчив к нарушению этого условия. Моделирование GEE проводилось с помощью пакета Zelig для R [16].

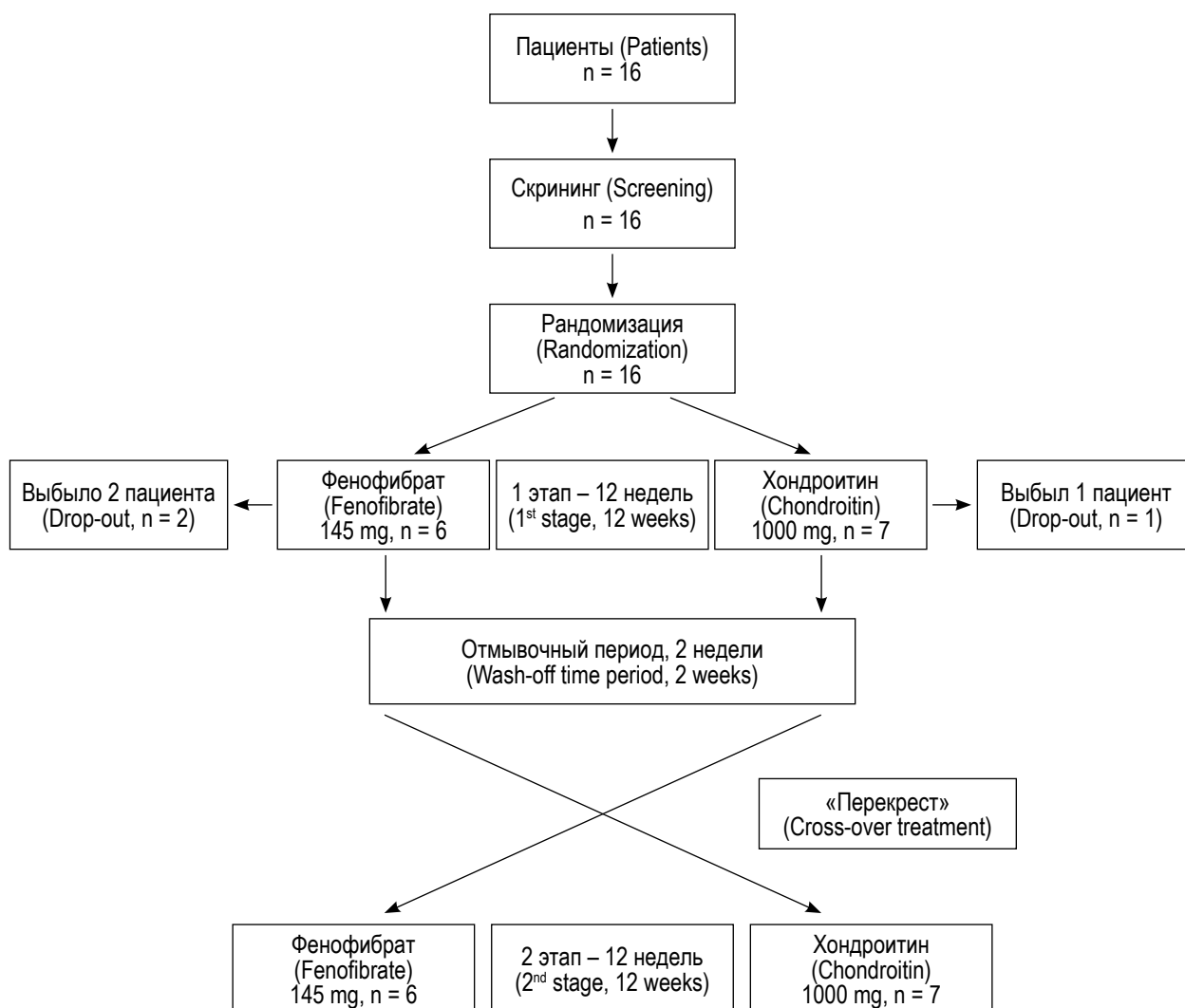


Рисунок 1. Схема исследования

Результаты и обсуждение

Перед началом исследования была сформулирована следующая гипотеза: прием фенофибрат больными ДАОА оказывает не меньший клинический эффект, чем прием референтного препарата хондроитина сульфат, при этом первый препарат обладает плейотропным действием.

В исследование было включено 16 пациентов. Девять человек были рандомизированы к последовательности лечения «фенофибрат–хондроитин сульфат», семь — к последовательности «хондроитин сульфат–фенофибрат». В группе с последовательностью «фенофибрат–хондроитин сульфат» одна пациентка выбыла из исследования из-за появления желудочно-кишечного дискомфорта на третьем месяце терапии, одна больная отозвала информированное согласие после 1 месяца лечения. В группе с последовательностью «хондроитин сульфат–фенофибрат» одна пациентка прекратила участие в исследовании

после приема хондроитина сульфата в течение 1 месяца из-за развития нежелательного явления — случайного выявления ранее недиагностированного цирроза печени.

Базовые характеристики больных представлены в таблице 1. Как следует из таблицы, пациенты были пожилого возраста, у больных регистрировалась избыточная масса тела и большое число коморбидных заболеваний, выраженный болевой синдром, нарушение функции коленных суставов и мелких суставов кистей, ускоренная СОЭ. Клинические и рентгенологические признаки гонартроза выявлены у 100% пациентов, у всех больных зарегистрирована третья рентгенологическая стадия ОА коленного сустава по Kellgren–Lawrence.

В таблице 2 представлены результаты сравнительного анализа основных клинических проявлений ДАОА в динамике трехмесячного лечения фенофибратом и хондроитином сульфатом.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАЦИЕНТОВ ДАОА, ВКЛЮЧЕННЫХ В ИССЛЕДОВАНИЕ (n = 16)

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF OSTEOARTHRITIS PATIENTS INCLUDED INTO THE STUDY (n=16)

Показатель Parameter	Значение Value (m±SEM)
Возраст Age, years	64,38±5,69
Рост Height, cm	160,72±6,52
Вес Weight, kg	93,38±15,45
Индекс массы тела Body mass index, kg/cm ²	36,17±5,63
Объем талии Waist volume, cm	112,38±10,37
Длительность СД DM duration, years	11,94±4,04
Длительность ОА Duration of osteoarthritis, years	14,12±7,06
CIRS-G	22,19±3,47
Показатели коморбидности Comorbidity indexes	
Количество категорий сопутствующих заболеваний Number of comorbidity categories	11,12±1,02
Индекс тяжести CIRS-G Severity index CIRS-G	1,98±0,26
Количество сопутствующих заболеваний Number of concomitant disorders	9,31±1,74
Показатели суставного синдрома, боли и нарушения функции Parameters of arthritic syndrome, pains and dysfunction	
Число болезненных суставов Number of painful joints	6,69±4,94
Число припухших суставов Number of bloated joints	1,31±1,01
WOMAC боль WOMAC pain	295,38±81,36
WOMAC скованность WOMAC rigidity	128,25±34,02
WOMAC функциональная активность WOMAC functional activity	1081,94±252,52
WOMAC суммарный WOMAC summary	1504,94±331,25
FIHOA	4,25±4,01
ВАШ боль VAS, pain, mm	70±16,26
ВАШ, общее состояние здоровья VAS, general health condition, mm	64,56±19,27
KOOS симптомы KOOS symptoms	15,75±5,83

Таблица 1 (продолжение)

Показатель Parameter	Значение Value (m±SEM)
КООС боль KOOS pain	19,88±4,79
КООС активность KOOS activity	38,94±8,1
КООС спорт KOOS sports	16,19±2,29
КООС качество жизни KOOS quality of life	11,88±2,28
КООС суммарный KOOS summary	102,62±18,97
ICOAP	26,31±4,39
Лабораторные показатели Laboratory parameters	
СОЭ ESR, mm/h	30,19±14,34
СРБ CRP, mg/l	1,73±2,02
Общий холестерин Total cholesterol, mmol/L	5,66±1,04
ЛПВП HDL, mmol/L	1,31±0,24
Индекс атерогенности Atherogenicity index	3,41±0,88
Триглицериды Triglycerides, mmol/L	2,04±0,93
ЛПНП LDL, mmol/L	3,57±1,2
IL-6 IL-6, pg/mL	0,13±0,31
IL-10 IL-10, pg/mL	0,02±0,1
IL-18 IL-18, pg/mL	15,93±26,4

Примечание. СД – сахарный диабет; CIRS-G – шкала кумулятивной оценки заболеваний, гериатрическая версия (cumulative illness rating scale geriatric version); WOMAC – индекс остеоартрита Western Ontario and McMaster Universities (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index); KOOS – индекс повреждения и исходов остеоартрита (Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score); FIHOA – функциональный индекс остеоартрита кисти (Functional Index for Hand Osteoarthritis), ICOAP – индекс перемежающейся и непрерывной боли при остеоартрите (Intermittent and Constant Osteoarthritis Pain).

Note. DM, diabetes mellitus; CIRS-G, cumulative illness rating scale, geriatric version; WOMAC, Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index; KOOS, Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score; FIHOA, Functional Index for Hand Osteoarthritis; ICOAP, Intermittent and Constant Osteoarthritis Pain.

Как следует из таблицы 2, по влиянию на уровень боли и ряд показателей функции суставов фенофибрат не уступал известному препарату хондроитину сульфату. Примечательно, что клинический эффект по большинству показателей был сопоставим на всех этапах наблюдения, в то же время к концу лечения фенофибрат уменьшал

число отечных суставов. Оба препарата хорошо переносились больными, серьезных нежелательных явлений не зарегистрировано.

В таблице 3 приведены результаты влияния фенофибрата и хондроитина сульфата на некоторые биомаркеры сыворотки периферической крови. Видно, что прием фенофибрата, в срав-

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ЛОНГИТУДИНАЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ «ФЕНОФИБРАТ*ВРЕМЯ (КАК ФАКТОР)» НА КЛИНИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ

TABLE 2. COMPARATIVE LONGITUDINAL EFFECT OF FENOFIBRATE*TIME FACTOR INTERACTION UPON CLINICAL PARAMETERS

Показатели Parameters	Неделя 4 Week 4	Неделя 4 Week 4	Неделя 8 Week 8	Неделя 8 Week 8	Неделя 12 Week 12	Неделя 12 Week 12
	β-коэффициент β coefficient	p	β-коэффициент β coefficient	p	β-коэффициент β coefficient	p
Боль по ВАШ Pain by the VAS scale	7,61	0,23	6,15	0,42	0,69	0,91
Число болезненных суставов Number of painful joints	0,61	0,59	1	0,4	-0,308	0,76
Число отечных суставов Number of bloated joints	-0,38	0,16	-0,84	0,0055	-0,76	0,02
KOOS симптомы KOOS symptoms	-1,38	0,35	-0,61	0,58	1,07	0,56
KOOS боль KOOS pain	0,53	0,72	-0,69	0,56	1,76	0,25
KOOS активность KOOS activity	-0,15	0,96	2,07	0,37	3,30	0,18
KOOS качество жизни KOOS quality of life	1,23	0,15	2,46	0,0026	1,30	0,10
KOOS суммарный KOOS summary	-0,69	0,88	3,07	0,43	7,61	0,13
ICOAP постоянная боль ICOAP permanent pain	0,92	0,36	1	0,32	1	0,27
WOMAC утренняя скованность WOMAC morning rigidity	1,69	0,89	-0,84	0,94	17,76	0,02
WOMAC боль WOMAC pain	-38,9	0,21	53,2	0,05	40,0	0,12
WOMAC суммарный WOMAC summary	-212,5	0,08	12,9	0,90	83,1	0,42

Примечание. β-коэффициент указывает на среднее различие на визитах наблюдения между пациентами, принимавшими фенофибрат и хондроитина сульфата.

WOMAC – индекс остеоартрита Western Ontario and McMaster Universities (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index); KOOS – индекс повреждения и исходов остеоартрита (Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score).

Note. β coefficient shows mean difference between the patients taken Fenofibrate and chondroitin sulfate, as observed at clinical visits. WOMAC, Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index; KOOS, Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score.

нении с приемом хондроитина сульфата, в большей степени снижал лабораторный признак системного воспаления – СОЭ, и приводил к более выраженному липидкорректирующему эффекту: уменьшал содержание общего холестерина, триглицеридов, повышал содержание ЛПВП и снижал индекс атерогенности. Изменение содержания цитокинов в конце лечения при лечении фенофибратом не отличалось от изменений при приеме препарата сравнения.

Таким образом, результаты пилотных исследований свидетельствуют о том, что клинический

эффект от приема фенофибрата больными ДАОА сопоставим с приемом хондроитина сульфата. Однако фенофибрат обладает более широким спектром действия: влияет на липидный профиль, нормализуя соотношение ЛПВП и ЛПНП, снижая содержание общего холестерина и триглицеридов. Помимо этого, прием фенофибрата, в большей мере, чем применение хондроитина сульфата, уменьшает лабораторный показатель системного воспаления СОЭ.

Применение хондроитина сульфата в качестве препарата сравнения обусловлено его доказан-

ТАБЛИЦА 3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ЛОНГИТУДИНАЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ «ФЕНОФИБРАТ*ВРЕМЯ» НА БИОМАРКЕРЫ В СЫВОРОТКЕ ПК БОЛЬНЫХ ДАОА

TABLE 3. COMPARATIVE LONGITUDINAL EFFECT OF FENOFIBRATE*TIME FACTOR INTERACTION UPON SERUM BIOMARKERS IN THE OSTEOARTHRITIS PATIENTS

Показатель Parameter	β-коэффициент β coefficient	p
СОЭ ESR	-7,76	0,01
СРБ CRP	-7,42	0,12
Общий холестерин Total cholesterol	-0,78	0,01
ЛПВП HDL	0,19	0,02
Индекс атерогенности Atherogenicity index	-1,23	> 0,001
Триглицериды Triglycerides	-0,85	0,002
ЛПНП LDL	-0,41	0,35
IL-6	11,38	0,29
IL-10	0,16	0,3
IL-18	9,56	0,17

Примечание. β-коэффициент указывает на среднее различие на последнем визите между пациентами, принимавшими фенофибрат и хондроитин.

Note. β coefficient shows mean difference between the patients receiving Fenofibrate and Chondroitin at their final visit.

ными симптом-модифицирующими свойствами при использовании у больных остеоартритом и достаточно хорошо изученной фармакодинамикой. Многочисленные исследования клинической эффективности и безопасности, механизмов действия хондроитина сульфата позволили Ассоциации ревматологов России, Международному обществу по изучению остеоартроза (OARSI), экспертам Европейской противоревматической лиги (EULAR) рекомендовать его в качестве симптом-модифицирующего препарата и структурно-модифицирующего препарата [6, 17, 18, 20, 22]. Здесь укажем лишь основные фармакологические эффекты хондроитина сульфата [2, 15]:

— уменьшение симптомов ОА (уменьшение боли, улучшение функции суставов, противовоспалительный эффект, связанный с ингибацией

IL-1, ЦОГ-2, ПГЕ2, NF-κB, стимуляция хемотаксиса и фагоцитоза, антиген-индуцируемой продукции IgG1 и IgE);

— усиление анаболических процессов в гиалиновом хряще (стимуляция синтеза протеогликанов, гиалуроновой кислоты, коллагенов, влияние на тканевые ингибиторы матриксных протеиназ);

— уменьшение синтеза ферментов деструкции хряща (металлопротеиназы 3, 9, 13, 14; катепсина-бета, лейкоцитарной эластазы);

— подавление апоптоза хондроцитов (ингибция индуцируемой нуклеотидной транслокации NF-κB);

— улучшение микроциркуляции субхондральной кости и синовиальной ткани;

— повышение вязкости синовиальной жидкости;

— ингибирование синтеза оксида азота и свободных радикалов.

Такой широкий спектр фармакологической активности хондроитина сульфата позволяет рассчитывать на выраженный клинический эффект. Однако метаанализ большого числа рандомизированных клинических испытаний применения хондроитина сульфата показал, что уменьшение боли и улучшение функции суставов происходит лишь через 3-6 месяцев после начала приема препарата, это улучшение умеренно, а число OMERACT-OARSI ответчиков лишь на 20% превышает количество ответчиков в группе плацебо [24]. Что касается эффективности «хондропротекторного», структурно-модифицирующего действия хондроитина сульфата, то по этому поводу по-прежнему продолжают горячие дискуссии [27]. Помимо этого, действие хондроитина сульфата ограничено суставными структурами и не приводит к клинически значимым системным эффектам. Поэтому фенофибрат, не уступая хондроитину сульфат по клинической эффективности, имеет преимущество, поскольку обладает липидкорректирующим, антиатерогенным действием. В лечении больных остеоартритом, страдающих сахарным диабетом — заболеваниями, которые являются независимыми предикторами риска сердечно-сосудистых заболеваний [5], нормализующее влияние фенофибрата на содержание атерогенных липидов позволяет уменьшить влияние и этих факторов риска. Таким образом, результаты пилотного исследования эффективности и безопасности применения фенофибрата у больных ДАОА дают основания для его дальнейшего изучения в более масштабных рандомизированных клинических испытаниях.

Список литературы / References

1. Анкудинов А.С. Проблемы сердечно-сосудистой коморбидности при остеоартрозе // Современные проблемы ревматологии, 2013. № 5. С. 22-31. [Ankudinov A.S. Problems of cardiovascular comorbidity in osteoarthritis. *Sovremennye problemy revmatologii = Modern Problems of Rheumatology*, 2013, no. 5, pp. 22-31. (In Russ.)]
2. Бадюкин В.В. Клиническая оценка фармакологической активности препарата хондроитина сульфат // Лечащий врач, 2012. № 10. С. 10-13 [Badokin V.V. Clinical assessment of pharmacologic activity of chondroitin sulfate medication. *Lechashchiy vrach = The Practitioner*, 2012, no. 10, pp. 10-13. (In Russ.)]
3. Березняков И.Г., Корж И.В. Остеоартрит, артериальная гипертензия и ожирение: проблемы коморбидности // Международный медицинский журнал, 2012. № 4. С. 78-81. [Bereznyakov I.G., Korzh I.V. Osteoarthritis, arterial hypertension, and obesity: comorbidity problem. *Mezhdunarodnyy meditsinskiy zhurnal = The International Medical Journal*, 2012, no. 4, pp. 78-81. (In Russ.)]
4. Денисов Л.Н., Насонова В.А. Ожирение и остеоартроз // Научно-практическая ревматология, 2011. № 3. С. 48-55. [Denisov L.N., Nasonov V.A. Obesity and osteoarthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Scientific and Practical Rheumatology*, 2011, no. 3, pp. 48-55. (In Russ.)]
5. Наумов А.В., Верткин А.Л., Алексеева Л. И., Шамуплова М.М., Мендель О.А., Лучихина А.В. Остеоартроз и сердечно-сосудистые заболевания. Общие факторы риска и клиничко-патогенетические взаимосвязи // Профилактическая медицина, 2010. № 3. С. 35-41. [Naumov A.V., Vertkin A.L., Alekseeva L.I., Shamuplova M.M., Mendel O.A., Luchikhina A.V. Osteoarthritis and cardiovascular diseases. Overall risk factors and clinical and pathogenetic *Profilakticheskaya meditsina = Preventive Medicine*, 2010, no. 3, pp. 35-41. (In Russ.)]
6. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению остеоартроза. Ассоциация ревматологов России, 2013. 19 с. [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of osteoarthritis. *Assotsiatsiya revmatologov Rossii = Association of Rheumatologists of Russia*, 2013. 19 p. (In Russ.)]
7. Ширинский В.С., Ширинский И.В. Узловая терапия – новая возможность лечения коморбидных заболеваний // Сибирский медицинский журнал, 2014. Т. 29, № 4. С. 13-21. [Shirinsky V.S., Shirinsky I.V. Hub therapy as a new opportunity for treatment of comorbid diseases. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Journal of Medicine*, 2014, Vol. 29, no. 4, pp. 13-21. (In Russ.)]
8. Ширинский И.В., Сазонова О.В., Калиновская Н.Ю., Ширинский В.С. Коморбидность, метилирование ДНК и аутоиммунитет при диабет-ассоциированном остеоартрите: поисковое исследование // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 4. С. 327-334. [Shirinsky I.V., Sazonova O.V., Kalynovskaya N.Yu., Shirinsky V.S. Comorbidity, DNA methylation and autoimmunity in diabetes-associated osteoarthritis: an exploratory study. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 4, pp. 327-334. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-4-327-334>
9. Ширинский И.В., Калиновская Н.Ю., Ширинский В.С. Клиничко-иммунологическая характеристика диабет-ассоциированного остеоартрита // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 87-93. [Shirinsky I.V., Kalynovskaya N.Yu., Shirinsky V.S. Clinico and immunological characteristics of diabetes-associated osteoarthritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 87-92. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-87-92>
10. Ширинский И.В., Сазонова О.В., Ширинский В.С. Биомаркеры атеросклероза у больных диабет-ассоциированным остеоартритом // Вестник уральской медицинской академической науки, 2014. № 5 (51). С. 23-28. [Shirinsky I.V., Sazonova O.V., Shirinsky V.S. Biomarkers atherosclerosis in patients with diabetes-associated osteoarthritis. *Vestnik ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of Ural Medical Academic Science*, 2014, no. 5 (51), pp. 23-28. (In Russ.)]
11. Abourbih S., Filion K.B., Joseph L., Schiffrin E.L., Rinfret S., Poirier P., Pilote L., Genest J., Eisenberg M.J. Effect of fibrates on lipid profiles and cardiovascular outcomes: a systematic review. *Ann. Rheum. Dis.*, 2016, Vol. 75, no. 1, pp. 37-44.
12. Altman R., Asch E., Bloch D., Bole G., Borenstein D., Brandt K. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.*, 1986, Vol. 29, pp. 1039-1049.
13. Bellamy N., Buchanan W.W., Goldsmith C.H., Campbell J., Stitt L.W. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J. Rheumatol.*, 1988, no. 15, pp. 1833-1840.
14. Berenbaum F. Diabetes-induced osteoarthritis from a new paradigm to a new phenotype. *Ann. Rheum. Diseases*, 2011, Vol. 70, no. 8, pp. 1354-1356.
15. Calamia V., Ruiz-Romero C., Rocha B., Fernández-Puente P., Mateos J., Montell E., Vergés J., Blanco F.J. Pharmacoproteomic study of the effects of chondroitin and glucosamine sulfate on human articular chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.*, 2010, Vol. 12, no. 4, R138.
16. Choirat C., Honaker J., Imai K., King G., Lau O. Zelig: Everyone's Statistical Software. Version 5.0-12, 2016.
17. Hochberg M.C., Altman R.D., April K.T. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012, Vol. 64, no. 4, pp. 465-474.
18. Jordan K.M., Arden N.K., Doherty M. EULAR recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: report of a Task Force of the Standing Committee for international clinical studies including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann. Rheum. Dis.*, 2003, no. 62, pp. 1145-1155.

19. Lydersen S. Statistical review: frequently given comments. *Ann. Rheum. Dis.*, 2015, Vol. 74, no. 2, pp. 323-325.
20. McAlindon T.E., Bannuru R.R., Sullivan M.C. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014, Vol. 22, no. 3, pp. 363-388.
21. Moreton B.J., Wheeler M., Walsh D.A., Lincoln N.B. Rasch analysis of the intermittent and constant osteoarthritis pain (ICOAP) scale. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, Vol. 20, no. 10, pp. 1109-1115.
22. National Clinical Guidelines Centre. Osteoarthritis: The care and management of osteoarthritis in adults. Clinical guideline CG177, 2014.
23. Roos E.M., Roos H.P., Lohmander L.S., Ekdahl C., Beynnon B.D. Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS)-development of a self-administered outcome measure. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.*, 1998, no. 28, pp. 88-96.
24. Schneider H., Maheu E., Cucherat M. Symptom-modifying effect of chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials performed with structum. *Open Rheumatol. J.*, 2012, no. 6, pp. 183-189.
25. Shirinsky I.V., Shirinsky V.S. Targeting Nuclear Hormone receptors: PPAR alpha agonists as Potential Disease-Modifying Drugs for Rheumatoid Arthritis. *Int. J. Rheumatol.*, 2011, Vol. 2011, Art. 937843.
26. Shirinsky I.V., Shirinsky V.S. Treatment of erosive osteoarthritis with peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate: a pilot study. *Rheumatol. Int.*, 2014, Vol. 34, no. 5, pp. 613-616.
27. Wildi L.M., Raynauld J.P., Martel-Pelletier J., Beaulieu A., Bessette L., Morin F., Abram F., Dorais M., Pelletier J.P. Chondroitin sulphate reduces both cartilage volume loss and bone marrow lesions in knee osteoarthritis patients starting as early as 6 months after initiation of therapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study using MRI. *Ann. Rheum. Dis.*, 2011, Vol. 70, no. 6, pp. 982-989.

Авторы:

Ширинский В.С. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Казыгашева Е.В. — младший научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Калиновская Н.Ю. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Ширинский И.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Shirinsky V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kazygasheva E.V., Junior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kalynovskaya N.Yu., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shirinsky I.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 02.09.2016
Принята к печати 02.09.2016

Received 02.09.2016
Accepted 02.09.2016

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ В-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

Будкова А.И.¹, Лапин С.В.¹, Серебрякова М.К.^{2,3}, Кудрявцев И.В.^{1,3},
Тришина И.Н.⁴, Маслянский А.Л.⁴, Тотолян Арег А.^{1,5}

¹ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. При многих системных ревматических заболеваниях, сопровождающихся поликлональной гиперреактивностью В-лимфоцитов, наблюдаются изменения в В-клеточных субпопуляциях. У пациентов с системными ревматическими заболеваниями иммуносупрессивная и цитостатическая терапия также избирательно влияет на субпопуляции В-клеток. Мы исследовали субпопуляции В-клеток у больных системными ревматическими заболеваниями во время их лечения цитостатиками. Мы проанализировали В-клеточные фенотипы у 99 больных с системными ревматическими заболеваниями: 25 с системной красной волчанкой, 27 с системной склеродермией, 47 с синдромом Шегрена, проходивших лечение в стационаре. Группу контроля составили 49 здоровых доноров. Измерение фенотипов В-клеточных субпопуляций проводилось с помощью проточного цитофлуометра (Beckman Coulter, США). «Наивные» В-клетки у больных системной красной волчанкой, получавших циклофосфан, были снижены по сравнению с группой контроля, в то время как плазмобласты были повышены, независимо от терапии.

В-клеточная популяция является гетерогенной по своей природе, именно поэтому каждую В-клеточную субпопуляцию при системных ревматических заболеваниях необходимо рассматривать как самостоятельную функциональную единицу. Несмотря на проводимую иммуносупрессивную терапию у пациентов с системной красной волчанкой, уровень плазмобластов, активно вырабатывающих антитела, оставался высоким. Таким образом, терапия, направленная на определенные В-клеточные субпопуляции, способна увеличить эффективность лечения больных системными ревматическими заболеваниями.

Ключевые слова: системные ревматические заболевания, проточная цитометрия, субпопуляции В-лимфоцитов

Адрес для переписки:

Будкова Анна Игоревна
ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени
академика И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения РФ
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого,
6-8, корп. 28.
Тел.: 8 (965) 018-97-58.
E-mail: annajbm@hotmail.com

Address for correspondence:

Budkova Anna I.
Pavlov First St. Petersburg State Medical University
197022, Russian Federation, St. Petersburg, L. Tolstoy str.,
6-8, Bldg 28.
Phone: 7 (965) 018-97-58.
E-mail: annajbm@hotmail.com

Образец цитирования:

А.И. Будкова, С.В. Лапин, М.К. Серебрякова,
И.В. Кудрявцев, И.Н. Тришина, А.Л. Маслянский,
Арег А. Тотолян «Субпопуляционный состав в-клеток
периферической крови у больных системной красной
волчанкой» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2.
С. 175–184. doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-175-184
© Будкова А.И. и соавт., 2017

For citation:

A.I. Budkova, S.V. Lapin, M.K. Serebriakova, I.V. Kudryavtsev,
I.N. Trishina, A.L. Maslyansky, Areg A. Totolian “B-cell
subpopulations of peripheral blood in systemic lupus erythematosus”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2017, Vol. 19, no. 2, pp. 175–184.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-175-184
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-2-175-184

B-CELL SUBPOPULATIONS OF PERIPHERAL BLOOD IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Budkova A.I.^a, Lapin S.V.^a, Serebriakova M.K.^{b, c}, Kudryavtsev I.V.^{a, c}, Trishina I.N.^d, Maslyansky A.L.^d, Totolian Areg A.^{a, e}

^a Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, St. Petersburg, Russian Federation

^c Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^d Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

^e St. Petersburg L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Distinct changes of B-cell subpopulations are observed in most systemic rheumatic diseases associated with polyclonal B cell hyperreactivity. Immunosuppressive and cytostatic therapy may also differentially influence B lymphocyte subsets in these. We studied subpopulations of B cells in systemic rheumatic patients along treatment with cytostatics. We analyzed B cell phenotypes in ninety-nine blood samples from the patients with systemic lupus erythematosus (SLE, n = 25), systemic sclerosis (n = 27), Sjogren's syndrome (n = 47) in the course of their hospital treatment. Control group consisted of 49 healthy blood donors. Phenotyping of blood B-cell subpopulations was performed by means of flow cytometry (Beckman Coulter, USA). Na ve B-cell subpopulations in SLE patients who underwent cyclophosphan treatment, were under-represented, if compared with normal control group, whereas plasmablast levels were increased irrespectively of medication mode.

B cell population exhibits a natural heterogeneity, thus making it necessary to analyze distinct B cell subpopulations as independent functional units, when studying different rheumatic diseases. The levels of plasmablasts which are active antibody producers, remain high, despite immunosuppressive therapy performed in SLE. Thus, therapy targeted against certain B cell subsets, could be able to provide a more effective treatment for the patients with systemic rheumatic diseases.

Keywords: systemic rheumatic diseases, flow cytometry, B-lymphocyte subpopulations

Введение

Аутоиммунные реакции — это патологические процессы, основой которых служит самоподдерживающийся иммунный ответ на собственные антигены организма, что приводит к повреждению клеток, экспрессирующих эти аутоантигены [3, 6, 7]. Аутоиммунные реакции лежат в основе многих заболеваний человека, в развитии которых участвуют как клеточный, так и гуморальный компоненты [11]. Долгое время считалось, что Т-клетки могут играть ведущую роль в патогенезе большинства аутоиммунных заболеваний, тогда как значение В-клеток сводилось лишь к синтезу аутореактивных антител. Современные данные указывают, что в развитии аутоиммунных патологических состояний роль В-лимфоцитов существенна, что связано с их участием в презентации аутоантигенов, синтезе и секреции провоспалительных цитокинов [4], образовании экстракционных герминативных центров и регуляции иммунного ответа в целом [5, 16].

Как в красном костном мозге, так и во вторичных лимфоидных органах В-лимфоциты представлены разнообразными популяциями клеток. Даже в периферической крови присутствует несколько субпопуляций В-клеток, которые находятся на разных стадиях созревания и различаются по своей миграционной способности, уровню

активации и спектру выполняемых функций при реализации защитных реакций организма [20, 28]. После прохождения антиген-независимой дифференцировки в красном костном мозге, завершающей стадией которой является проверка способности клетки к переключению класса синтезируемых антител (появление IgD на плазматической мембране), В-лимфоцит перемещается в периферическую кровь [10]. При этом клетка приобретает фенотип IgD^{dim}CD38^{low} и обозначается как Bm1 ("virgin naive") В-клетка. С момента контакта со специфическим АГ начинается антиген-зависимая стадия развития В-клеток, для прохождения которой В-лимфоциту необходимо мигрировать в В-клеточные фолликулы периферических лимфоидных органов. Такие Bm2-клетки, или «активированные "наивные" клетки» (фенотип IgD^{dim}CD38^{dim}), покидают кровяное русло и перемещаются вглубь фолликула, превращаясь в Bm2'-клетки или клетки-предшественники герминативного (зародышевого) центра (фенотип IgD^{dim}CD38^{hi}). В дальнейшем они дифференцируются в клетки герминативного центра — Bm3-центробласты, которые, подвергаясь соматическим гипермутациям в Ig-вариабельных участках генов, трансформируются в Bm4-центроциты, экспрессирующие высокоаффинные антитела (обе популяции обладают

фенотипом IgD^{low}CD38^{hi} и в периферической крови обнаруживаются в очень малом количестве). Часть клеток последней из упомянутых популяций способна к формированию В-клеток памяти, тогда как другая часть популяции Bm4 превращается в плазмобласты. Обе эти субпопуляции характеризуются высокой экспрессией CD27. Параллельно на этой стадии дифференцировки снижается способность к экспрессии IgD на поверхности клеток, так как в зародышевом центре имело место переключение класса синтезируемых антител с IgM на IgG, IgA или IgE. Именно поэтому одна из применяемых в настоящее время классификаций В-клеток базируется на оценке уровней экспрессии IgD и CD27. Ее применение позволяет выявить следующие популяции В-лимфоцитов: «наивные» клетки (IgD^{dim}CD27^{low}) и клетки памяти, которые еще не переключили (“unswitched” IgD^{dim}CD27^{dim}) или уже переключили (“switched” IgD^{low}CD27^{dim}) класс синтезируемых антител [13].

При системных ревматических заболеваниях (СРЗ), сопровождающихся гаммаглобулинемией и поликлональной активацией В-лимфоцитов, наблюдаются значительные изменения в В-клеточных субпопуляциях. Например, у пациентов с первичным синдромом Шегрена (СШ) отмечено снижение Bm1-клеток [9]. Показано, что у детей, больных системной красной волчанкой (СКВ), содержание «наивных» В-клеток и клеток памяти на 90 % снижено, тогда как плазмобластов в 3 раза больше, независимо от активности заболевания и тактики лечения [8]. Обострения СКВ могут коррелировать с выходом в кровоток большого количества плазмобластов [23].

Иммуносупрессивная терапия ревматических заболеваний биологическими и базисными препаратами также влияет на популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов. Обнаружено значимое снижение транзиторных и «наивных» В-клеток под влиянием метотрексата у больных ювенильным идиопатическим артритом [15]. Терапия ритуксимабом у больных СКВ приводит к быстрому сокращению популяций «наивных» В-клеток и клеток памяти [17], а длительное использование белимумаба ведет к сокращению числа плазмобластов [19].

Чтобы проанализировать характер изменений субпопуляций В-клеток при СКВ, а также влияние базовых иммуносупрессивных препаратов (циклофосфана), методом проточной цитофлуориметрии были исследованы субпопуляции В-лимфоцитов у больных, не получавших биологическую терапию и находившихся на лечении в ревматологическом отделении многопрофильного стационара.

Материалы и методы

Были обследованы 25 больных с СКВ (23 женщины, 2 мужчин) в возрасте от 18 до 65 лет, про-

ходивших лечение в СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова с 2014 по 2015 г. Диагнозы устанавливались на основе общепризнанных международных критериев [25].

Группу контроля составили 49 здоровых доноров (28 женщин, 21 мужчина) в возрасте 35-62 лет. В качестве группы сравнения были обследованы 27 больных с системной склеродермией (ССД) и 47 больных с СШ. Из базовой иммуносупрессивной терапии 32% (n = 8) больных СКВ получали последние 3 месяца циклофосфан, 100% (n = 25) — глюкокортикоиды. Венозная кровь здоровых доноров и больных СРЗ была получена путем пункции периферической вены и собрана в вакуумные пробирки с добавлением К₃ЭДТА. Все исследования проводились в день взятия крови. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили согласно рекомендациям, изложенным Байдун Л.А. и соавт. [1]. Для выявления популяции В-лимфоцитов периферической крови использовали антитела против CD45 и CD19. Для анализа распределения В-лимфоцитов по основным субпопуляциям применяли антитела против поверхностных IgD, CD38 и CD27. В работе использовали антитела производства Beckman Coulter (США). Окраску антителами производили в соответствии с рекомендациями производителя. Подбор оптимальных комбинаций антител и конъюгированных с ними флуорохромов производили в соответствии с принципами, изложенными в литературе [2,21]. Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США). Для каждого из образцов анализировали не менее 10 000 одиночных В-лимфоцитов. Удаление слипшихся клеток из зоны анализа производили на основании оценки соотношения пикового и интегрального сигналов по параметрам прямого и бокового светорассеяния для каждой из клеток.

На рисунке 1 представлены варианты классификации В-клеток в зависимости от экспрессии поверхностных маркеров.

Полученные результаты по содержанию субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови выражали в абсолютном значении (клетки/мкл). Все статистические исследования были проведены с помощью непараметрических методов программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Для сравнения субпопуляций В-клеток между исследуемыми нозологиями и группой

контроля был использован критерий Краскела–Уоллиса, а для оценки влияния преимущественной иммуносупрессивной терапии на содержание субпопуляций В-клеток у больных СКВ – критерий Манна–Уитни. Таким образом, было исследовано влияние циклофосфана на субпопуляции В-клеток у больных СКВ. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Мы исследовали содержание различных субпопуляций В-клеток у больных СКВ, ССД, СШ и группы контроля, а также влияние на В-клеточные субпопуляции базисной иммуносупрессивной терапии циклофосфаном

у больных СКВ. Полученные данные касаются изменений только абсолютного количества В-клеток и представлены в данном разделе статьи и таблице 1.

С использованием подхода, основанного на выявлении субпопуляций В-клеток, различающихся по экспрессии поверхностного IgD и CD38 [27] было показано, что количество Vm1-клеток достоверно снижено у больных СКВ по сравнению с контролем ($p < 0,0001$), независимо от терапии циклофосфаном (рис. 2А). Vm2-клетки достоверно ниже у больных СКВ по сравнению с больными ССД, независимо от наличия терапии, и группой контроля ($p < 0,01$) (рис. 2Б). Также было отмечено влияние терапии циклофосфаном на Vm2-субпопуляцию ($p = 0,0003$).

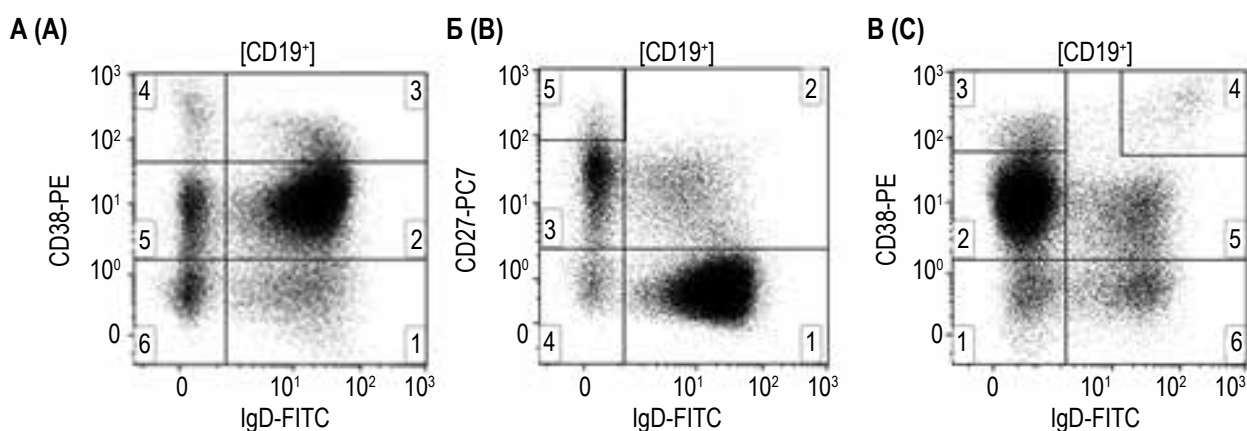


Рисунок 1. Выявление основных субпопуляций В-клеток периферической крови на основании коэкспрессии IgD и CD38 (гистограмма А), IgD и CD27 (гистограмма Б), а также CD27 и CD38 (гистограмма В)

Примечание. Гистограмма А: по оси абсцисс – экспрессии поверхностного IgD, по оси ординат – экспрессии CD38. Популяция 1 – Bm1, “virgin naïve” В-клетки с фенотипом IgD^{dim}CD38^{low}, 2 – активированные «наивные» клетки Bm2 с фенотипом IgD^{dim}CD38^{dim}, 3 – клетки-предшественники герминативного (зародышевого) центра Bm2 с фенотипом IgD^{dim}CD38^{hi}, 4 – популяция центробластов Bm3 и centrocytes Bm4 с фенотипом IgD^{low}CD38^{hi}, 5 и 6 – «ранние» eBm5 и поздние Bm5 В-клетки памяти с фенотипами IgD^{low}CD38^{dim} и IgD^{low}CD38^{low} соответственно.

Гистограмма Б: по оси абсцисс – экспрессии поверхностного IgD, по оси ординат – экспрессии CD27. Популяция 1 – «наивные» клетки (IgD^{dim}CD27^{low}), 2 и 3 – клетки памяти, которые еще не переключили (“unswitched” IgD^{dim}CD27^{dim}) или уже переключили (“switched” IgD^{low}CD27^{dim}) класс синтезируемых антител, 4 – плазмобласты с фенотипом IgD^{low}CD27^{hi}, 5 – «дважды-негативные» В-клетки памяти с фенотипом IgD^{low}CD27^{low}.

Гистограмма В: по оси абсцисс – экспрессии CD27, по оси ординат – экспрессии CD38. Популяция 1 – «дважды-негативные» клетки с фенотипом CD27^{low}CD38^{low}, 2 – зрелые «наивные» В-клетки с фенотипом CD27^{dim}CD38^{low}, 3 – транзиторные В-клетки с фенотипом CD27^{low}CD38^{hi}, 4 – плазмобласты с фенотипом CD27^{hi}CD38^{hi}, 5 – активированные зрелые В-клетки с фенотипом CD27^{dim}CD38^{dim}, 6 – покоящиеся В-клетки памяти с фенотипом CD27^{dim}CD38^{low}.

Figure 1. Detection of main peripheral B cell populations based on IgD and CD38 (histogram A), IgD and CD27 (histogram B), as well as CD27 and CD38 expression (histogram C)

Note. Histogram A: abscissa, surface IgD expression; ordinate, CD38 expression. Population 1, Bm1, virgin naïve B cells with IgD^{dim}CD38^{low} phenotype; 2, activated naïve Bm2 cells with IgD^{dim}CD38^{dim} phenotype; 3, precursor cells from the germinal centre (Bm2) with IgD^{dim}CD38^{hi} phenotype; 4, centroblastic population Bm3 and centrocytes (Bm4) with IgD^{low}CD38^{hi} phenotype; 5 and 6, early eBm5 and late Bm5 B memory cells with, respectively, IgD^{low}CD38^{dim} and IgD^{low}CD38^{low} phenotypes.

Histogram B: Histogram B: abscissa, surface IgD expression; ordinate, CD27 expression; Population 1, naïve cells (IgD^{dim}CD27^{low}); 2 and 3, memory cells (“unswitched” IgD^{dim}CD27^{dim}), or cells re-switched to the antibody production (“switched” IgD^{low}CD27^{dim}); 4, plasmoblasts with IgD^{low}CD27^{hi} phenotype; 5, double-negative memory B cells with IgD^{low}CD27^{low} phenotype.

Histogram C: abscissa, CD27 expression; ordinate, CD38 expression. Population 1, double-negative cells with CD27^{low}CD38^{low} phenotype; population 2, mature naïve B cells with CD27^{dim}CD38^{low} pattern; population 3, transitory B cells with CD27^{low}CD38^{hi} phenotype; population 4, plasmoblasts with CD27^{hi}CD38^{hi} phenotype; population 5, activated mature B cells with CD27^{dim}CD38^{dim} pattern; population 6, resting memory B cells with CD27^{dim}CD38^{low} phenotype.

Для более детального анализа В-клеток, прошедших антиген-зависимую дифференцировку в периферических лимфоидных органах, мы использовали подход, предложенный Mahnke Y.D. [21], в основе которого находился анализ уровней экспрессии поверхностного IgD и CD27, последний из которых рассматривается в качестве основного маркера клеток памяти. Количество IgD^{dim}CD27^{low} «наивных» В-клеток было достоверно снижено у больных СКВ по сравнению с группой контроля и больными ССД, независимо от наличия терапии ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно) (рис. 2В).

У больных СКВ, независимо от терапии, оказалось достоверно выше содержание IgD^{low}CD27^{hi} В-клеток, т.е. плазмобластов, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$) (рис. 2Д). Достоверных различий между больными СКВ с терапией циклофосфаном и без не получено.

Уровень клеток с фенотипом IgD^{dim}CD27^{dim}, отличающим клетки памяти, еще не переключивших класс синтезируемых антител в ходе антиген-зависимой дифференцировки и несущих на своей поверхности IgD, оказался достоверно ниже у больных СКВ по сравнению с контролем ($p < 0,01$). Прием циклофосфана не оказывал существенного влияния на количество «непереключенных» клеток памяти.

Также для анализа субпопуляционного состава В-клеток периферической крови нами оценивались уровни экспрессии CD27 и CD38 [26]. Снижение «наивных» В-клеток с фенотипом CD27^{low}CD38^{dim} было выявлено у больных СКВ по сравнению с контролем и больными СШ, независимо от терапии ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно) (рис. 2Г). Было обнаружено снижение данной субпопуляции у больных СКВ под действием терапии циклофосфаном ($p < 0,05$).

Независимо от проводимой терапии, у группы больных СКВ достоверно выше уровень плазмобластов с фенотипом CD27^{hi}CD38^{hi} при сравнении с группой контроля ($p < 0,001$) (рис. 2Е). В случае терапии циклофосфаном достоверных отличий между больными с терапией циклофосфаном и больными без нее, а также контрольной группой не выявлено.

Обсуждение

При аутоиммунных патологических состояниях отмечаются выраженные изменения субпопуляционного состава В-лимфоцитов периферической крови, функциональная активность которых тесно связана с тяжестью течения таких заболеваний, как СКВ, РА, ССД, рассеянный склероз и сахарный диабет 1 типа [30]. Понимание динамики изменений субпопуляций В-клеток и их роли в патогенезе аутоиммунных заболеваний позволит выработать более эффективную стратегию ведения таких пациентов. Мы исследовали

В-клеточные субпопуляции у больных системными ревматическими нарушениями (СШ, ССД, СКВ), а также оценили потенциальное влияние иммуносупрессивной базисной терапии (циклофосфан) на их содержание при СКВ.

Все три «тактики гейтирования» основных субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови, примененные в ходе данного исследования, показали, что у больных СКВ в циркуляции достоверно снижаются В-клетки «наивных» фенотипов — Bm2 (IgD^{dim}CD38^{dim}), IgD^{dim}CD27^{low} и «наивные» зрелые клетки CD38^{dim}27^{low}. Выявлено, что циклофосфан оказывает существенное влияние на уровень этих клеток в крови больных СКВ. Высокую экспрессию CD38 рассматривают в качестве маркера активации В-лимфоцитов и регуляции плазматических клеток [29]. Наличие на поверхности IgD (фенотип IgD^{dim}CD27^{dim}) указывает на то, что данная популяция клеток памяти еще не переключила класс синтезируемых антител, а клетки называют «непереключенные» В-клетки, которые синтезируют только IgD.

Влияние циклофосфана на субпопуляционный состав В-клеток отмечено и в зарубежных исследованиях. Исследовательская группа из госпиталя Шарите обнаружила, что у пациентов с СКВ, получавших более интенсивную терапию (азатиоприн, циклофосфан и циклоспорин), наблюдалось достоверное снижение CD27^{low} «наивных» В-клеток ($p = 0,0008$) [18]. Подробный механизм действия циклофосфана в отношении субпопуляций В-клеток остается не изученным. В одной из работ было высказано предположение о том, что влияние циклофосфана на сокращение пула «наивных» В-клеток связано с особой чувствительностью субпопуляции к данному цитостатику [14].

Также было отмечено достоверное повышение IgD^{low}CD27^{hi} и CD27^{hi}CD38^{hi} плазмобластов у больных СКВ, независимо от наличия терапии, по сравнению с группой контроля. Влияния терапии циклофосфаном на данную субпопуляцию отмечено не было. Так как при аутоиммунных заболеваниях часто наблюдается гиперпродукция аутоантител, не удивительно, что был обнаружен высокий уровень предшественников плазматических клеток, функция которых заключается в выработке антител в ходе дальнейшей дифференцировки [12]. В таком случае плазмобласты могут являться потенциальной мишенью терапии. При изучении влияния циклофосфана на клеточные и серологические параметры не было обнаружено значимых изменений в уровне плазмобластов после 15-недельного курса данного цитостатика. Была выявлена корреляционная взаимосвязь между уровнем плазмобластов и активностью заболевания по шкале SLEDAI 2k ($r = 0,1547$, $p = 0,0350$) [14]. Однако, несмотря на резистентность предшественников плазматических клеток к цитостатику, активность заболевания снизи-

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ ЦИКЛОФОСФАНОМ НА ИЗМЕНЕНИЕ АБСОЛЮТНОГО СОДЕРЖАНИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ В-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ (КЛЕТКИ/МКЛ) У БОЛЬНЫХ СКВ [Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)]

TABLE 1. INFLUENCE OF CYCLOPHOSPHAN THERAPY ON CHANGES IN B-CELL SUBPOPULATIONS OF THE SLE PATIENTS' PERIPHERAL BLOOD (ABSOLUTE B-CELL COUNT PER MICROLITER) [Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)]

Субпопуляции В-клеток B-cell subpopulations	Циклофосфан (ц) Cyclophosphan (c)		Контроль Control group (n = 49)	Достоверность различий, p Statistical significance, p
	СКВ ц+ SLE c+ (n = 8)	СКВ ц- SLE c- (n = 17)		
	1	2		
Bm1 (IgD ^{dim} CD38 ^{low})	0,14 (0,06; 0,42)	0,48 (0,25; 0,96)	1,51 (1,04; 1,84)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ < 0,001
Bm2 (IgD ^{dim} CD38 ^{low})	0,85 (0,5; 2,66)	4,23 (3,23; 6,40)	6,99 (4,84; 9,38)	p ₁₋₂ = 0,042 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,013
Плазмобласты Plasmablasts (IgD ^{low} CD27 ^{hi})	0,04 (0,02; 0,08)	0,08 (0,04; 0,10)	0,02 (0,01; 0,05)	p ₂₋₃ = 0,002
«Наивные» "Naive" (IgD ^{dim} CD27 ^{low})	0,74 (0,29; 4,13)	5,10 (2,97; 7,59)	7,69 (5,19; 10,8)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,046
Клетки памяти Memory cells IgD ^{dim} CD27 ^{dim}	0,39 (0,09; 0,92)	0,99 (0,21; 1,5)	1,67 (1,1; 2,4)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,004
«Наивные» зрелые "Naive" mature CD27 ^{low} CD38 ^{dim}	0,94 (0,35; 2,8)	3,80 (2,15; 6,24)	6,424 (4,3; 8,7)	p ₁₋₂ = 0,048 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,029
Плазмобласты Plasmablasts (CD27 ^{hi} CD38 ^{hi})	0,04 (0,02; 0,08)	0,07 (0,03; 0,13)	0,02 (0,01; 0,02)	p ₂₋₃ < 0,001

Примечание. СКВ – системная красная волчанка; ц – циклофосфан; «+» и «-» – наличие или отсутствие терапии; Me – медиана; n – количество.

Note. SLE, systemic lupus erythematosus; c, cyclophosphan; «+» and «-», presence or absence of therapy; Me, median; n, number.

лась при лечении циклофосфаном согласно шкале SLEDAI 2k (до терапии 14 [2-30] баллов, после терапии 12 [0-18] баллов, p = 0,0019) [14]. В другом исследовании немецкой научной группы терапия азатиоприном, циклофосфаном и циклоспорином никак не повлияла на плазмобласты у больных СКВ. Также была отмечена корреляция между уровнем плазмобластов и активностью заболевания (r = 0,2618, p = 0,0433) [18].

Изменения были обнаружены и в субпопуляции В-клеток памяти. Было отмечено снижение созревания клеток памяти с фенотипом IgD^{dim}CD27^{dim}. Данные литературы указывают на то, что у больных с синдромом Шегрена образованные в герминативном центре CD27^{dim}IgD^{low} В-клетки памяти остаются в слюнных железах. Их количество, наряду с CD27^{dim}IgD^{dim} В-клетками памяти, пропорционально уменьшено в периферической крови, что совпадает и с полученными нами результатами [24]. В ходе собственного исследования влияния терапии на сокращение IgD^{dim}CD27^{dim} В-клеток памяти обнаружено не было. Аналогичные результаты были получены и другой группой исследователей, которым также

не удалось выявить изменений в субпопуляциях IgD^{dim}CD27^{dim} и CD27^{dim}IgD^{low} клеток памяти после 15-недельных курсов циклофосфамида [14]. Хотя в рамках еще одного исследования у больных СКВ под действием циклофосфамида, азатиоприна и циклоспорины CD27^{dim} В-клетки памяти были достоверно снижены (p = 0,0209) [26]. Наглядные изменения субпопуляций В-клеток у больных СКВ, независимо от наличия терапии, приведены на рисунке 3.

В настоящее время в лечении аутоиммунных заболеваний активно используются биологические препараты, в частности ритуксимаб и белимумаб. Ритуксимаб – моноклональные антитела против антигена CD20, который экспрессируется на поверхности В-клеток вплоть до клеток памяти и теряется у плазмобластов. Применение ритуксимаба в качестве терапии СКВ до сих пор остается спорным в связи с различными данными о его эффективности [22]. Тем не менее ритуксимаб рекомендован Европейской антиревматической лигой в качестве препарата при волчаночном нефрите, трудно поддающемся лечению. Белимумаб представляет собой человеческие

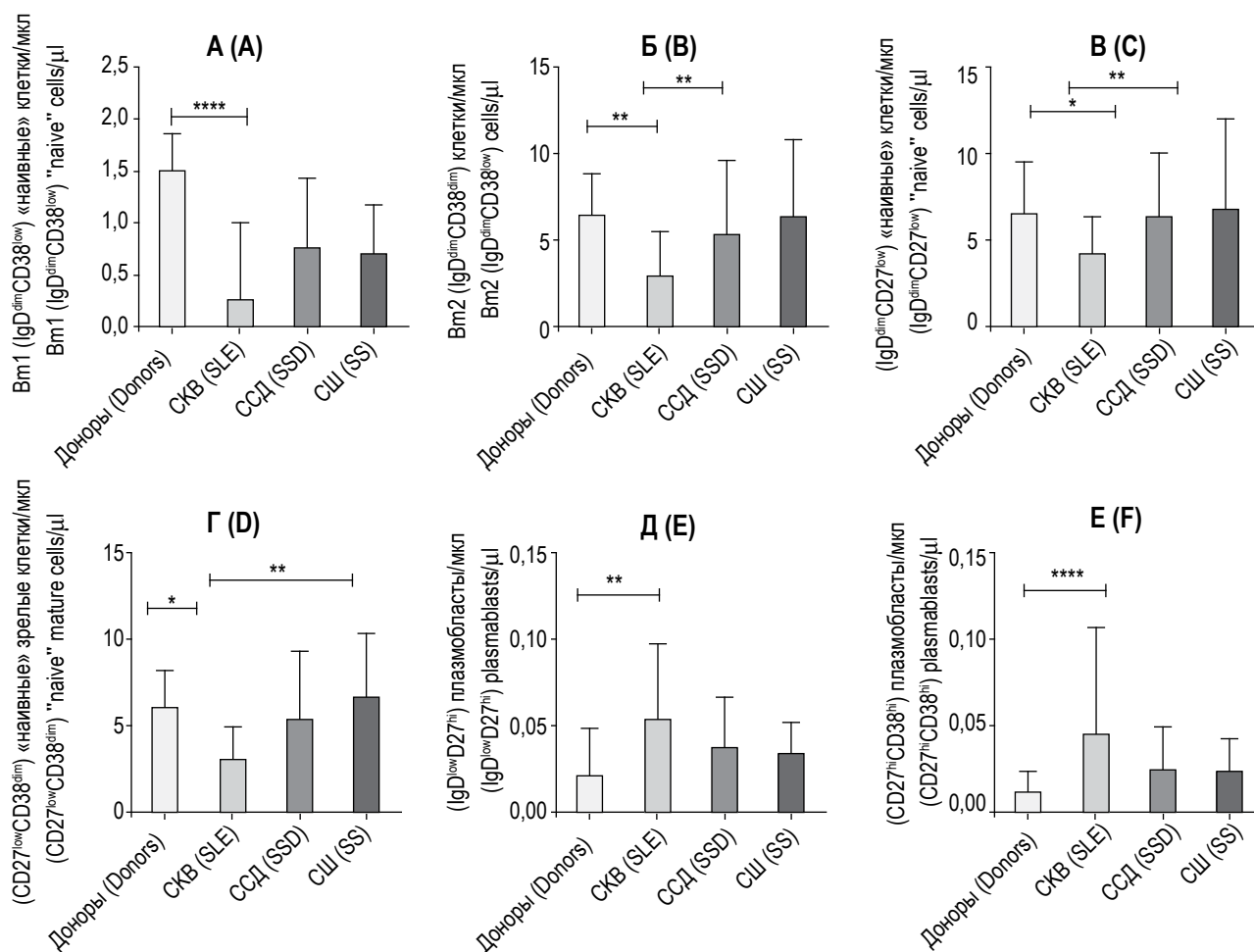


Рисунок 2. Субпопуляционный состав В-клеток периферической крови больных СКВ, ССД, СШ, независимо от наличия терапии, и группы контроля на основании коэкспрессии IgD и CD38 (гистограммы А, Б), IgD и CD27 (гистограммы В, Д), а также CD27 и CD38 (гистограммы Г, Е)

Примечание. А, Б – сравнение субпопуляций Bm1-, Bm2-клеток больных СКВ с субпопуляциями Bm1-, Bm2-клеток группы контроля и больных ССД и СШ.

В – сравнение субпопуляции 27-vs-IgD «наивных» клеток больных СКВ с субпопуляцией 27-vs-IgD «наивных» клеток группы контроля и больных ССД и СШ.

Г – сравнение субпопуляции 27-vs-38 «наивных» клеток больных СКВ с субпопуляцией 27-vs-38 «наивных» клеток группы контроля и больных ССД и СШ.

Д – сравнение субпопуляции 27-vs-IgD плазмобластов больных СКВ с субпопуляцией 27-vs-IgD плазмобластов группы контроля и больных ССД и СШ.

Е – сравнение субпопуляции 27-vs-38 плазмобластов больных СКВ с субпопуляцией 27-vs-38 плазмобластов группы контроля и больных ССД и СШ.

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; **** – $p < 0,0001$.

Figure 2. Subpopulation profile of peripheral blood B cells in SLE, SSD, SS independently on therapy, and control group, as based on IgD/CD38 co-expression (histograms A, B), IgD and CD27 (histograms C and D), as well as CD27 and CD38 (histograms E, F).

Note. A, B, Comparisons between Bm1, Bm2 cells in SLE patients with Bm1, Bm2 subpopulations in control groups, SSD and SS patients.

C, Comparisons between 27-vs-IgD "naïve" cells in SLE patients with 27-vs-IgD "naïve" cells in control groups, SSD and SS patients.

D, Comparisons between 27-vs-38 "naïve" cells in SLE patients with 27-vs-38 "naïve" cells in control groups, SSD and SS patients.

E, Comparisons between 27-vs-IgD plasmablasts in SLE patients with 27-vs-IgD plasmablasts in control groups, SSD and SS patients.

F, Comparisons between 27-vs-38 plasmablasts in SLE patients with 27-vs-38 plasmablasts in control groups, SSD and SS patients.

*, the difference is significant by $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.001$.

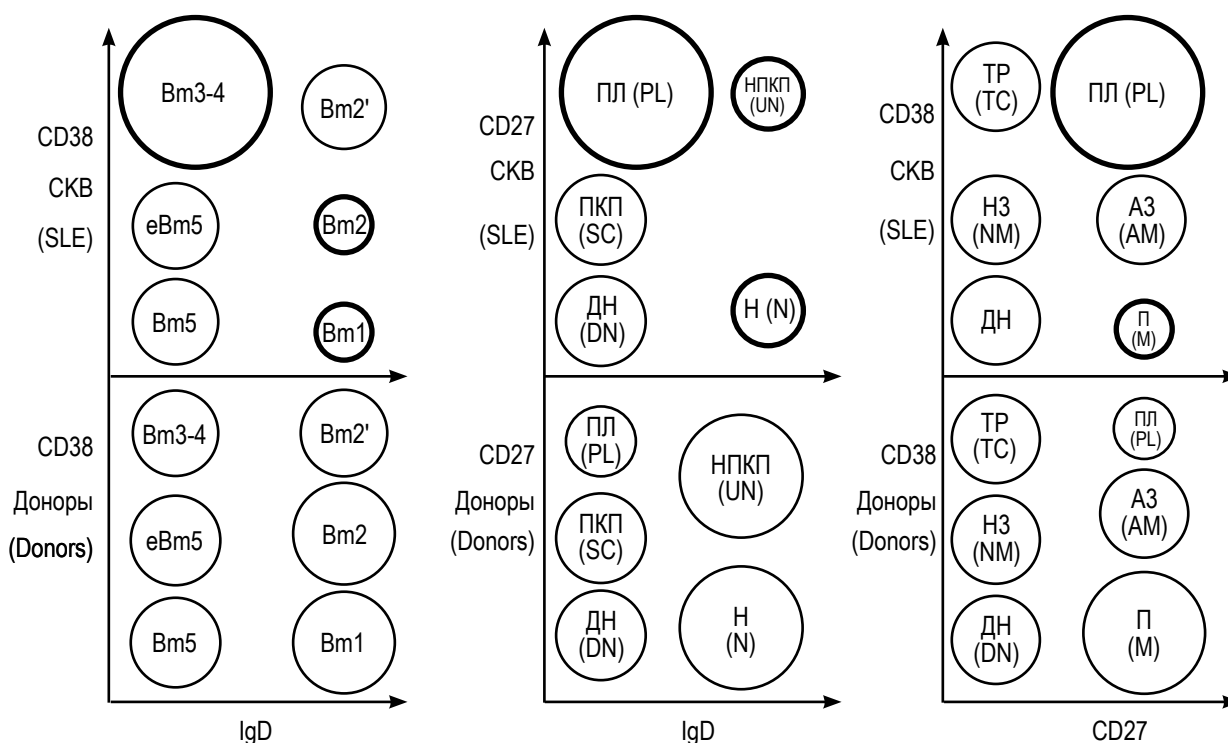


Рисунок 3. Сравнение В-клеточных субпопуляций между больными СКВ и донорами

Примечание. Размер круга отражает численность субпопуляций, увеличение толщины контура – изменение относительно группы контроля.

ПЛ – плазмобласты; П – В-клетки памяти; ПКП – «переключенные» В-клетки памяти; НПКП – «непереключенные» В-клетки памяти; ДН – двойные негативные клетки; Н – «наивные» клетки; НЗ – «наивные» зрелые клетки; ТР – транзиторные клетки; АЗ – активированные зрелые.

Figure 3. Comparison of B cell subpopulations in SLE patients and normal donors

Note. The circle diameter depicts a subpopulation size. Thicker contours mean significant changes against control group. PL, plasmoblasts; M, memory B cells; SC, "switched" memory B cells; UN, "non-switched" memory B cells; DN, double-negative cells; N, "naïve" cells; NM, "naïve" mature cells; TC, transition cells; AM, activated mature cells.

моноклональные антитела против BLys (стимулятора роста и пролиферации В-лимфоцитов). Однако к данному препарату плазмобласты тоже мало чувствительны.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при аутоиммунных заболеваниях патогенетические механизмы заболеваний и терапия приводят к сдвигам в содержании субпопуляций В-клеток. Однако необходимо отметить отсутствие влияния базисных препаратов у больных СКВ в отношении повышенного числа такой субпопуляции, как плазмобласты, вырабатывающей в большом количестве антитела. Учи-

тывая максимально двухнедельный срок жизни плазмобластов и отсутствие экспрессии CD20 антигена на их поверхности, возникает вопрос об актуальности базисной терапии и терапии ритуксимабом. Следовательно, необходимо продолжить изучение клинической значимости терапии, направленной против В-клеток. Использование в качестве мишени иммуносупрессивной терапии определенных субпопуляций В-клеток, возможно, является одним из перспективных способов достижения скорой и длительной ремиссии.

Список литературы / References

1. Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А., Хайдуков С.В. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением Проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С.255-268. [Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A., Khaydukov S.V. Standardized technology "Peripheral blood Lymphocyte subpopulations by using of flow cytometry-analizators" (proect). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. [In Russ.] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2012-3-255-268>
2. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестцветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryatsev I.V.,

Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp.19-26. [In Russ.] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-19-26>

3. Лазарева Н.М., Лапин С.В., Мазинг А.В., Булгакова Т.В., Иливанова Е.П., Маслянский А.Л., Тотолян А.А. Оптимизация комплекса серологических методов диагностики системных заболеваний соединительной ткани // Клиническая лабораторная диагностика, 2011. № 12. С. 12-17. [Lazareva N.M., Lapin S.V., Mazing A.V., Bulgakova T.V., Ilvanova E.P., Maslyansky A.L., Totolian A.A. Optimization of serological diagnostic methods of connective tissue diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2011, no. 12, pp. 12-17. [In Russ.]

4. Маслянский А.Л., Пенин И.Н., Чешуина М.Д., Тришина И.Н., Новикова А.Н., Колесова Е.П., Лазарева Н.М., Мазинг А.В., Лапин С.В., Малышкин К.А., Сысоев К.А., Мазуров В.И., Конради А.О., Назаров П.Г. Общие закономерности продукции цитокинов и хемокинов у больных диффузными заболеваниями соединительной ткани, воспалительными артропатиями и атеросклерозом // Цитокины и воспаление, 2014. Т. 13, № 3. С. 9-21. [Maslyanskiy A.L., Penin I.N., Cheshuina M.D., Trichina I.N., Novikova A.N., Kolesova E.P., Lazareva N.M., Mazing A.V., Lapin S.V., Malishkin K.A., Sysoev K.A., Mazurov V.I., Konradi A.O., Nazarov P.G. Common consistent patterns of the cytokine and chemokine production in patients with diffuse connective tissue diseases, inflammatory arthropathies and atherosclerosis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2014, Vol. 13, no. 3, pp. 9-21. [In Russ.]

5. Насонов Е. Л., Соловьев С. К. Перспективы применения моноклональных антител к В-лимфоцитам (ритуксимаб) при воспалительных ревматических заболеваниях // Научно-практическая ревматология, 2007. № 1. С. 4-8. [Nasonov E.L., Solovyev S.K. Perspectives of monoclonal anti-B lymphocyte antibodies (rituximab) administration in inflammatory rheumatic diseases. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2007, no. 1, pp. 4-8. [In Russ.]

6. Созина А.В., Неустроева Ю.А., Тихомирова Т.А., Лапин С.В. Сочетанная встречаемость аутоантител у больных с диффузными болезнями соединительной ткани // Медицинская иммунология, 2007. Т. 9, № 1. С. 61-68. [Sozina A.V., Neustroeva U.A., Tihomirova T.A., Lapin S.V. Coincidence of autoantibodies among patients with diffuse connective tissue disorders. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2007, Vol. 9, no. 1, pp. 61-68. [In Russ.] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2007-1-61-68>

7. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. С. 354-479. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010, pp. 354-479.

8. Arce E., Jackson D.G., Gill M.A., Bennett L.B., Banchereau J., Pascual V. Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*, 2001, Vol. 8, p. 167.

9. Binard A., Le Pottier L., Devauchelle V., Saraux A., Youinou P., Pers J.O. Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjögren syndrome? *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2009, Vol. 68, p. 447.

10. Bohnhorst J.Q., Björger M.B., Thoen J.E., Natvig J.B., Thompson K.M. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *The Journal of Immunology*, 2001, Vol. 10, p. 167.

11. Cancro M.P., Hao Y., Scholz J.L., Riley R.L., Frasca D., Dunn-Walters D.K., Blomberg B.B. B cells and aging: molecules and mechanisms. *Trends Immunol.*, 2009, Vol. 30, no. 7, pp. 313-318.

12. Dörner T., Jacobi A.M., Lipsky P.E. B cells in autoimmunity. *Arthritis Research & Therapy*, 2009, Vol. 11, no. 5, p. 247.

13. Duchamp M. B-cell subpopulations in children: national reference values. *Immunity, Inflammation and Disease*, 2014, Vol. 11, pp. 131-140.

14. Fassbinder T., Saunders U., Mickholz E., Jung E., Becker H., Schlüter B., Jacobi A.M. Differential effects of cyclophosphamide and mycophenolate mofetil on cellular and serological parameters in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 2015, Vol. 17, no. 1, p. 92.

15. Glaesener S., Quách T.D., Onken N., Weller-Heinemann F., Dressler F., Huppertz H.I., Thon A., Meyer-Bahlburg A. Distinct effects of methotrexate and etanercept on the b cell compartment in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 2014, Vol. 66, no. 9, pp. 2590-2600.

16. Hampe C.S. B cells in autoimmune diseases. *Scientifica*, 2012, Vol. 9, pp. 1-18.

17. Iwata S., Saito K., Tokunaga M., Yamaoka K., Nawata M., Yukawa S., Hanami K., Fukuyo S., Miyagawa I., Kubo S., Tanaka Y. Phenotypic changes of lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus who are in longterm remission after B cell depletion therapy with rituximab. *The Journal of Rheumatology*, 2011, Vol. 38, no. 4, pp. 633-641.

18. Jacobi A.M., Odendahl M., Reiter K., Bruns A., Burmester G.R., Radbruch A., Valet G., Lipsky P.E., Dörner T. Correlation between circulating cd27high plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 2003, Vol. 48, no. 5, pp. 1332-1342.

19. Jacobi A.M., Weiqing W.H., Tao, Freimuth W., Inaki S., Furie R., Mackay M., Aranow C., Diamond B., Davidson A. The effect of prolonged treatment with belimumab on b cells in human SLE. *Arthritis & Rheumatology*, 2010, Vol. 62, no. 1, pp. 201-210.

20. Leandro M.J. B-cell subpopulations in humans and their differential susceptibility to depletion with anti-CD20 monoclonal antibodies. *Arthritis Research & Therapy*, 2013, Vol. 15, Suppl 1, S3.

21. Mahnke Y.D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clinics in Laboratory Medicine*, 2007, Vol. 27, pp. 469-485.

22. Mariele Gatto, Emese Kiss, Yaakov Naparstek, and Andrea Doria. In-/off-label use of biologic therapy in systemic lupus erythematosus. *BMC Medicine*, 2014, Vol. 12, p. 30.

23. Odendahl M., Keitzer R., Wahn U., Hiepe F., Radbruch A., Dörner T., Bunikowski R. Perturbations of peripheral b lymphocyte homeostasis in children with systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2003, Vol. 62, pp. 851-858.

24. Pers J.O., Youinou P. Are the B cells cast with the leading part in the Sjögren's syndrome scenario? *Oral Diseases*, 2014, Vol. 20, no. 6, pp. 529-537.

25. Petri M., Orbai A.M., Alarcon G.S., Gordon C., Merrill J.T., Fortin P.R., et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*, 2012, Vol. 64, no. 8, pp. 2677-2686.
26. Prak Luning E.T., Ross J., Sutter J., Sullivan K.E. Age-related trends in pediatric B-cell subsets. *Pediatric and Developmental Pathology*, 2011, Vol. 14, no. 1, pp. 45-52.
27. Sanz I., Wei C., Lee F.E., Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Seminars in Immunology*, 2008, Vol. 20, no. 1, pp. 67-82.
28. Vale A.M., Kearney J.F., Nobrega Alberto, Schroeder H.W. Molecular biology of B cells. 3rd ed. 2015, pp. 99-119.
29. Vences-Catalan F., Santos-Argumedo L. CD38 Through the life of a murine B lymphocyte. *IUBMB Life*, 2011, Vol. 63, no. 10, pp. 840-846.
30. Yanaba K., Bouaziz J.D., Matsushita T., Magro C.M., St. Clair E.W., Tedder T.F. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunological Reviews*, 2008, Vol. 223, no. 6, pp.284-299.

Авторы:

Будкова А.И. — врач-интерн клиники факультетской терапии, младший научный сотрудник лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний, Научно-методический Центр по молекулярной медицине ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Лалин С.В. — к.м.н., заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний, Научно-методический центр по молекулярной медицине ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Серебрякова М.К. — инженер, Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики; научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Тришина И.Н. — врач-ревматолог, отделение ревматологии ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Маслянский А.Л. — к.м.н., старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории ревматологии ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Budkova A.I., Junior Research Associate, Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases, Center for Molecular Medicine, Pavlov First St. Petersburg State Medical University; Internship Doctor of Therapy Clinic, Center for Molecular Medicine, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Lalin S.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases, Center for Molecular Medicine, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Serebriakova M.K., Engineer, St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics; Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Assistant Professor, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Trishina I.N., Rheumatologist, Department of Rheumatology, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Maslyansky A.L., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Laboratory of Rheumatology, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, St. Petersburg Pasteur Institute; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 22.11.2016
Принята к печати 24.11.2016

Received 22.11.2016
Accepted 24.11.2016

ПОЛИМОРФИЗМ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ И ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Силков А.Н.¹, Чердынцева Н.В.², Максимов В.Н.³, Сенников С.В.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

² ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»,
г. Томск, Россия

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Поиск молекулярно-генетических маркеров риска и прогноза рака молочной железы является одним из актуальных направлений современных исследований. Множество молекулярных механизмов, вовлеченных в патогенез рака молочной железы, определяет широкий спектр возможных генов-кандидатов. Одними из потенциальных кандидатов являются гены рецепторов провоспалительных цитокинов, например фактора некроза опухоли и интерлейкина-1. Для них показано наличие функциональных аллельных вариантов, ассоциированных с изменением уровня экспрессии растворимых и мембраносвязанных форм рецепторов. Кроме того, они представлены как на иммунокомпетентных клетках, так и на клетках эпителия и эндотелия и регулируют функциональное состояние клеток, активность синтеза ферментов межклеточного матрикса и факторов ангиогенеза, что и определяет вклад этих рецепторных белков в патогенез опухолевого роста. Целью настоящего исследования был сравнительный анализ частот аллельных вариантов генов рецепторов TNF и IL-1 у больных раком молочной железы и здоровых женщин. Проведено генотипирование полиморфизмов rs4149569 *TNFRSF1A*, rs590368 *TNFRSF1B*, rs2234650 *IL1R1* и rs4141134 *IL1R2*, для которых ранее была установлена ассоциация с уровнем экспрессии рецепторов TNF и IL-1 на иммунокомпетентных клетках. Сравнительный анализ частот генотипов в исследованных выборках показал значимое снижение частоты гомозигот СС полиморфизма rs590368 гена *TNFRSF1B* и увеличение числа гетерозигот СТ полиморфизма rs2234650 гена *IL1R1* в выборке больных раком молочной железы. Генетический полиморфизм, ассоциированный с уровнем экспрессии рецепторов TNF и IL-1 на иммунокомпетентных клетках, может являться одним из факторов, регулирующих участие провоспалительных цитокинов в иммунопатогенезе рака молочной железы.

Ключевые слова: рецепторы цитокинов, генетический полиморфизм, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*, *IL1R1*, *IL1R2*, рак молочной железы

PROMOTER POLYMORPHISMS OF GENES ENCODING TUMOR NECROSIS FACTOR AND INTERLEUKIN-1 IN BREAST CANCER PATIENTS

Silkov A.N.^a, Cherdyntseva N.V.^b, Maximov V.N.^c, Sennikov S.V.^a

^a Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

^b Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

^c Research Institute of Therapy and Preventive Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Search for molecular genetic markers of risk and prognosis of breast cancer is an important prospective of modern research. Many molecular mechanisms are involved in pathogenesis of breast cancer

Адрес для переписки:

Сенников Сергей Витальевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 222-19-10.
Факс: 8 (383) 222-74-28.
E-mail: sennikovsv@gmail.com

Образец цитирования:

А.Н. Силков, Н.В. Чердынцева, В.Н. Максимов,
С.В. Сенников «Полиморфизм промоторов генов
рецепторов фактора некроза опухоли и интерлейкина-1
у больных раком молочной железы» // Медицинская
иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 185–190.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-185-190
© Силков А.Н. и соавт., 2017

Address for correspondence:

Sennikov Sergey V.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 222-19-10.
Fax: 7 (383) 222-74-28.
E-mail: sennikovsv@gmail.com

For citation:

A.N. Silkov, N.V. Cherdyntseva, V.N. Maximov, S.V. Sennikov
“Promoter polymorphisms of genes encoding tumor necrosis factor
and interleukin-1 in breast cancer patients”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 2,
pp. 185–190.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-185-190
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-2-185-190

and define a wide range of possible candidate genes. The genes of pro-inflammatory cytokine receptors, such as tumor necrosis factor and interleukin-1, are also among potential candidate genes. Numerous functional allelic variants of these genes have been shown which are associated with changed expression of membrane-bound and soluble forms of the receptors. In addition, they are expressed both on immune cells and epithelial and endothelial cells. They regulate functional status of the cells, synthesis and activities of enzymes controlling extracellular matrix and angiogenesis factors. These functions of tumor necrosis factor and interleukin-1 receptor proteins may contribute to pathogenesis of tumor growth. The aim of present study was to compare frequency of functional allelic variants of genes encoding TNF and IL-1 receptors in breast cancer patients and healthy women. We performed genotyping of distinct SNPs (*rs4149569 TNFRSF1A*, *rs590368 TNFRSF1B*, *rs2234650 IL1RI*, and *rs4141134 IL1R2*) that previously were shown to be associated with expression of TNF and IL-1 receptors on immune cells. Comparative analysis of the genotype frequencies in the samples under study showed a significantly reduced frequency of CC homozygotes for rs590368 polymorphism (*TNFRSF1B* gene), and increased ratio of CT heterozygotes for rs2234650 polymorphism (*IL1RI* gene) among breast cancer patients. Hence, some gene polymorphisms associated with altered expression levels of TNF and IL-1 receptors on immune cells may represent a factor which may determine involvement of proinflammatory cytokines into pathogenesis of breast cancer.

Keywords: cytokine receptors, gene polymorphism, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*, *IL1RI*, *IL1R2*, breast cancer

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний в нашей стране. В 2013 г. заболеваемость раком молочной железы составила 20,4% в общей структуре онкологической патологии среди женщин, а темпы роста заболеваемости РМЖ составляют 4-7% в год по России и 1-2% по данным общемировой статистики. Однако смертность при этой патологии в последние годы демонстрирует тенденцию к снижению, связано это с развитием средств ранней диагностики РМЖ [1, 7].

РМЖ является мультифакториальным заболеванием, среди патогенетических факторов его развития отмечают наследственные (генетические), эндогенные (гормональный и метаболический), экзогенные (факторы внешней среды). По разным оценкам генетический фактор при РМЖ составляет от 20 до 50% [3, 8]. В этой связи среди средств ранней диагностики и скрининга групп риска одним из перспективных подходов является типирование ДНК, а поиск генетических маркеров, ассоциированных с РМЖ, является актуальной задачей.

Значимость иммунной системы в патогенезе злокачественных заболеваний не вызывает сомнений, а конкретные пути иммунопатогенеза являются целью перспективных исследований [6]. Так, белки цитокиновой сети, TNF α и IL-1 β , а также их рецепторы являются одним из центральных элементов в регуляции воспалительных иммунных реакций, контролируемых транскрипционным фактором NF- κ B, который играет одну из ключевых ролей в поддержании роста опухолевых клеток при раке молочной железы [5, 10, 13, 14].

Ранее было показано, что белки семейства IL-1, его рецепторы и антагониста рецепторов активно экспрессируются в клетках опухоли и их микро-

окружении и являются необходимым фактором индукции вторичного каскада регуляторных молекул, обеспечивающих онкогенез и рост опухоли [9]. Также установлено, что ангиогенные эффекты IL-1 опосредованы сигнальными путями, активирующимися через рецепторные белки IL-1 [14]. Аналогичным образом эффект TNF α на рост клеток рака молочной железы определяется активацией сигнальных путей, ассоциированных с его рецепторами TNFR1 и TNFR2 и приводящих либо к активации апоптоза либо к активации NF- κ B и росту опухолевых клеток [9].

В наших предыдущих исследованиях были выявлены аллельные варианты промоторных регионов рецепторов TNF и IL-1, ассоциированные с изменением уровня экспрессии соответствующих белков на разных популяциях иммунокомпетентных клеток [11, 12]. **Целью данной работы** был сравнительный анализ частот аллелей генов рецепторов IL-1 и TNF у больных раком молочной железы и здоровых женщин Западной Сибири.

Материалы и методы

Исследованные выборки

Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, было получено разрешение локального комитета по биомедицинской этике НИИ онкологии (г. Томск). В исследование включены ДНК 249 больных инфильтрирующим операбельным раком молочной железы стадии T1-4N0-3M0, получавших лечение в 1996-2006 годах в НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН. Средний возраст женщин на момент заболевания составил 51,5 лет (20-79 лет). В качестве группы популяционного контроля была использована сопоставимая по возрасту выборка из 230 женщин, жительниц Новосибирска, на основе данных банка ДНК НИИ терапии

СО РАМН (г. Новосибирск). Образцы ДНК хранились в НИИФКИ при -70 °С.

Генотипирование

Генотипирование проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей рестрикцией продукта амплификации. ПЦР проводили с использованием амплификатора PTC-200 DNA Engine (MJ Research inc., США). Реакционная смесь в объеме 20 мкл содержала 1-2 ед. Taq-ДНК полимеразы («Сибэнзим», г. Новосибирск), 0,5 мкМ каждого из праймеров, 0,25 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 50-200 нг геномной ДНК. Все праймеры были синтезированы в ЗАО «Биосан» (г. Новосибирск). Генотипирование проводилось с использованием опубликованной структуры праймеров [4, 13].

Продукты амплификации подвергали рестрикции соответствующими эндонуклеазами: TNFR1 – 1207 – Bst8C I, TNFR2 – 3609 – Msp I. Рестрикционная смесь включала 2,5-5 мкл амплификата и 5-10 единиц активности ферментов в оригинальном буфере производителя, инкубирование проводили согласно рекомендациям производителя фермента («Сибэнзим», г. Новосибирск).

Продукты амплификации и рестрикции анализировали с помощью капиллярного электрофореза на станции QIAxcel (Qiagen) или электрофореза в 2% агарозном геле. В качестве маркера молекулярного веса использовали гидролизат плазмиды pUC19, полученный при

расщеплении рестриктазой Msp I («Сибэнзим», г. Новосибирск) и QX DNA Size Marker100bp-3kb (Qiagen). Продукты полимеразной цепной реакции и рестрикции, при разделении в агарозных гелях, визуализировали в ультрафиолетовом свете, молекулярный вес фрагментов оценивался с помощью видеоденситометра и пакета прикладных программ ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech, США).

Статистическая обработка проводилась с использованием стандартных подходов с помощью онлайн-калькуляторов OpenEpi (www.openepi.com) и GenExpert [http://gen-exp.ru/calculator_or.php]. Оценку соответствия частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга проводили, используя критерий χ^2 . Различия частот аллелей и генотипов устанавливалось с использованием критерия χ^2 с поправкой Йетса. Проводилась оценка отношения шансов и 95% доверительного интервала (OR, CI), а также оценка относительного риска.

Результаты

Генотипирование проведено для полиморфизмов: rs4149569 (-1207 G/C) *TNFRSF1A*, rs590368 (-3609 C/T) *TNFRSF1B*, rs2234650 (-12075 C/T) *IL1R1* и rs4141134 (-1780 T/C) *IL1R2*. Полученное распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов рецепторов TNF и IL-1 у здоровых женщин соответствовало ожи-

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ TNF И IL-1 I И II ТИПОВ У БОЛЬНЫХ РМЖ И ЗДОРОВЫХ ЖИТЕЛЬНИЦ ЮГО-ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

TABLE 1. FREQUENCIES OF GENOTYPES AND POLYMORPHIC ALLELES OF TNF AND IL-1 RECEPTORS (TYPE I AND II) IN BREAST CANCER PATIENTS AND HEALTHY FEMALES FROM SOUTH-WESTERN SIBERIA

SNP	Генотип Genotype	Частота генотипа, % Genotype frequency, %			
		Здоровые Healthy		РМЖ Breast cancer	
<i>TNFRSF1A</i> G/C -1207 (rs4149569)	GG	N = 230	34,8	N = 249	34,9
	GC		48,7		50,6
	CC		16,5		14,5
<i>TNFRSF1B</i> C/T -3609 (rs590368)	CC	N = 230	35,3	N = 248	23,6*
	CT		50,7		59,6
	TT		14		16,8
<i>IL1R1</i> C/T -12075 (rs2234650)	CC	N = 230	21,6	N = 248	14,9
	CT		57,6		70,7*
	TT		20,8		14,4
<i>IL1R2</i> T/C -1780 (rs4141134)	TT	N = 229	38,9	N = 249	37,9
	TC		51		50
	CC		10,1		12,1

Примечание. * – статистически значимые различия частот от ожидаемых равновесных значений.

Note. *, statistically significant differences of actual genotype frequencies from expected equilibrium values.

даемому равновесию Харди–Вайнберга и представлено в таблице 1. У больных РМЖ равновесие соблюдалось для SNP rs4149569 и rs4141134. Далее мы провели сравнительный анализ частот в исследованных выборках.

У больных РМЖ не выявлено значимых изменений в частоте аллелей и генотипов в SNP -1207G/C (rs4149569) гена *TNFRSF1A* (рецептор 1 типа). Анализ полиморфизма rs590368 (-3609 C/T) гена *TNFRSF1B* (рецептор 2 типа) выявил у больных небольшое, но значимое снижение частоты гомозиготного носительства аллеля С (табл. 2), ассоциированного в норме со снижением числа CD14⁺ моноцитов, несущих рецептор TNF 2 типа.

Исследование частоты аллелей и генотипов полиморфных позиций в промоторе генов рецепторов IL-1 показало увеличение числа гетерозигот СТ полиморфизма rs2234650 (-12075 C/T) гена *IL1R1* в выборке больных РМЖ (табл. 2). В норме этот генетический вариант был ассоциирован с повышенной экспрессией рецептора 1 типа к IL-1 на моноцитах.

Анализ частот сочетаний генотипов изученных полиморфных вариантов промоторов генов рецепторов TNF и IL-1 не выявил статистически значимых различий между выборками больных РМЖ и условно здоровыми женщинами (табл. 3).

В предыдущих исследованиях была выявлена связь ряда генетических полиморфизмов с клинико-патологическими особенностями рака молочной железы [2]. Статистический анализ результатов генотипирования полиморфизма промоторов рецепторов, полученных в подгруппах с разным гистологическим типом опухоли, ее размерами, метастазированием и т.д., не выявил значимых ассоциаций генетических вариантов рецепторов IL-1 и TNF с особенностями течения заболевания.

Обсуждение

В наших предыдущих работах на популяционной выборке условно здоровых доноров у носителей разных аллельных вариантов были показаны значимые отличия экспрессии рецепторов к TNF и IL-1 между субпопуляциями Т- и В-лимфоцитов и моноцитов, как по проценту клеток, несущих рецепторы к цитокину, так и по числу рецепторов обоих типов на них. Также были установлены особенности показателей экспрессии рецепторов к TNF и IL-1 на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток у носителей разных генотипов в норме и при ревматоидном артрите [11, 12.]. На основе полученных данных для исследования полиморфизма рецепторов при РМЖ были выбраны полиморф-

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА РЕЦЕПТОРОВ TNF И IL-1 У БОЛЬНЫХ РМЖ И ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН

TABLE 2. STATISTICAL EVALUATION OF THE DATA ON TNF AND IL-1 RECEPTOR POLYMORPHISM GENOTYPED IN BREAST CANCER PATIENTS AND HEALTHY WOMEN

SNP/генотип SNP/genotype	Контроль Controls	РМЖ Breast cancer	χ^2	p	OR	95% CI
rs4149569	n = 230	n = 249				
GG	0,348	0,349	0,42	0,81	1,01	0,69-1,47
GC	0,487	0,506			1,08	0,75-1,54
CC	0,165	0,145			0,85	0,52-1,40
rs590368	n = 230	n = 249				
CC	0,352	0,237	7,69*	0,02	0,57*	0,38-0,85
CT	0,509	0,594			1,42	0,99-2,03
TT	0,139	0,169			1,26	0,76-2,07
rs2234650	n = 230	n = 248				
CC	0,226	0,169	8,60*	0,01	0,70	0,44-1,10
CT	0,557	0,685			1,74*	1,20-2,52
TT	0,217	0,145			0,61*	0,38-0,98
rs4141134	n = 229	n = 249				
TT	0,389	0,378	0,49	0,78	0,95	0,66-1,38
TC	0,511	0,502			0,96	0,67-1,38
CC	0,100	0,120			1,23	0,69-2,18

Примечание. *, – статистически значимые различия частот от популяционных значений.

Note. *, statistically significant differences of the frequencies from the values observed in general population.

ТАБЛИЦА 3. ЧАСТОТЫ КОМБИНАЦИЙ ГЕНОТИПОВ РЕЦЕПТОРОВ *TNF* И *IL-1* У БОЛЬНЫХ РМЖ И ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН
TABLE 3. FREQUENCIES OF GENOTYPE COMBINATIONS FOR DIFFERENT *TNF* AND *IL-1* RECEPTOR POLYMORPHISMS IN BREAST CANCER PATIENTS AND HEALTHY WOMEN

Генотип Genotype <i>TNFRSF1A</i> -1207G/C	Генотип Genotype <i>TNFRSF1B</i> -3609 C/T	Генотип Genotype <i>IL1R1</i> -12075 C/T	Генотип Genotype <i>IL1R2</i> -1780 T/C	Частота комбинации при РМЖ Combination frequency in breast cancer %, (n)	Частота комбинации в контроле Combination frequency in control sample %, (n)
GC	CT	CT	TC	12,0	12,3
GC	CT	CT	TT	10,0	11,2
GG	CT	CT	TC	7,4	8,0
GC	CC	CT	TC	7,3	6,2
GC	CT	CC	TC	5,8	5,2
GG	CT	CT	TT	5,0	4,8
GC	CC	CT	TT	4,7	4,5
GG	CT	TT	TC	3,0	2,4
GC	CT	TT	TT	2,8	2,3
GC	TT	CT	TC	2,2	2,2

ные точки, локализованные в промоторах генов рецепторов *TNF* и *IL-1* и ассоциированные с изменением уровня экспрессии соответствующих рецепторов. Так, в норме гомозиготы *CC* rs4149569 (-1207 G/C) гена *TNFRSF1A* характеризовались сниженным числом рецепторов *TNF* 1 типа на интактных моноцитах, а гомозиготы *CC* rs590368 (-3609 C/T) гена *TNFRSF1B* — сниженным числом моноцитов, несущих рецепторы *TNF* 2 типа. Также индивиды с генотипом *TT* rs2234650 (-12075C/T) гена *IL1R1* имели более низкий процент интактных *CD14⁺* моноцитов, экспрессирующих *IL1R1*, а у гомозиготных носителей аллеля *C* в SNP rs4141134 (-1780T/C) отмечена повышенная экспрессия гена *IL1R2* в периферических моноцитах и Т-лимфоцитах.

У больных РМЖ не выявлено значимых изменений в частоте аллелей и генотипов в SNP -1207G/C (rs4149569) гена *TNFRSF1A* и rs4141134 (-1780T/C) гена *IL1R2*. Анализ полиморфизма rs590368 (-3609 C/T) гена *TNFRSF1B* выявил небольшое, но значимое снижение частоты гомозиготного носительства аллеля *C* у больных РМЖ. В норме этот генетический вариант ассоциирован со снижением числа *CD14⁺* моноцитов, несущих рецептор *TNF* 2 типа. Учитывая, что основной функцией 2 типа рецептора к *TNF* является регуляция функциональной активности клеток можно предполагать большую реактивность моноцитов в ответ на стимуляцию *TNF* у больных РМЖ.

Исследование частоты аллелей и генотипов полиморфных позиций в промоторе генов рецепторов *IL-1* показало увеличение числа гетерозигот *CT* полиморфизма rs2234650 (-12075 C/T) гена *IL1R1* в выборке больных РМЖ. В норме этот генетический вариант ассоциирован с повышенным числом моноцитов, экспрессирующих

рецептор 1 типа к *IL-1*. То есть в отношении рецепторов *IL-1* у больных РМЖ выявляется ситуация аналогичная рецепторам *TNF* — увеличение носительства генотипа, ассоциированного с повышенной экспрессией рецептора активирующего функции моноцитов.

Выявленные ассоциации согласуются с существующим мнением об участии провоспалительных цитокинов в патогенезе злокачественных заболеваний. Сигнальные каскады рецепторов *TNF* 2 типа и *IL-1* 1 типа приводят к активации *NF-κB* и поддерживают воспалительные реакции [10, 14]. Хроническая стимуляция воспалительных реакций приводит к активации каскада вторичных молекул, например матриксных металлопротеаз и факторов ангиогенеза, которые способствуют прогрессии опухолевого роста. Однако умеренное повышение отношения шансов для ассоциированных аллельных вариантов рецепторов *TNF* и *IL-1* и отсутствие отличий в частоте их встречаемости в подгруппах женщин с РМЖ по наличию опухоли во второй молочной железе, размеру опухоли, лимфогенному метастазированию, степени злокачественности и гистологическому типу опухоли позволяет рассматривать эти полиморфные варианты только в качестве дополнительных маркеров риска РМЖ, но не как фактор прогноза течения заболевания.

Таким образом, полиморфизм генов рецепторов *TNF* и *IL-1*, ассоциированный с уровнем экспрессии рецепторов на иммунокомпетентных клетках, может являться одним из факторов, регулирующих участие провоспалительных цитокинов в иммунопатогенезе РМЖ, и может быть рассмотрен в качестве маркера риска в дальнейших исследованиях.

Список литературы / References

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петров Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2013 году. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2014. 235 с. [Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrov G.V. Status of cancer care the population of Russia in 2013]. Moscow: P.A. Herzen Moscow Cancer Research Institute, Russian Ministry of Healthcare, 2014. 235 p.
2. Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Слонимская Е.М., Крицкая Н.Г., Гарбуков Е.Ю., Литвяков Н.В., Стахеева М.Н., Бабышкина Н.Н., Малиновская Е.А., Денисов Е.В., Григорьева Е.С., Назаренко М.С., Сеников С.В., Горева Е.П., Козлов В.А., Воевода М.И., Максимов В.Н., Белявская В.А., Чердынцева Н.В. Генетические и клиничко-патологические особенности рака молочной железы у больных с сохраненной менструальной функцией и в менопаузе // Успехи геронтологии, 2008. Т. 21, № 4. С. 643-653. [Perelmutter V.M., Zavyalova M.V., Vtorushin S.V., Slonimskaya E.M., Kritskaya N.G., Garbukov E.Yu., Litvyakov N.V., Stacheeva M.N., Babyshkina N.N., Malinovskaya E.A., Denisov E.V., Grigorjeva E.S., Nazarenko M.S., Sennikov S.V., Goreva E.P., Kozlov V.A., Voevoda M.I., Maximov V.N., Belyavskaya V.A., Cherdyntseva N.V. Genetic and clinic-pathological characteristics of breast cancer in premenopausal and postmenopausal women. *Uspekhi gerontologii = Advances in Gerontology*, 2008, Vol. 21, no. 4, pp. 643-653. (In Russ.)]
3. Харченко В.П., Рожкова Н.И. Маммология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 328 с. [Kharchenko V.P., Rozhkov N.I. Mammalogy. National leadership]. Moscow: GEOTAR-Media, 2009. 328 p.
4. Culpán D., Cornish A., Love S., Kehoe P., Wilcock G. Protein and gene expression of tumour necrosis factor receptors I and II and their promoter gene polymorphisms in Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.*, 2007, Vol. 42, pp. 538-544.
5. Liu G., Park Y.J., Abraham E. Interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-1-mediated NF-kappaB activation requires cytosolic and nuclear activity. *FASEB J.*, 2008, Vol. 22, no. 7, pp. 2285-2296.
6. Migali C., Milano M., Trapani D., Criscitiello C., Esposito A., Locatelli M., Minchella I., Curigliano G. Strategies to modulate the immune system in breast cancer: checkpoint inhibitors and beyond. *Ther. Adv. Med. Oncol.*, 2016, Vol. 8, no. 5, pp. 360-374.
7. Myers E.R., Moorman P., Gierisch J.M., Havrilesky L.J., Grimm L.J., Ghatge S., Davidson B., Mongtomery R.C., Crowley M.J., McCrory D.C., Kendrick A., Sanders G.D. Benefits and harms of breast cancer screening: A systematic review. *JAMA*, 2015, Vol. 314, no. 15, pp. 1615-1634.
8. Niravath P., Cakar B., Ellis M. The Role of genetic testing in the selection of therapy for breast cancer: A review. *JAMA Oncol.*, 2017, Vol. 3, no. 2, pp. 262-268.
9. Patschenko A.G., Pushkar I., Anderson K.H., Wang Y., Miller L.J., Kurtzman S.H., Barrows G., Kreutzer D.L. The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression. *Int. J. Oncol.*, 2003, Vol. 23, no. 2, pp. 269-284.
10. Rivas M.A., Carnevale R.P., Proietti C.J., Rosembly C., Beguelin W., Salatino M., Charreau E.H., Frahm I., Sapia S., Brouckaert P., Elizalde P.V., Schillaci R. TNF alpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappa B-dependent pathways. *Exp. Cell Res.*, 2008, Vol. 314, no. 3, pp. 509-529.
11. Sennikov S.V., Vasilyev F.F., Lopatnikova J.A., Shkaruba N.S., Silkov A.N. Polymorphisms in the tumor necrosis factor receptor genes affect the expression levels of membrane-bound type I and type II receptors. *Mediators Inflamm.*, 2014, Vol. 2014, no. 745909.
12. Vasilyev F.F., Silkov A.N., Sennikov S.V. Relationship between interleukin-1 type 1 and 2 receptor gene polymorphisms and the expression level of membranebound receptors. *Cell. Mol. Immunol.*, 2015, Vol. 12, no. 2, pp. 222-230.
13. Wang S.S., Purdue M.P., Cerhan J.R., Zheng T., Menashe I., Armstrong B.K., Lan Q., Hartge P., Krickler A., Zhang Y., Morton L.M., Vajdic C.M., Holford T.R., Severson R.K., Grulich A., Leaderer B.P., Davis S., Cozen W., Yeager M., Chanock S.J., Chatterjee N., Rothman N. Common gene variants in the tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor superfamilies and NF-kB transcription factors and non-Hodgkin lymphoma risk. *PLoS One*, 2009, Vol. 4, no. 4, e5360.
14. Zhou W., Guo S., Gonzalez-Perez R.R. Leptin pro-angiogenic signature in breast cancer is linked to IL-1 signalling. *Br. J. Cancer*, 2011, Vol. 104, no. 1, pp. 128-137.

Авторы:

Силков А.Н. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Чердынцева Н.В. — д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Максимов В.Н. — д.м.н., заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины», г. Новосибирск, Россия

Сеников С.В. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Silkov A.N., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Cherdyntseva N.V., PhD, MD (Biology), Professor, Deputy Director, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Maximov V.N., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Molecular Genetics Studies of Therapeutic Diseases, Research Institute of Therapy and Preventive Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Sennikov S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 19.12.2016

Принята к печати 26.12.2016

Received 19.12.2016

Accepted 26.12.2016

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА К IL-6 НА ПОВЕРХНОСТИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ПРОГРЕССИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Виткина Т.И., Денисенко Ю.К., Сидлецкая К.А.

*Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» —
Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения,
г. Владивосток, Россия*

Резюме. Введение: несмотря на то, что на сегодняшний день ХОБЛ является глобальной проблемой здравоохранения, механизмы развития иммунной реакции при этой патологии еще недостаточно раскрыты. Цель: изучить экспрессию IL-6R на поверхности иммунокомпетентных клеток при прогрессировании ХОБЛ. Материалы и методы: в исследование были включены 112 пациентов с ХОБЛ 1-го, 2-го и 3-го спирометрического класса стабильного течения. В контрольную группу вошли 32 практически здоровых лица. Исследуемые пациенты находились в фазе ремиссии ХОБЛ. Экспрессия IL-6R на поверхности Т-лимфоцитов, Т-хелперов, моноцитов и гранулоцитов, была определена методом проточной цитометрии. Результаты и обсуждение: прогрессирование заболевания сопровождалось увеличением относительного числа CD126⁺ иммунокомпетентных клеток. В наибольшей степени было повышено число CD4⁺CD126⁺ клеток и на всех стадиях ХОБЛ. Кроме того, по мере утяжеления ХОБЛ значительно возрастало число гранулоцитов с маркером CD126⁺. Таким образом, можно предположить, что Т-хелперы и гранулоциты являются основными клетками-мишенями для противовоспалительного действия IL-6, опосредуемого классическим сигналингом.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, ремиссия, IL-6R, CD126, классический сигналинг, провоспалительные свойства, противовоспалительные свойства, иммунокомпетентные клетки

CHANGES IN THE SURFACE IL-6 RECEPTOR EXPRESSION OF DISTINCT IMMUNE CELLS IN PROGRESSION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Vitkina T.I., Denisenko Yu.K., Sidletskaya K.A.

The Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology — Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation, Vladivostok Branch, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Introduction: Mechanisms of immune response in COPD are still poorly understood, despite global challenge which this disorder presents to public medicine. The objective of this study was to evaluate

Адрес для переписки:

Сидлецкая Каролина Андреевна
Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный
научный центр физиологии и патологии дыхания» —
Научно-исследовательский институт медицинской
климатологии и восстановительного лечения
690105, Россия, г. Владивосток, ул. Русская, 73г.
Тел.: 8 (423) 278-82-01; 278-82-02.
E-mail: d-karolina-a@mail.ru

Address for correspondence:

Sidletskaya Karolina A.
The Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology
and Pathology — Research Institute of Medical Climatology and
Rehabilitation, Vladivostok Branch
690105, Russian Federation, Vladivostok, Russkaya str., 73g.
Phone: 7 (423) 278-82-01; 278-82-02.
E-mail: d-karolina-a@mail.ru

Образец цитирования:

Т.И. Виткина, Ю.К. Денисенко, К.А. Сидлецкая
«Изменение экспрессии рецептора к IL-6 на поверхности
иммунокомпетентных клеток при прогрессировании
хронической обструктивной болезни легких»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 191–196.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-191-196

© Виткина Т.И. и соавт., 2017

For citation:

T.I. Vitkina, Yu.K. Denisenko, K.A. Sidletskaya “Changes in
the surface IL-6 receptor expression of distinct immune cells in
progression of chronic obstructive pulmonary disease”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017,
Vol. 19, no. 2, pp. 191–196.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-191-196

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-2-191-196

IL-6R expression on the surface of immune cells in the course of COPD progression. Materials and methods. The study included 112 patients with stable mild, moderate and severe COPD (spirometry classes 1,2, and 3). A control group included 32 healthy subjects. The COPD patients were in remission phase. Expression of IL-6R on the surface of T lymphocytes, T helper cells, monocytes and granulocytes was determined by flow cytometry. Results and Discussion. Progression of the disease was accompanied by increase in the relative amounts of CD126⁺ immunocompetent cells. The number of CD4⁺CD126⁺ cells was maximally increased at all stages of COPD. Moreover, the number of CD126⁺ granulocytes proved to be significantly increased with increasing severity of COPD. Hence, it may be assumed that T-helper cells and granulocytes are primary target cells for IL-6 anti-inflammatory action, which is mediated by classic signaling.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, remission, IL-6R, CD126, classic signaling, pro-inflammatory properties, anti-inflammatory properties, immune cells

Введение

Актуальной проблемой пульмонологии являются хронические заболевания органов дыхания, среди которых ведущее место по причинам заболеваемости и смертности занимает хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ). Однако вопросы патогенетических основ бронхолегочных заболеваний продолжают дискутироваться. В этиопатогенезе ХОБЛ большую роль играет нарушение иммунных механизмов регуляции воспалительного процесса [3].

В последнее время большое внимание уделяется изучению роли интерлейкина-6 (IL-6) в развитии воспалительной реакции при ХОБЛ. Многие исследования подтверждают, что уровень IL-6 в крови возрастает по мере прогрессирования ХОБЛ и опосредует персистенцию системного воспаления [1, 6, 7, 8, 13]. Данный цитокин, выделяемый антигенпрезентирующими клетками (дендритными клетками и макрофагами), проявляет как провоспалительные, так и противовоспалительные свойства [8, 9, 10, 11, 14]. Этот факт указывает на важную роль IL-6 в определении пути развития иммунного ответа.

Передача IL-6 сигнала внутрь клетки может осуществляться двумя путями — с помощью классического сигналинга или с помощью трансигналинга, в конечном итоге приводя к активации JAK/STAT-сигнального пути. При классическом сигналинге IL-6 стимулирует клетки-мишени через мембранный рецептор к IL-6 (IL-6R или CD126), который связан с белком gp130 на мембране клетки. Трансигналинг осуществляется с помощью растворимой формы рецептора (sIL-6R), при этом sIL-6R сначала связывает IL-6, а затем взаимодействует с gp130 (CD130) на поверхности клетки-мишени. Gp130 экспрессируется практически на всех типах клеток, в то время как IL-6R присутствует в основном на макрофагах, нейтрофилах, некоторых видах Т-клеток и гепатоцитах. Важно отметить, что разные пути передачи сигнала влияют на эффект, оказываемый IL-6. Противовоспалительная активность реализуется при классическом пути передачи сигнала, а провоспалительная

активность опосредована трансигналингом [4, 7, 8, 9, 10, 14].

Большинство последних исследований IL-6 сигналинга при различных патологиях, включая ХОБЛ, посвящено изучению изменения уровня IL-6 и роли трансигналинга. В свою очередь, нет статей, рассматривающих классический IL-6 сигналинг при ХОБЛ, по большей части этот путь передачи сигнала изучен в норме.

Цель данного исследования — изучение экспрессии рецептора к IL-6 на поверхности иммунокомпетентных клеток при прогрессировании ХОБЛ.

Материалы и методы

Исследование осуществлялось на базе Владивостокского филиала ДНЦ ФПД — НИИМКВЛ в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации (пересмотр 2013 г.) с одобрения локального Биоэтического комитета. В исследование были включены 112 пациентов с ХОБЛ 1-го (36 человек), 2-го (52 человека) и 3-го (24 человека) спирометрического класса стабильного течения [3]. На проведение обследования от каждого пациента было получено добровольное информированное согласие. Средний возраст пациентов составил 57,5±4,8 года. В контрольную группу вошли 32 практически здоровых лица, некурящих, с нормальной функцией внешнего дыхания, средний возраст составил 42,0±3,4 года. В период обследования никто из пациентов не получал регулярной противовоспалительной терапии. Исследуемые пациенты находились в фазе ремиссии ХОБЛ. Из исследования были исключены больные, имеющие сопутствующие хронические заболевания в фазе обострения.

Заболевания бронхолегочной системы диагностировали на основании данных анамнеза, объективного осмотра, пикфлоуметрии, спирометрии с выполнением бронхолитического теста (спирограф FUKUDA, Япония), результатов тестов mMRC и CAT, рентгенологического и лабораторного исследования. В соответствии с рекомендациями GOLD диагноз ХОБЛ выставляли при ОФВ/ФЖЕЛ < 0,70 [3]. По результа-

там спирометрии у пациентов с легкой степенью тяжести ХОБЛ постбронходилатационный показатель ОФВ₁ составил $90,13 \pm 1,99\%$. По результатам опроса у пациентов определялась одышка в 1 балл по шкале mMRC и 4 балла по тесту CAT. У пациентов со среднетяжелой степенью тяжести ХОБЛ показатель ОФВ₁ составил $73,9 \pm 2,56\%$. По результатам опроса у пациентов определялась одышка в 2 балла по шкале mMRC и 9 баллов по тесту CAT. У пациентов с тяжелой степенью тяжести ХОБЛ показатель ОФВ₁ составил $48,6 \pm 1,76\%$, по шкале одышки mMRC определялись более 2 баллов и по тесту CAT не менее 10 баллов.

В качестве материала для исследования экспрессии рецептора IL-6R (CD126⁺) использовали цельную кровь. Определяли экспрессию рецептора на поверхности Т-лимфоцитов (CD3⁺ клетки), Т-хелперов (CD4⁺ клетки), моноцитов и гранулоцитов методом проточной цитометрии (цитометр «BD FACSCantoII») с использованием реагентов фирмы BD (USA). Для определения экспрессии рецептора использовали антитела — CD126 (APC). В качестве маркирующих агентов

использовали: CD45 (APC-H7), CD3 (FITC), CD4 (PE-Cy7). Кластеры моноцитов и гранулоцитов выделяли по характерным для этих клеточных субпопуляций параметрам переднего (forward-scattered light, FSC) и бокового (side-scattered light, SSC) светорассеяния.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «Statistica 6.0 для Windows». Результаты описательной статистической обработки экспрессии рецепторов представляли в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей. Статистическую значимость различий экспрессии рецептора между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса. Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,001$; 0,01; 0,05 [2].

Результаты и обсуждение

В ходе исследования было рассчитано процентное содержание клеток иммунной системы, несущих IL-6R на своей поверхности, в крови здоровых лиц и пациентов с ХОБЛ. Полученные данные отображены в таблице 1. В норме среди

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ IL-6R У ПАЦИЕНТОВ С ХОБЛ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

TABLE 1. IL-6R EXPRESSION LEVELS IN COPD PATIENTS AND HEALTHY PERSONS

Показатели, % Parameters, %	Группа контроля Control group n = 32	ХОБЛ легкая степень тяжести Mild-degree COPD n = 36	ХОБЛ средняя степень тяжести Medium-degree COPD n = 52	ХОБЛ тяжелая степень тяжести Severe COPD n = 24
CD3 ⁺ CD126 ⁺	2,25 (2,15-2,40)	2,80 (2,60-2,90)	2,85* (2,70-3,10)	6,50***# (5,20-7,80)
CD4 ⁺ CD126 ⁺	1,75 (1,62-1,79)	2,80 (2,50-3,10)	3,50* (3,20-3,80)	8,20***# (7,40-9,20)
Моноциты Monocytes CD126 ⁺	28,30 (28,10-28,90)	32,25 (31,50-33,90)	36,40* (35,00-37,00)	71,00***# (68,50-74,30)
Гранулоциты Granulocytes CD126 ⁺	18,70 (18,50-19,00)	21,45 (20,20-23,50)	29,00** (27,30-31,40)	74,50***# (69,70-76,30)

Примечание. Данные представлены в виде медиан и диапазона квартильных значений.

* – $p < 0,05$ статистическая значимость различий в сравнении с группой контроля (критерий Краскела–Уоллиса).

** – $p < 0,01$ статистическая значимость различий в сравнении с группой контроля (критерий Краскела–Уоллиса).

*** – $p < 0,001$ статистическая значимость различий в сравнении с группой контроля (критерий Краскела–Уоллиса).

– $p < 0,05$ статистическая значимость различий между группами пациентов с ХОБЛ легкой и тяжелой степени тяжести (критерий Краскела–Уоллиса).

** – $p < 0,01$ статистическая значимость различий между группами пациентов с ХОБЛ легкой и тяжелой степени тяжести (критерий Краскела–Уоллиса).

Note. The data are presented as median values and quartile ranges.

*, $p < 0.05$, statistical significance of the differences against control group (Kruskal–Wallis test); **, same, by $p < 0.01$; ***, same, by $p < 0.001$.

#, $p < 0.05$, statistical differences between the COPD groups of mild- and severe-degree (Kruskal–Wallis test); ##, same, by $p < 0.01$.

циркулирующих Т-лимфоцитов и, в частности среди Т-хелперов, наблюдалось небольшое количество клеток, несущих IL-6R. При определении процентного содержания гранулоцитов и моноцитов с выраженной экспрессией IL-6R в группе контроля были зарегистрированы более высокие показатели.

На рисунке 1 представлен уровень экспрессии IL-6R у пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести. При расчете использовались значения медианы. Группа контроля была взята за 100 %, относительно нее рассчитывали показатели больных ХОБЛ.

При рассмотрении характера экспрессии IL-6R у пациентов с ХОБЛ легкого течения была обнаружена тенденция к увеличению содержания CD126⁺ клеток в сравнении с группой контроля. Статистически значимых различий между параметрами контрольной группы и пара-

метрами пациентов с ХОБЛ легкой степени тяжести не прослеживалось. В наибольшей степени экспрессия IL-6R возросла на субпопуляции Т-хелперов в сравнении с контрольными значениями (табл. 1, рис. 1).

У больных ХОБЛ средней степени тяжести статистически значимо продолжал возрастать уровень экспрессии IL-6R на иммунокомпетентных клетках. Экспрессия данного рецептора была наиболее выражена на гранулоцитах — увеличение числа CD126⁺ клеток на 55,1 % ($p < 0,01$) и на Т-хелперах — возрастание количества CD126⁺ клеток в 2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными значениями (табл. 1, рис. 1).

Статистически значимое увеличение относительного количества клеток с маркером CD126⁺ по сравнению с контрольными значениями наблюдалось и у пациентов с ХОБЛ тяжелой степени. При этом у пациентов на этой

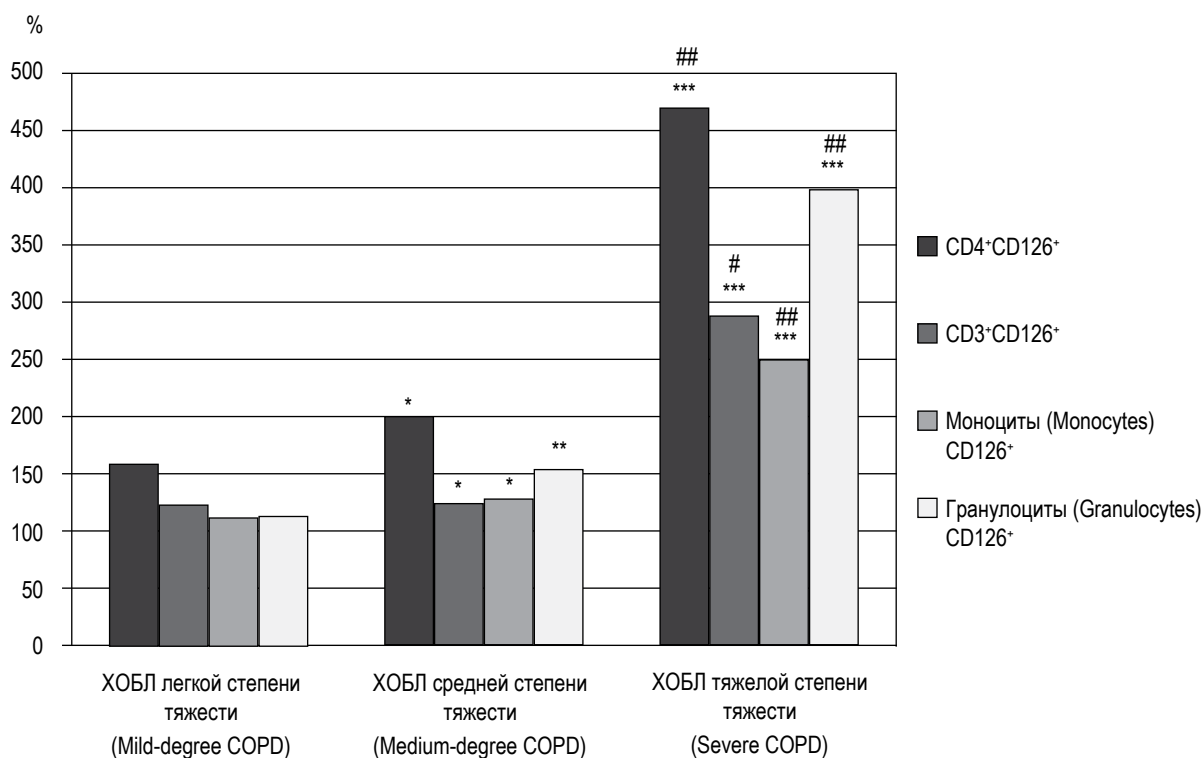


Рисунок 1. Уровень экспрессии IL-6R у пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести

Примечание. * – $p < 0,05$ статистическая значимость различий в сравнении с группой контроля (критерий Краскела–Уоллиса).

** – $p < 0,01$ статистическая значимость различий в сравнении с группой контроля (критерий Краскела–Уоллиса).

*** – $p < 0,001$ статистическая значимость различий в сравнении с группой контроля (критерий Краскела–Уоллиса).

– $p < 0,05$ статистическая значимость различий между группами пациентов с ХОБЛ легкой и тяжелой степени тяжести (критерий Краскела–Уоллиса).

– $p < 0,01$ статистическая значимость различий между группами пациентов с ХОБЛ легкой и тяжелой степени тяжести (критерий Краскела–Уоллиса).

Figure 1. IL-6R expression levels in the patients with COPD of different severity

Note. *, $p < 0.05$, statistical significance of the differences against control group (Kruskal–Wallis test); **, same, by $p < 0.01$; ***, same, by $p < 0.001$.

#, $p < 0.05$, statistical differences between the COPD groups of mild- and severe-degree (Kruskal–Wallis test); ##, same, by $p < 0.01$.

стадии регистрировалось наибольшее процентное содержание $CD4^+CD126^+$ клеток в сравнении с группой контроля (возрастание на 368,6 % [$p < 0,001$]). Число гранулоцитов, несущих IL-6R, на этой стадии значительно повысилось в сравнении с контролем (на 298,4 % [$p < 0,001$]). Также увеличилось количество Т-лимфоцитов и моноцитов с маркером $CD126^+$ по сравнению с контрольными значениями — на 188,9 % ($p < 0,001$) и на 150,9 % ($p < 0,001$) соответственно. В ходе проведения сравнительного анализа значений, полученных для пациентов с ХОБЛ легкой и тяжелой степени тяжести, было выявлено, что относительное число $CD4^+CD126^+$ клеток у больных ХОБЛ тяжелого течения повышается на 308,6 % ($p < 0,001$), $CD3^+CD126^+$ клеток — на 164,5% ($p < 0,005$), моноцитов $CD126^+$ — на 136,9 % ($p < 0,001$), гранулоцитов $CD126^+$ — на 283,6 % ($p < 0,001$) (табл. 1, рис. 1).

Таким образом, у больных ХОБЛ были выявлены изменения уровня экспрессии IL-6R в зависимости от степени тяжести заболевания. По мере утяжеления ХОБЛ происходило увеличение числа Т-лимфоцитов, Т-хелперов, гранулоцитов и моноцитов, несущих на своей поверхности IL-6R, что указывает на важную роль классического IL-6 сигналинга в регуляции системного воспалительного процесса при ХОБЛ.

При классическом сигналинге IL-6 должен связаться с соответствующим рецепторным комплексом на мембране клетки-мишени. Рецепторный комплекс к IL-6 состоит из трансмембранного гликопротеина IL-6R, непосредственно связывающего IL-6, и двух молекул трансмембранного белка gp130, играющего главную роль в передаче сигнала и активации JAK/STAT-сигнального пути. После образования комплекса IL-6/IL-6R происходит его ассоциация с мембранным белком gp130. Это приводит к димеризации gp130 и последующей активации JAK (Janus kinase), ассоциированных с рецептором. Активированные JAK фосфорилируют специфические тирозиновые аминокислотные остатки в составе рецептора, что дает возмож-

ность присоединиться к ним транскрипционному фактору STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription). Затем с помощью JAK происходит фосфорилирование STAT, после чего он диссоциирует от рецептора и формирует димер. Димерная форма STAT перемещается в ядро и запускает экспрессию генов, имеющих соответствующие регуляторные последовательности в их промоторных участках [4, 9, 10, 11].

Классический путь передачи IL-6 сигнала опосредует противовоспалительные эффекты, подавляющие воспалительную реакцию и компенсирующие апоптотические изменения, что делает IL-6R потенциальной мишенью для лечения ХОБЛ [7, 8, 9, 10, 12, 14]. Следует отметить, что в наибольшей степени было повышено число $CD4^+CD126^+$ клеток на всех стадиях ХОБЛ. Кроме того, по мере утяжеления ХОБЛ значительно возрастало число гранулоцитов с маркером $CD126^+$, большая часть которых представлена нейтрофилами. Возможно, большое число $CD126^+$ гранулоцитов связано с нейтрофильным характером воспаления при ХОБЛ [1, 5]. Можно предположить, что Т-хелперы и гранулоциты являются основными клетками-мишенями для противовоспалительного действия IL-6.

На основании всего вышесказанного можно сделать вывод о том, что уровень экспрессии клеточных рецепторов является важным параметром, характеризующим развитие системного воспалительного процесса при ХОБЛ. Для регуляции развития этого процесса важно соотношение между противовоспалительными и провоспалительными цитокинами. От этого баланса зависит и течение болезни, и ее исход. Если в организме начинают преобладать провоспалительные цитокины, то в организме запускаются механизмы, направленные на восстановление цитокинового баланса. Возможно, одним из таких механизмов является переключение провоспалительной активности IL-6 на противовоспалительную за счет передачи сигнала в клетку по классическому пути, опосредованному IL-6R.

Список литературы / References

1. Лобанова Е.Г., Калинина Е.П., Денисенко Ю.К. Особенности содержания цитокинов Th1- и Th17-лимфоцитов у лиц с хронической обструктивной болезнью легких // Медицинская иммунология, 2016, Т.18, № 3. С. 287-290. [Lobanova E.G., Kalinina E.P., Denisenko Yu.K. Cytokine contents in Th1- and Th17-type lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 287-290. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-3-287-290>
2. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2002. 312 с. [Rebrova O.Yu. Statistical analysis of medical data. The using of the software STATISTICA]. Moscow: MediaSfera, 2002. 312 p.
3. Global initiative for chronic obstructive lung disease: global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease [Electronic resource]. 2014.

4. Goldsby R., Kindt T., Osborne B., Kuby J. Immunology: textbook / R. Goldsby. 5th ed. W.H. Freeman, 2003. 603 p.
5. Kalinina E., Karaman Yu., Vitkina T., Lobanova E., Novgorodtseva T., Antonyuk M., Gvozdenko T., Knyshova V. and Nazarenko A. The mechanisms of the regulation of immune response in patients with comorbidity of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Canadian Respiratory Journal*, 2016, Vol. 2016, 8 p.
6. Liang R., Zhang W., Song Y.M. Levels of leptin and IL-6 in lungs and blood are associated with the severity of chronic obstructive pulmonary disease in patients and rat models. *Molecular Medicine Reports*, 2013, Vol. 7, no. 5, pp. 1470-1476.
7. Rincon M., Irvin C.G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int. J. Biol. Sci.*, 2012, Vol. 8, pp. 1281-1290.
8. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int. J. Biol. Sci.*, 2012, Vol. 8, no. 9, pp. 1237-1247.
9. Schaper F., Rose-John S. Interleukin-6: biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2015, Vol. 26, no. 5, pp. 475-487.
10. Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2011, Vol. 1813, no. 5, pp. 878-888.
11. Toumpanakis D., Vassilakopoulos T. Molecular mechanisms of action of Interleukin-6 (IL-6). *Pneumon.*, 2007, Vol. 20, no. 1, pp. 154-167.
12. Vitkina T.I., Denisenko Yu.K., Davydova K.A. The changes in the profile of cytokines in progressing chronic obstructive pulmonary disease. *International Research Journal*, 2016, Vol. 49, no. 7-3, pp. 6-8.
13. Vitkina T.I., Yankova V.I., Gvozdenko T.A., Nazarenko A.V., Golokhvast K.S., Kuznetsov V.L., Krasnikov D.V., Chaika V.V., Smagin S.V., Tsatsakis A.M., Engin A.B., Karakitsios S.P., Sarigiannis D.A. The impact of multi-walled carbon nanotubes with different amount of metallic impurities on immunometabolic parameters in healthy volunteers. *Food and Chemical Toxicology*, 2016, Vol. 87, pp. 138-147.
14. Young R.P., Hopkins R.J. Interleukin-6 and statin therapy: potential role in the management of COPD. *Respiratory Research*, 2013, Vol. 14, no. 1, p. 1.

Авторы:

Виткина Т.И. — д.б.н., профессор РАН, заведующая лабораторией медицинской экологии и рекреационных ресурсов Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток, Россия

Денисенко Ю.К. — д.б.н., заведующая лабораторией биомедицинских исследований Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток, Россия

Сидлецкая К.А. — лаборант-исследователь лаборатории биомедицинских исследований Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток, Россия

Authors:

Vitkina T.I., PhD, MD (Biology), Professor, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Medical Ecology and Recreational Resources, The Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology — Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation, Vladivostok Branch, Vladivostok, Russian Federation

Denisenko Yu.K., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Biomedical Research, The Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology — Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation, Vladivostok Branch, Vladivostok, Russian Federation

Sidletskaia K.A., Research Assistant, Laboratory of Biomedical Research, The Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology — Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation, Vladivostok Branch, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 06.12.2016
Принята к печати 26.12.2016

Received 06.12.2016
Accepted 26.12.2016

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ВАКЦИННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ Ag85, TB10 И FliC

Еремеев В.В.¹, Духовлинов И.В.², Орлов А.И.², Маленко А.Ф.¹,
Федорова Е.А.², Балазовский М.Б.³, Гергерт В.Я.¹

¹ ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ ЗАО «Фарма ВАР», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. К сегодняшнему дню назрела необходимость разработки вакцин нового поколения как наиболее эффективных иммунопрофилактических средств борьбы с туберкулезом. Наибольшую поддержку в мире находит стратегия гетерологичной вакцинации, в рамках которой для праймирования иммунной системы предлагается использовать вакцину БЦЖ или ее улучшенные аналоги, либо аттенуированные штаммы *M. tuberculosis*, а для последующих бустерных вакцинаций — субъединичные или векторные вакцины, содержащие протективные белки микобактерий. Целью настоящего исследования была оценка протективных свойств новой вакцины на основе рекомбинантных бактериальных белков Ag85, TB10 и FliC. Мы использовали модель аэрозольного заражения вакцинированных и интактных лабораторных мышей линии C57BL/6 вирулентным лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv и определяли высеваемость бактерий из органов и продолжительность жизни животных после заражения. В результате были выявлены три варианта вакцины, обладающие в нашей модели сравнимой с БЦЖ протективной активностью. Наиболее перспективный вариант будет использован для последующих доклинических испытаний.

Ключевые слова: туберкулез, вакцина, иммунитет, рекомбинантные антигены, протекция, микобактерия

STUDIES ON PROTECTIVE EFFECTS OF A VACCINE, BASED ON RECOMBINANT Ag85, TB10 AND FliC PROTEINS

Yermeev V.V.^a, Duhovlinov I.V.^b, Orlov A.I.^b, Malenko A.F.^a,
Fedorova E.A.^b, Balazovsky M.B.^c, Gergert V.Ya.^a

^a Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

^b Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c Pharma VAM Private Company, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. At present time, there is an obvious need for a new generation of vaccines as the most effective preventive approach, in order to stop spreading of tuberculosis infection. So far, the most popular strategy is

Адрес для переписки:

Еремеев Владимир Витальевич
ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский
институт туберкулеза»
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2.
Тел.: 8 (499) 785-90-72.
E-mail: yermeev56@mail.ru

Address for correspondence:

Yermeev Vladimir V.
Central Tuberculosis Research Institute
107564, Russian Federation, Moscow, Yauzskaya All, 2.
Phone: 7 (499) 785-90-72.
E-mail: yermeev56@mail.ru

Образец цитирования:

В.В. Еремеев, И.В. Духовлинов, А.И. Орлов,
А.Ф. Маленко, Е.А. Федорова, М.Б. Балазовский,
В.Я. Гергерт «Исследование протективных свойств
вакцинного препарата на основе рекомбинантных белков
Ag85, TB10 и FliC» // Медицинская иммунология, 2017.
Т. 19, № 2. С. 197–202.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-197-202

© Еремеев В.В. и соавт., 2017

For citation:

V.V. Yermeev, I.V. Duhovlinov, A.I. Orlov, A.F. Malenko,
E.A. Fedorova, M.B. Balazovsky, V.Ya. Gergert “Studies on
protective effects of a vaccine, based on recombinant Ag85, TB10
and FliC proteins”, *Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya
Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 197–202.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-197-202

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-2-197-202

aimed at heterological vaccination. The idea is to use BCG, or improved BCG, or attenuated *M. tuberculosis* for primary vaccination. For the further booster vaccination one may apply the s.c. subunit or vector vaccines, containing protective mycobacterial proteins. The aim of our investigation was to evaluate protective effects of a new vaccine based on recombinant bacterial proteins Ag85, TB10 and FliC. We used a model with aerosol *M. tuberculosis* H37Rv infection, and compared lung and spleen CFU counts and life-span of vaccinated *versus* non-vaccinated C57BL/6 mice. As a result, we revealed three vaccine variants with comparable protective capacity against BCG using our experimental model. The most promising variant is suggested for testing in preclinical trials.

Keywords: tuberculosis, vaccine, immunity, recombinant antigens, protection, mycobacterium

Введение

По данным информационного бюллетеня ВОЗ (№ 104, март 2016), туберкулез является второй по значимости причиной смерти от какого-либо одного инфекционного агента, уступая лишь ВИЧ/СПИД. В 2013 году в мире заболели туберкулезом 9 миллионов человек и 1,5 миллиона человек умерли от этой болезни (среди них около 550 000 и 80 000 ВИЧ-негативных детей соответственно). Туберкулез также является одной из основных причин смерти людей с ВИЧ (примерно в четверти всех случаев).

Кроме того, по оценкам 2013 года, у 480 000 людей в мире развился туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ). Возникновение и все более широкое распространение лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий является в настоящий период времени серьезной проблемой. Вызываемые ими формы туберкулеза, устойчивые к широкому ряду препаратов, получили значительное распространение во многих странах Азиатского и Африканского континентов. При этом лекарственно-устойчивые штаммы не только сильно затрудняют лечение туберкулеза, в некоторых случаях делая его невозможным (широкая лекарственная устойчивость — ШЛУ), но и существенно удорожают таковое [1]. Число случаев заболевания такой формой туберкулеза растет во всем мире. В связи с этим возникает необходимость разработки и создания принципиально новых, безопасных иммунопрофилактических и терапевтических средств, что является приоритетной задачей. По инициативе ВОЗ с 2006 г. объявлена глобальная программа борьбы с туберкулезом «The Global Plan to Stop TB», согласно которой одно из ведущих мест занимает разработка вакцин нового поколения против туберкулеза [7].

В настоящее время для предупреждения туберкулеза широко используется вакцинирование новорожденных детей живой вакциной БЦЖ, сохранившей свои антигенные и иммуногенные свойства [5]. Опыт применения вакцины БЦЖ показал ее высокую эффективность у детей и слабый защитный эффект или полное его отсутствие при предупреждении легочных форм туберкулеза

у взрослых [6, 2]. Различия в развитии «вакцинного процесса» могут зависеть от генетических особенностей макроорганизма, контролирующих процессы формирования и особенности иммуногенеза, силу иммунного ответа на антигены микобактерий, продолжительность протекции, которая может продолжаться от 1 до 4–6 лет [3, 8]. I.M. Orme [6] указывает на неспособность вакцины БЦЖ стимулировать выработку долгоживущих «центральных» Т-клеток памяти.

Следует отметить, что БЦЖ, подобно другим живым вакцинам, способна вызывать побочные эффекты. Осложнения при вакцинации БЦЖ наблюдаются, в частности, у детей, инфицированных ВИЧ еще до рождения. Введение живых штаммов микобактерий представляет серьезную опасность генерализации БЦЖ-инфекции при иммунодефицитных состояниях, все чаще регистрируемых в детской патологии, что явилось основанием для инструкции МЗ РФ об отводе от вакцинации БЦЖ до возраста 18 месяцев новорожденных от инфицированных ВИЧ матерей (Методические указания 3.3.1.1095-02, 2002). Нередко отмечается воспаление подмышечных лимфоузлов со стороны введения вакцины [2].

К сегодняшнему дню назрела необходимость разработки вакцин нового поколения как наиболее эффективных иммунопрофилактических средств борьбы с туберкулезом. Наибольшую поддержку в мире находит стратегия гетерологичной вакцинации, в рамках которой для праймирования иммунной системы предлагается использовать вакцину БЦЖ или ее улучшенные аналоги, либо аттенуированные штаммы *M. tuberculosis*, а для последующих бустерных вакцинаций — субъединичные или векторные вакцины, содержащие протективные белки микобактерий [4].

В связи с вышеизложенным нами была поставлена задача оценить протективные свойства новой вакцины на модели аэрозольного заражения лабораторных мышей вирулентным лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv по результатам определения высеваемости бактерий из органов и продолжительности жизни животных после заражения.

Материалы и методы

В исследовании был использован предоставленный фирмой ООО «Фарма ВАМ» вакцинный препарат на основе рекомбинантных бактериальных белков Ag85, TB10 и FliC, конъюгированных с 200 мкл эмульсии гидроксида алюминия и находящихся в различных сочетаниях в виде фармацевтических композиций (номера — 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7), в том числе с добавлением дополнительного адъюванта (секрет фирмы). Каждый препарат представляет собой различные кандидатные фармацевтические композиции указанных белков, как в виде фьюженов (химер), так и отдельно.

Композиция представляет собой сочетание вариантов химерного белка на основе Ag85B-TB10.4-FliC и плазмидной ДНК, кодирующей антиген Ag85A *Mycobacterium tuberculosis*. Химерный белок Ag85B-TB10.4-FliC получали с использованием штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21, трансформированного векторной плазмидой pet28a-Ag85B-TB10.4-FliC. Плазмидную ДНК получали с использованием штамма *Escherichia coli* DH10/B, трансформированного векторной плазмидой pEXag85A.

Химерный белок представляет собой последовательно соединенные с помощью шарнирного лейцинового мостика иммуногенные участки белков Ag85B и TB10.4. Шарнирный мостик и конформационная свобода для фолдинга целевых иммуногенных белков рассчитана с помощью метода I-Tasser. Участок белка FliC, также включенный в состав химерного белка, является структурным компонентом бактериальной флагеллы *Salmonella typhimurium*. Белок FliC выполняет функцию иммуногенного адъюванта, активирующего врожденный иммунный ответ через взаимодействие с рецепторами TLR5, и стимулирует созревание макрофагов, дендритных клеток. Плазмида pEXag85A представляет собой эукариотический экспрессионный вектор, где белок находится под контролем цитомегаловирусного промотора с энхансером. В состав вектора введены с помощью нуклеотидного синтеза дополнительные CpG мотивы, представляющие собой специальный профиль (комбинация А, В и С типов), для активации врожденного иммунитета и естественных киллеров.

Эксперименты проводили на мышах линии C57BL/6JCit (B6), содержащихся в виварии ФГБНУ «ЦНИИТ» в условиях неограниченного доступа к воде и пище. Параметры содержания мышей и проводимых экспериментов соответствовали нормам, установленным в приказе № 755 МЗ РФ. Были использованы самки мышей B6, достигшие возраста 2-3 мес. к началу эксперимента.

Группы по 15 мышей (7 групп животных, соответственно, каждой композиции) линии B6 вакцинировали внутримышечно два раза с двухнедельными интервалами 10 мкг белка, конъюгированного с 200 мкл эмульсии гидроксида алюминия.

Мышам контрольной группы вводили 200 мкл эмульсии гидроксида алюминия (отрицательный контроль). Положительный контроль — мыши, иммунизированные 10e5 КОЕ живой вакцины БЦЖ (штамм Russia).

Через 4 недели после последней вакцинации проводили в/в заражение 10e5 КОЕ вирулентного лабораторного штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Через 4 недели после заражения у 5 мышей из каждой группы после умерщвления цервикальной дислокацией забирали селезенку и легкие. Полученные органы тщательно растирали в стеклянных гомогенизаторах и получали серийные разведения в стерильном PBS и высевали на агар Дюбо. Растущие колонии подсчитывали визуально под бинокулярной лупой через 3 недели после посева на твердый агар.

Оставшиеся 10 мышей каждой группы использовали для определения среднего срока выживания после заражения.

Результаты и обсуждение

Как видно на рисунке 1, вакцины № 3, 6 и 7 обладают выраженным протективным эффектом, поскольку содержание микобактерий в селезенках и легких у данных вакцинированных групп мышей к четвертой неделе после заражения снижено на полтора-два порядка по сравнению с невакцинированным контролем. Эти показатели практически не отличаются от таковых в группе вакцинированных БЦЖ мышей. В то же время вакцины № 1, 2, 4 и 5 оказались неспособны существенно повлиять на содержание микобактерий в органах инфицированных животных.

Аналогичным образом данные по выживанию вакцинированных мышей после заражения *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (рис. 2А, Б и табл. 1 — для наглядности кривые выживаемости распределены в два рисунка) также указывают на высокую эффективность вакцинных препаратов № 3, 6 и 7. Средний срок выживаемости животных в этих группах (136, 138,5 и 138,1 дней соответственно) в цифровом значении оказался даже выше, чем в группе вакцинированных БЦЖ мышей (табл. 1). Однако следует подчеркнуть, что различия эти не подтверждаются статистическим анализом. По результатам выживаемости мышей вакцины № 1, 2 и 4 также обладали некоторым и статистически достоверным протективным эффектом по сравнению с контролем, но жизнь

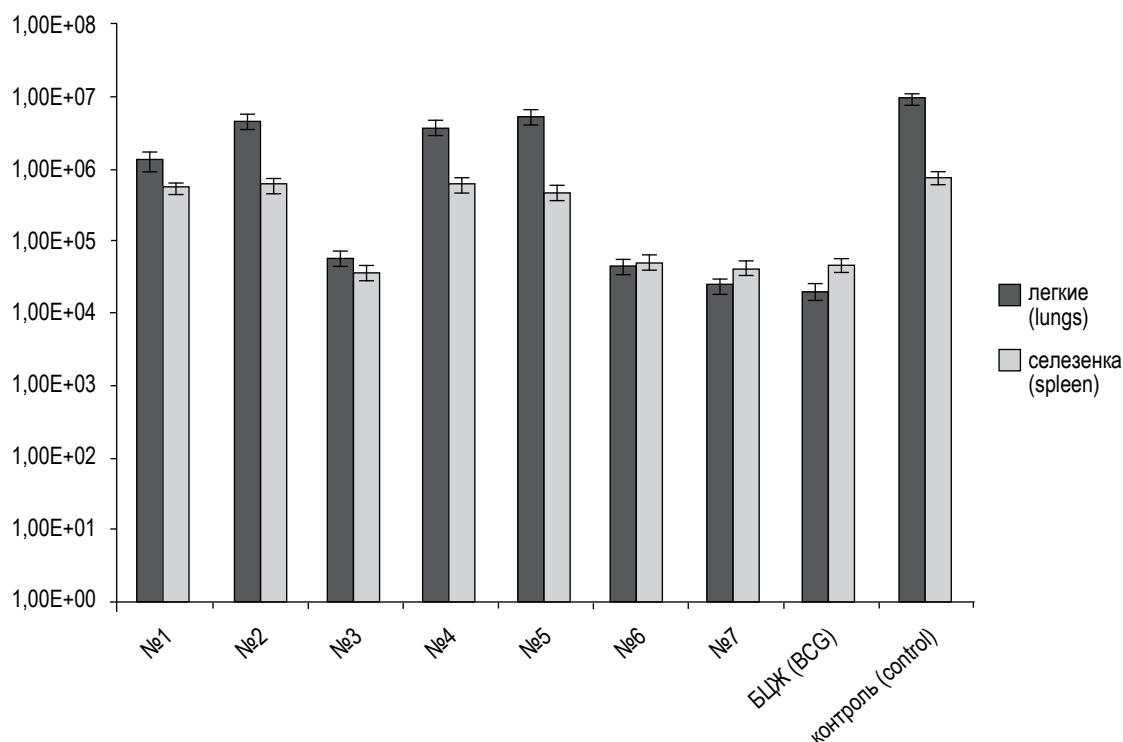


Рисунок 1. Высеваемость микобактерий туберкулеза из селезенки и легких у вакцинированных различными вариантами вакцинных препаратов мышей В6 через 4 недели после заражения

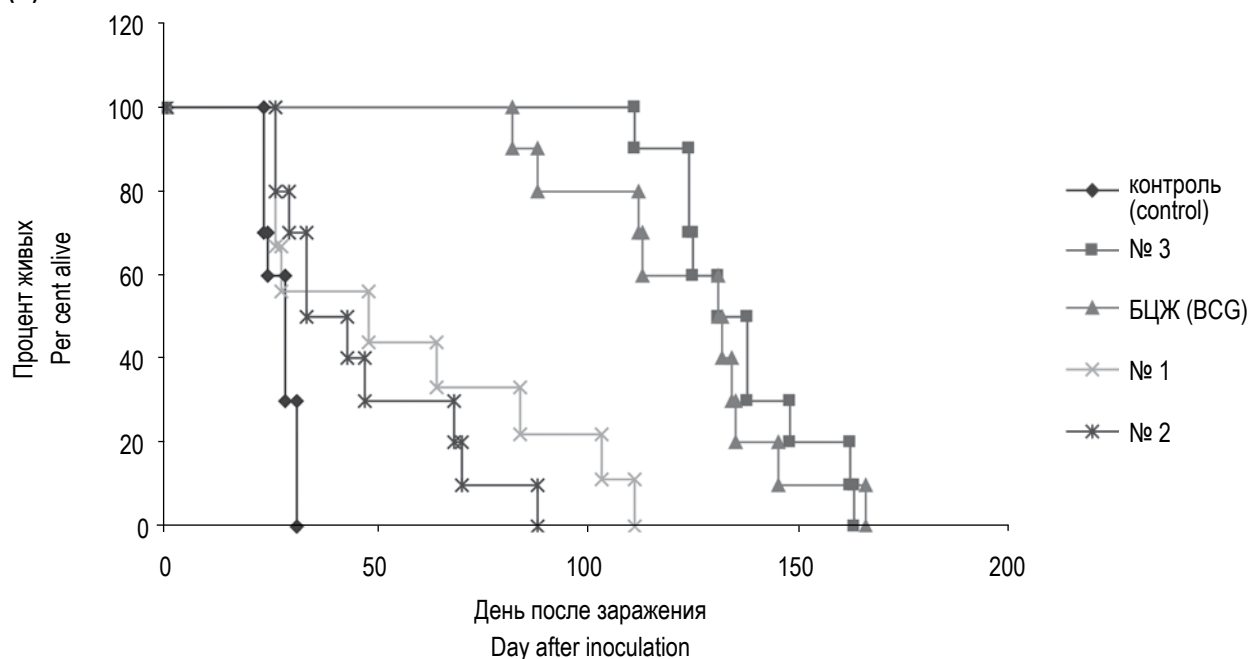
Figure 1. Isolation rates for *M. tuberculosis* from spleen and lungs of B6 mice immunized with different vaccine preparations following 4 weeks after MBT infection

ТАБЛИЦА 1. СРЕДНИЙ СРОК ВЫЖИВАЕМОСТИ ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУЛЕНТНЫМИ МИКОБАКТЕРИЯМИ МЫШЕЙ, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ВАКЦИНИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ВАКЦИННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ В СРАВНЕНИИ С ВАКЦИНОЙ БЦЖ

TABLE 1. MEAN SURVIVAL TERMS FOR MICE INFECTED BY VIRULENT MYCOBACTERIA AFTER PRE-VACCINATION WITH DIFFERENT VACCINAL PREPARATIONS, AS COMPARED WITH BCG VACCINE

Экспериментальная группа Experimental group	ССЖ (сут.) Mean survival term, days	m m value
№ 1	57,2	11,9
№ 2	46,3	7,2
№ 3	136	5,7
№ 4	54,3	8,5
№ 5	34,9	6,0
№ 6	138,5	8,1
№ 7	138,1	8,5
БЦЖ BCG	123,8	7,7
Контроль Control	27	1,1

А (A)



Б (B)

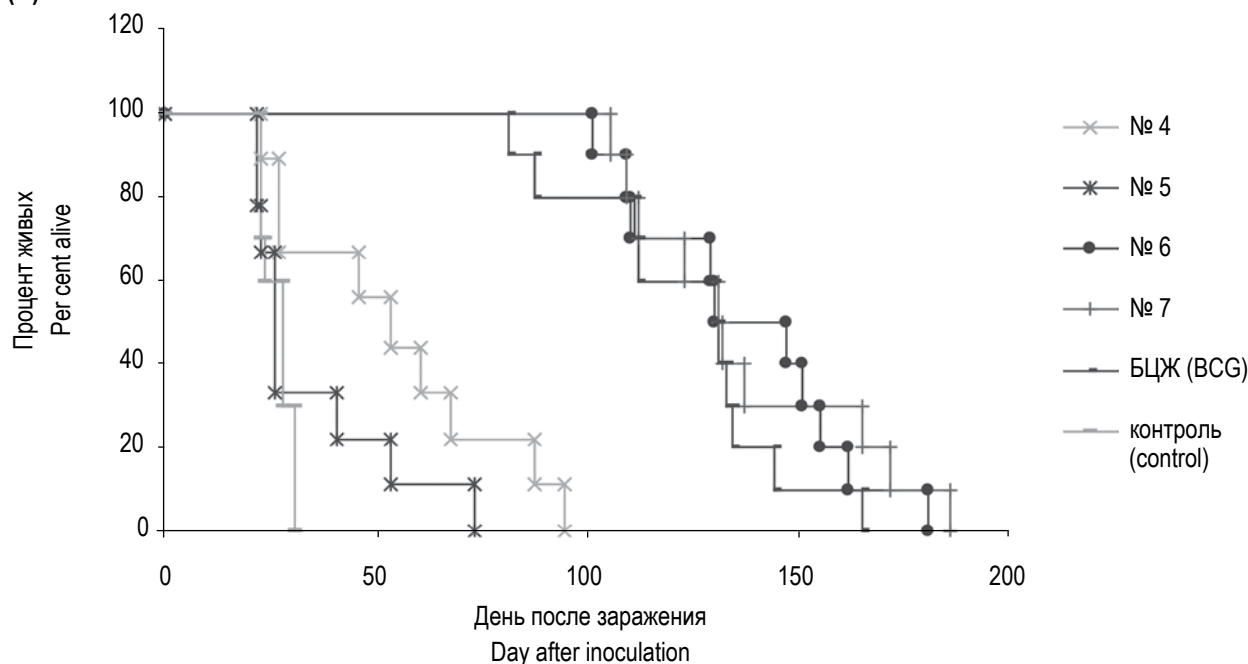


Рисунок 2. Динамика гибели зараженных вирулентными микобактериями мышей, предварительно вакцинированных различными вакцинными препаратами в сравнении с вакциной БЦЖ

Figure 2. Survival dynamics of mice infected with virulent mycobacteria, following pre-immunization with different vaccine preparations, as compared with BCG vaccine

животных пролонгировалась на более короткие сроки, чем после вакцинации БЦЖ. Вариант вакцины № 5 оказался неспособным пролонгировать жизнь зараженных вирулентной культурой микобактерий мышей, поскольку средний срок их жизни статистически не отличался от такового в контрольной группе.

Таким образом, полученные результаты внушают определенный оптимизм, открывая возможности для дальнейшего совершенствования нового вакцинного препарата, основываясь на наиболее перспективных вариантах № 3, 6 и 7. Очевидные направления дальнейших исследований включают: 1) титрование

дозы новой вакцины — возможно, что увеличение вакцинирующей дозы способно повысить протективный эффект; 2) определение иммуногенности новой вакцины и длительности иммунного ответа после однократной иммунизации; 3) определение длительности протек-

тивного эффекта; 4) использование новой вакцины в качестве буст-вакцины в комбинации с БЦЖ, имея в виду (в перспективе) разработку схемы вакцинации, снимающей «провальные» возрастные периоды БЦЖ в защите от туберкулеза детей и подростков.

Список литературы / References

1. Diel R., Nienhaus A., Lampenius N., Rüscher-Gerdes S., Richter E. Cost of multi drug resistance tuberculosis in Germany. *Respir. Med.*, 2014, Vol. 108, no. 11, pp. 1677-1687.
2. Haile M., Källénus G. Recent developments in tuberculosis vaccines. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 200, Vol. 18, no. 3, pp. 211-215.
3. Källénus G., Pawlowski A., Brandtzaeg P., Svenson S. Should a new tuberculosis vaccine be administered intranasally? *Tuberculosis (Edinb)*, 2007, Vol. 87, no. 4, pp. 257-266.
4. Kaufmann S.H. Tuberculosis vaccines: Time to think about the next generation. *Semin. Immunol.*, 2013, Vol. 25, no. 2, pp. 172-181.
5. Liu J., Tran V., Leung A.S., Alexander D.C., Zhu B. BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Hum. Vaccin.*, 2009, Vol. 5, pp. 70-78.
6. Orme I.M. The Achilles heel of BCG. *Tuberculosis (Edinburgh)*, 2010, Vol. 90, no. 6, pp. 329-332.
7. Raviglione M.C., Uplekar M.W. WHO's new Stop TB Strategy. *Lancet*, 2006, Vol. 367, pp. 952-955.
8. Sepulveda R.L., Heiba I.M., King A., Gonzalez B., Elston R.C., Sorensen R.U. Evaluation of tuberculin reactivity in BCG-immunized siblings. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1994, Vol. 149, pp. 620-624.

Авторы:

Еремеев В.В. — д.м.н., заведующий лабораторией клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Духовлинов И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Орлов А.И. — д.х.н., заместитель директора ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Маленко А.Ф. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Федорова Е.А. — аспирант отдела молекулярной биотехнологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Балазовский М.Б. — директор ЗАО «Фарма ВАМ», Санкт-Петербург, Россия

Гергерт В.Я. — д.м.н., профессор, заведующий отделом иммунологии, ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Authors:

Yermeev V.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory for Clinical Immunogenetics and Cell Technologies, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Duhovlinov I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Orlov A.I., PhD, MD (Chemistry), Deputy Director, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Malenko A.F., PhD (Biology), Senior Research Associate, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Fedorova E.A., PhD Student, Molecular Biotechnology Department, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Balazovsky M.B., Director, Pharma VAM Private Company, St. Petersburg, Russian Federation

Gergert V.Ya., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Immunology Department, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Поступила 28.11.2016
Принята к печати 13.12.2016

Received 28.11.2016
Accepted 13.12.2016

ДОЛГУШИН ИЛЬЯ ИЛЬИЧ



Президент Южно-Уральского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Челябинск), академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ.

Долгушин И.И. — специалист в области клинической и экспериментальной иммунологии, автор 496 научных работ, из них 10 монографий, 22 авторских свидетельства и патента.

Основные результаты научной деятельности И.И. Долгушина

Исследована способность нейтрофилов образовывать низкомолекулярные пептиды, обладающие разнообразной биологической активностью.

Исследовано участие нейтрофильных внеклеточных ловушек, ранее неизвестной функции гранулоцитов, в защите и регуляции микробиоценозов слизистых оболочек.

Установлена важная роль нейтрофильных внеклеточных ловушек как в защитных антимикробных реакциях, так и в развитии различных патологических процессов (PAD-4 зависимых заболеваний).

Созданы новые методы определения ловушек в крови и мукозальных секретах.

И.И. Долгушин ведет преподавательскую работу, является заведующим кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинико-лабораторной диагностики, директором НИИ иммунологии, активно занимается подготовкой научных кадров. Им подготовлено 22 доктора и 73 кандидата наук, в том числе после избрания членом-корреспондентом РАН — 14 докторов и 33 кандидата наук.

И.И. Долгушин — член редколлегии журналов: «Иммунопатология, аллергология, инфектология», «Человек и его здоровье», «Южно-Уральский медицинский журнал», председатель диссертационного совета Д.208.117.03 по специальностям: «Аллергология и иммунология», «Микробиология», «Фармакология, клиническая фармакология», член Президиума Всероссийского общества иммунологов, председатель Челябинского общества микробиологов, эпидемиологов.

В 2016 году И.И. Долгушин избран академиком РАН по Отделению медицинских наук РАН.

Заслуженный деятель науки Российской Федерации, награжден медалью Министерства здравоохранения Российской Федерации «За заслуги перед отечественным здравоохранением», почетными грамотами Министерства здравоохранения России, губернатора и Законодательного собрания Челябинской области, является лауреатом премии «Признание» (высшей общественной награды г. Челябинска).

Биография

Илья Ильич Долгушин родился 8 февраля 1947 года в поселке Черноотрог Агаповского района Челябинской области. В 1970 году с отличием окончил Челябинский медицинский институт, лечебный

факультет. Начал трудовую деятельность с должности врача-иммунолога в городском кожно-венерологическом диспансере № 1 г. Челябинска. Через два года перешел работать ассистентом кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Челябинского медицинского института. С тех пор научная, педагогическая и административная деятельность И.И. Долгушина связана с этим учебным заведением, где он прошел путь от студента до президента.

В 1973 году (в 26-летнем возрасте) И.И. Долгушин защитил кандидатскую диссертацию под руководством профессора Л.Я. Эберта и через восемь лет (в 34 года), в 1981, — докторскую. Основным направлением научной деятельности И.И. Долгушина стали клиническая и экспериментальная иммунология, изучение биологически активных продуктов нейтрофилов.

С 1981 по 1983 год И.И. Долгушин заведовал кафедрой микробиологии и иммунологии в университете г. Конакри (Гвинея).

В 1985 году И.И. Долгушин получил звание профессора, а через год был впервые избран заведующим кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ЧГМИ (с 2012 года — Южно-Уральский государственный медицинский университет), которую возглавляет по настоящее время.

На Южном Урале в 2001 году по инициативе И.И. Долгушина создана научная школа иммунологов. На базе ЧелГМА (ныне ЮУГМУ) был создан НИИ иммунологии, директором которого он работает по настоящее время.

С 2005 по 2016 год И.И. Долгушин — ректор Южно-Уральского государственного медицинского университета, в апреле 2016 года был назначен президентом ЮУГМУ.

В 2004 году был избран членом-корреспондентом РАМН, в 2016 — действительным академиком Российской академии наук, по отделению медицинских наук РАН.

VIII ВСЕРОССИЙСКАЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ «ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ» 29 ЯНВАРЯ – 4 ФЕВРАЛЯ 2017 г.



VIII Всероссийская с международным участием школа-конференция по клинической иммунологии «Иммунология для врачей» прошла 29 января — 4 февраля 2017 года в заповеднике «Пушкинские Горы» Псковской области и была посвящена проблемам инфекционной иммунологии.

Школа проходила под эгидой Российской академии наук, Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Министерства здравоохранения Российской Федерации и Правительства Санкт-Петербурга в лице Комитета по здравоохранению и Комитета по науке и высшей школе при поддержке Администрации Псковской области. Основными организаторами Школы выступили: Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Российское научное общество иммунологов, Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов, Российское цитокиновое общество, Санкт-Петербургское региональное отделение Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов. Председатели оргкомитета: академики РАН Черешнев Валерий Александрович (Екатеринбург) и Тотолян Арег Артемович (директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург); заместители председателя:

академик РАН Хаитов Рахим Мусаевич (Москва) и академик РАН Козлов Владимир Александрович (Новосибирск); координаторы научной программы: член-корреспондент РАН Фрейдлин Ирина Соломоновна (Санкт-Петербург) и профессор Козлов Иван Генрихович (Москва).

На церемонии торжественного открытия было отмечено, что Школа традиционно проводится под эгидой Российской академии наук, Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Министерства здравоохранения РФ при поддержке профессиональных организаций: Российского научного общества иммунологов и Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов. После приветствий первого заместителя губернатора Псковской области Емельяновой Веры Васильевны, председателя Комитета по здравоохранению администрации Псковской области Потапова Игоря Ивановича и администрации Пушкиногорского района, академик РАН Черешнев Валерий Александрович (Екатеринбург) выступил с торжественной лекцией «Российский нобелевский лауреат — Илья Ильич Мечников (1845-1916)», в которой не только был описан творческий путь выдающегося ученого, продемонстрированы уникальные фотографии (в том числе из личного архива Мечникова), но и подчеркнуто, что за годы своей работы во Франции в Институте Пастера Илья Ильич организовал постоянно действующую Школу для подготовки российских микробиологов, иммунологов и патологов, из которой вышли Н.Ф. Гамалея, Д.К. Заболотный, Л.А. Тарасевич, В.А. Хавкин, Г.Н. Габричевский, А.М. Безредка, С.И. Метальников, М.И. Судакевич, В.И. Исаев, И.Г. Савченко.

В рамках первого дня после торжественного открытия прозвучали доклады академика РАН Недоспасова Сергея Артуровича (Москва) «Современные подходы к редактированию генома животных и человека»; академика РАН Тотоляна Арега Артемовича (Санкт-Петербург) «Роль системы хемокинов в развитии инфекции»; академика РАН Черешнева Валерия Александровича (Екатеринбург) «Иммунопатофизиология воспаления»; профессора Гариба Фируза Юсуфовича, д.б.н. Ризопулу Анны Панаётисовны (Москва) «Иммунная эвазия: как патогены контролируют провоспалительную функцию инфламмасом»; академика РАН Караулова Александра Викторовича (Москва) «Иммунитет слизистых в защите от инфекции»; профессора Ганковской Людмилы Викторовны (Москва) «Врожденный и адаптивный иммунитет — основа фундаментальной и клинической иммунологии»; профессора Балмасовой Ирины Петровны (Москва) «Общие закономерности иммунопатогенеза инфекционных заболеваний»; члена-корреспондента РАН Симбирцева Андрея Семеновича (Санкт-Петербург) «Цитокины в иммунопатогенезе инфекционных заболеваний»; д.м.н. Топтыгиной Анны Павловны (Москва) «Коингибирующие молекулы в норме и при хронической инфекции»; профессора Гриценко Виктора Александровича (Оренбург) «Современное представление об эндогенной инфекции как междисциплинарной проблеме. Классификация и этиология».

В последующие дни на Школе обсуждались фундаментальные вопросы инфекционной иммунологии: иммунологическое распознавание и врожденный иммунитет (академик РАН Недоспасов Сергей Артурович, Москва), возрастные аспекты формирования противоинфекционного иммунитета (профессор Семикина Елена Леонидовна, Москва), влияние инфекции на старение иммунной системы (профессор Серебряная Наталья Борисовна, Санкт-Петербург), механизмы ускользания патогенов от иммунной системы (профессор Гариб Фируз Юсуфович, Москва), контактные взаимодействия в физиологии иммунного ответа (профессор Козлов Иван Генрихович, Москва). В серии лекций была освещена роль антимикробных пептидов и белков (профессор Кокряков Владимир Николаевич, Санкт-Петербург) и различных клеток в развитии инфекций: нейтрофилов (профессор Нестерова Ирина Вадимовна, Москва), тромбоцитов (профессор Серебряная Наталья Борисовна, Санкт-Петербург), естественных киллеров (профессор Колесникова Наталья Владиславовна, Краснодар) и лимфоидных клеток врожденного иммунитета (к.б.н. Круглов Андрей Алексеевич, Москва). Также обсуждались вопросы иммунопатогенеза инфекции, вызванными *Klebsiella pneumoniae* и грибами (член-корреспондент РАН Свитич Оксана Анатольевна, Москва), кори и краснухе (д.м.н. Топтыгина Анна Павловна, Москва), гриппу (профессор Сологуб Тамара Васильевна, Санкт-Петербург), туберкулезу (д.м.н. Лядова Ирина Владимировна, Москва), паразитарной и герпетической инфек-

ций (профессор Продеус Андрей Петрович, Москва). Иммунологические проблемы ВИЧ-инфекции обсуждались в лекциях академика РАН Черешнева Валерия Александровича (Екатеринбург), профессора Рассохина Вадима Владимировича (Санкт-Петербург) и к.м.н. Взорова Андрея Николаевича (Москва), проблемы вирусных гепатитов — в лекциях профессоров Балмасовой Ирины Петровны (Москва), Рассохина Вадима Владимировича (Санкт-Петербург), Семикиной Елены Леонидовны (Москва) и к.б.н. Семенова Александра Владимировича (Санкт-Петербург). Бурными дискуссиями сопровождалась лекция по эндогенной инфекции (профессор Гриценко Виктор Александрович, Оренбург), роли условно-патогенных бактерий (член-корреспондент РАН Тутельян Виктор Александрович, Москва) и значимости микробиоты для эффективной работы иммунной системы (член-корреспондент РАН Суворов Александр Николаевич, Санкт-Петербург, и к.б.н. Круглов Андрей Алексеевич, Москва).

Сложная и многогранная проблема иммунотерапии при различных инфекционных процессах была детально обсуждена в лекциях академик РАН Караулова Александра Викторовича (Москва), члена-корреспондента РАН Симбирцева Андрея Семеновича (Санкт-Петербург), профессоров Козлова Ивана Генриховича (Москва), Тузанкиной Ирины Александровны (Екатеринбург), Федосковой Татьяны Германовны (Москва), Кондратенко Ирины Вадимовны (Москва), Нестеровой Ирины Вадимовны (Москва), Исакова Валерия Александровича (Санкт-Петербург), Зурочки Александра Владимировича (Челябинск) и к.м.н. Чернышова Олега Борисовича (Санкт-Петербург). Фундаментальные и прикладные вопросы вакцинопрофилактики обсуждались на лекциях члена-корреспондента РАН Суворова Александра Николаевича (Санкт-Петербург) и профессора Харит Сусанны Михайловны (Санкт-Петербург)

Иммунопатогенез, диагностика и терапия первичных иммунодефицитов, сопровождающихся инфекционными проявлениями обсуждались на симпозиумах компании «КЕДРИОН БиоФарма» совместно с компанией «МЕДИПАЛ-Онко», компании «SHIRE» и компании «CSL BEHRING».

Лабораторным технологиям, которые применяются в том числе для мониторинга и оценки течения инфекционных процессов были посвящены симпозиум и мастер-классы компании «Бекман Культер», мастер-классы компании «БиоЛайн» и мастер-класс компании «ИнтерЛабСервис».

Необходимо отметить, что все лекции сопровождалась очень активной дискуссией. Эти дискуссии не обошлись без острых столкновений мнений участников.

Школа вполне оправдала название Всероссийской с международным участием, т.к. в ее работе приняли участие 193 представителя из Грузии (Тбилиси), Беларуси (Витебск, Гомель), Латвии (Рига, Лиепая), а также из 23 регионов Российской Федерации: Екатеринбург, Калининград, Коми (Сыктывкар), Краснодар, Красноярск, Ленинградская область, Мордовия (Саранск), Москва, Московская область, Нижний Новгород, Омск, Орел, Пенза, Псков, Санкт-Петербург, Саратов, Сочи, Томск, Тюмень, Удмуртия (Ижевск), Хабаровск, Хакасия (Абакан), Челябинск.

Многие участники отмечали теплую, дружескую атмосферу Школы, на которой интересная лекционная программа сочеталась с не менее полезной культурной программой, включавшей экскурсии в Михайловское, Тригорское, Петровское, Дом Сергея Довлатова в Березино, Святогорский монастырь, Печорский монастырь и крепость Изборск. О доброжелательной и неформальной обстановке, царившей на Школе, может свидетельствовать и та добрая ирония, которая звучит в публикуемом нами восьмом томе «Конспектов лекций», составленном лекторами Школы: профессором Семикиной Еленой Леонидовной и д.м.н. Топтыгиной Анной Павловной. На церемонии закрытия Школы прозвучало много слов благодарности, а также и обоснованные пожелания в адрес Оргкомитета, которые будут учтены при подготовке очередной Школы.

Оргкомитет считает своим приятным долгом от имени всех участников Школы выразить особую благодарность Администрации Псковской области и Пушкиногорского района, стратегическому партнеру — компании «ПетроваксФарм», Генеральным спонсорам — компаниям «КЕДРИОН БиоФарма», «Бекман Культер» и «CSL BEHRING», Главному спонсору — компании «БиоЛайн», а также всем официальным спонсорам, финансовая поддержка которых сделала возможной организацию и проведение Школы.

Конспекты лекций, составленные слушателями
VIII Всероссийской школы по клинической иммунологии
«Иммунология для врачей»
29 января – 4 февраля 2017 г.
Семикиной Е.Л. и Топтыгиной А.П.

Жил-был славный царь Додон,
Смолоду был грозен он,
С патогенами справлялся
И инфекций не боялся.
Но под старость захотел
Отдохнуть от разных дел
И покой себе устроить.
Тут микробы беспокоить
Стали старого царя,
Страшный вред ему творя.

Что-то в легких, что-то в зеве,
Патогены одолели,
И в кишечнике беда,
Паразит заполз туда.
Вот пришел он к мудрецу —
Иммуноло-молодцу,
Царь завыл: *О младость, где ты?*
Горе мне, обвисли НЕТы,
Не фурычит VLA...
Горе, смерть моя пришла!

Иммунолог говорит:
Инфламэйджинг вам грозит,
Коль ты мудрый человек —
Вся надежда на T-reg!
Укрепить здоровье чтоб —
Вот тебе иммунотрон!
Лишь зараза шевельнется —
Модулятор встрепенется,
Возбудит иммунитет,
Даст агрессорам ответ!

Модулятор царь забрал,
И по схеме применял.
Вот приходит через год —

Врач его не узнает!
Был он вялый, хилый, бледный,
А стал — иммунокомпетентный.

Говорит: *хочу жениться,*
Размножаться и плодиться,
Весь микробиом собрать
И по наследству передать!
И скажу я без кокетства,
Для тебя за чудо-средство
Волю первую твою
Я исполню как свою.

У иммунолога вопрос:
Может, вышел передоз?
Вишь — надумал он жениться...
Ну, зачем тебе девица?
Лучше не прямой контакт,
А фекальный трансплантат...
Ешь капусту, простоквашу,
Все, что флору кормит нашу.
Вот — кишечная отрада,
И никаких девиц не надо.

Царь ужасно возмутился:
Что я зря на свет родился?
Я считал, ты — чародей,
А ты взялся дурить людей!
В общем, на тебе пятак,
А может быть сойдет и так.

Чтоб в лечение преуспеть,
С дозой чтоб не пролететь,
Чтоб все Ох... сменить на Ах!
Все — на школу в Пушгорах!

Параграф первый

МЕТОДОЛОГИЯ НАУЧНОГО ПОИСКА

Иван Генрихович Козлов задал тон: «Я загадаю в начале загадку и в конце загадку».

Но Андрей Петрович Продеус сразу обозначил рамки: «В отличие от Ивана Генриховича я буду серьезен и пошучу только один раз».

Александр Викторович Караулов предупреждает: «Все, что здесь плохо, я цитировать не буду. Русским языком мы все владеем...»

Валерий Александрович Черешнев призывает быть снисходительней: «Тогда не было принтеров, приходилось писать руками».

Анна Павловна Топтыгина сокрушается: «Мы тут за два дня нагородили много иллюзий».

Андрей Алексеевич Круглов предупреждает непонятливых: «Это вам схема, чтобы вы испугались».

Александр Владимирович Зурочка его поддерживает: «Это такая красивая табличка, большущая, здоровенная, ее, правда, не очень хорошо видно, но ничего».

Андрей Алексеевич Круглов соглашается: «Вот эти схемы, их запоминать не надо».

И его поддерживает Андрей Петрович Продеус: «У меня есть слайд, на котором написано».

Но Александр Николаевич Суворов с ним не согласен: «Сейчас у меня нет такого слайда, я не вижу в этом смысла».

Оксана Анатольевна Свитич объясняет: «На слайде это просто — одна стрелочка, другая стрелочка, и мы уже в светлом будущем».

А Андрей Петрович Продеус возражает: «Это сложная картинка, а я вам сейчас покажу простую».

Ирина Александровна Тузанкина с ним не согласна: «Фирузу Юсуповичу большое спасибо — он раскопал эту картиночку».

Андрей Петрович Продеус оправдывается: «Это нет, это я не хотел показывать».

Но Александр Николаевич Суворов не согласен: «Здесь плохо видно, но реально видно хорошо».

Но несмотря на это, Наталья Агафонова Тотолян сокрушается: «Даже на тех лекциях, которые я совсем не понимаю, у меня возникает много вопросов».

Андрей Алексеевич Круглов анализирует: «Вот посмотрите, тут большой разброс, а если внимательно посмотреть, они разделятся на 2 группы».

Татьяна Германовна Федоскова заметила, что «у этих групп нарушается масса всего».

Иван Генрихович Козлов увидел: «Стали чистить, пытаюсь достать биологический смысл».

В результате Александр Владимирович Зурочка заключает: «Группа была подчищена. Убрали всю экзотику».

Наталья Михайловна Калинина сообщает: «Была диссертация — последний плевочек в сторону НК».

Но Андрей Алексеевич Круглов знает, как она делалась: «Ребята анализировали, воровали друг у друга данные».

Валерий Александрович Черешнев его поддерживает: «Публично — это всегда хорошо».

Но Ирина Александровна Тузанкина не согласна: «И все равно сохраняется клин».

Анна Павловна Топтыгина резюмирует: «В общем я открываю дискуссию — как лучше назвать это явление».

Татьяна Германовна Федоскова удивляется: «А что, наша задача — закончить споры?»

Параграф второй

АКАДЕМИЧЕСКИЙ БЫТ

Валерий Александрович Черешнев постулирует: «Мечников и Эрлих: все они открыли или предсказали».

Фируз Юсуфович Гариб скромно замечает: «Не хочу всех академиков как-то скомпрометировать...»

Валерий Александрович Черешнев систематизирует: «Есть классификация нобелевских лауреатов: 1 лига — отличники, 2 лига — хорошисты, 3 лига — троечники».

Фируз Юсуфович Гариб добавляет: «После этого выступил профессор, который академиком так и не стал...»

Татьяна Германовна Федоскова подметила: «Сейчас их много, но в классификацию они не вошли».

Валерий Александрович Черешнев настаивает: «Эрлих был выдающийся человек, в 19 лет начал курить сигары».

Но с ним не согласен Арег Артемович Тотолян: «Если ты куришь, то на такую высоту не поднимешься, а если бросил, то все равно пыхтишь как паровоз».

Валерий Александрович Черешнев не сдается: «Мечников считается основоположником иммунологии, но тогда еще слов таких не было».

Фируз Юсуфович Гариб анализирует: «Почему эти люди стали гениями? Потому что их жены всегда им говорили: „Да, ты — гений, что я могу подсказать?“»

Но Валерий Александрович Черешнев сомневается: «Ну в Харькове какая эмбриология?.. Вот пруд, вот травки, вот червячки...»

Фируз Юсуфович Гариб аргументирует: «Простой пример из жизни — сноха и свекровь. Иногда лучше промолчать. Но это активный процесс».

Сергей Артурович Недоспасов интересуется: «Я хочу задать вопрос: что с этой снохой? Какой механизм ее молчания?»

Фируз Юсуфович Гариб осторожничает: «Отвечать нельзя. Отвечать вредно».

Однако Валерий Александрович Черешнев догадывается: «Супрессорная роль свекрови...»

Фируз Юсуфович Гариб заключает: «...поддерживается иммунными клетками и Анной Панаевой...».

Арег Артемович Тотолян закрывает дискуссию: «Сейчас, конечно, никто уже не штопает носки (но с хемокиновыми рецепторами примерно так же)».

Александр Николаевич Суворов считает, что это «история любого крупного исследователя, который пробивал дырку в стене».

Параграф третий

КЛЕТКИ КАК ЛЮДИ

Анна Павловна Топтыгина считает, что «иммунная система не слушает наши лекции и не знает, что она должна реагировать Th1-ответом, а отвечает как может».

Фируз Юсуфович Гариб предупреждает: «А ведь патоген знает об иммунной системе гораздо больше, чем мы все, вместе взятые...»

Но Андрей Алексеевич Круглов согласен: «Ребята, которые сидят в просвете кишечника, могут на нас влиять с помощью растворимых цитокинов».

Фируз Юсуфович Гариб слышит: «Клетка вопиет...»

Александр Николаевич Суворов считает, что «в основном это сигналы от микробиоты, что они хотят метаболитов, которыми с нами потом частично поделятся».

Наталья Михайловна Калинина поясняет: «Это называется „синдром сосисок“».

Андрей Алексеевич Круглов классифицирует: «Эти на расстоянии нам кричат, а эти приходят ижимают руку».

Фируз Юсуфович Гариб повествует: «Но некоторые микробы захотели больше демократии, и 3,5 млрд лет назад потребовали: „Не надо нас убивать!“».

Наталья Борисовна Серебряная удивляется: «Что же за клетки такие, которые не работают по своей прямой обязанности?»

Фируз Юсуфович Гариб поясняет: «Они производят ИЛ10, который все окружающие клетки заставляет замолчать».

Ирина Вадимовна Нестерова знает: «Эти популяции очень легко неттингуют».

Анна Павловна Топтыгина предупреждает: «Вирусы могут использовать наши рецепторы в своих личных целях».

Александр Владимирович Семенов наблюдает: «У этого маленького вируса очень сложная личная жизнь».

Фируз Юсуфович Гариб считает: «Вирусы должны достаточно скромно себя вести».

Александр Владимирович Семенов возражает: «Если вирус сам себя нарезать не сможет, он не сможет продавить иммунную систему».

Анна Павловна Топтыгина сокрушается: «Зачем этот рецептор в норме, мы не знаем. Но вирус полиомиелита знает».

Ответ знает и Ирина Александровна Тузанкина: «Этот белок является шляпой-невидимкой для вируса».

Людмила Викторовна Ганковская констатирует: «Фируз Юсупович от этой инфламасомы никак не мог отойти. Она действительно завораживает...»

Александр Николаевич Суворов обнаруживает «плоское видение патогена в виде средневекового рыцаря».

Фируз Юсуфович Гариб насторожился: «Когда мы говорим слово „патоген“, мы подозреваем, что он чему-то вредит».

Иван Генрихович Козлов тоже видит, что «через ткань чешет какая-то клетка, тот же мигрант».

Александр Николаевич Суворов возражает: «Они являются бактериальными полицейскими».

Но Наталья Борисовна Серебряная уверена, что «тромбоциты — главные патрульные клетки, которые следят за диссеминацией».

А по мнению Александра Николаевича Суворова, их задача — «элиминировать врагов среди огромного количества друзей».

Параграф четвертый

УЖАСЫ НАШЕГО ГОРОДКА

Фируз Юсуфович Гариб рассказывает страшную сказку: «Много лет назад, когда еще не было макрофагов, а были амебы, они поглощали микробы и за счет этого жили».

Андрей Петрович Продеус подтверждает: «Я с этими паразитами рос, они были у меня с детства».

Сергей Артурович Недоспасов пугает: «Они выпетливаются из этого скэффолда».

При этом Татьяна Германовна Федоскова радуется: «В ротовую полость никто не залез».

Андрей Петрович Продеус предупреждает: «Я буду рассказывать про червячков перед обедом. Если вы не пообедаете, это неплохо».

Фируз Юсуфович Гариб нагнетает: «В какой-то момент времени таинственным образом в сальмонелле появляется шприц».

Иван Генрихович Козлов недоумевает: «Они, юродивые, зачем-то заражают организм».

От этого, по мнению Валерия Александровича Черешнева, возникает «дрожание у людоедов, когда мозг больного человека поедается детьми».

Татьяна Германовна Федоскова подчеркивает: «С самого детства куется вот такая психологическая травма».

Иван Генрихович Козлов считает: «Мы не можем позволить им съесть нас».

Андрей Петрович Продеус успокаивает: «Съесть его в виде фагоцитоза сложно, потому что его длина метров 10, замучаются наши фагоциты его жевать».

Фируз Юсуфович Гариб делает пугающий вывод: «Поздравляю! Мы с вами — вирус-человеки!»

Анна Павловна Топтыгина утешает: «Несмотря на свое страшное название, это вызывает не только клеточную смерть...»

Фируз Юсуфович Гариб настаивает: «Мы — полигон для изучения патогенов».

Ирина Владимировна Лядова объясняет: «Я не хотела вас запугать, а хотела дать скелет во времени и пространстве».

Андрей Алексеевич Круглов считает, что особенно важен «механизм бурения».

Фируз Юсуфович Гариб волнуется: «Иммунная система оказывается опасна для организма».

Андрей Алексеевич Круглов гнет свою линию: «Бурые — они хорошие, а белые — вы просто жирный».

Сергей Артурович Недоспасов заявляет: «Внутри каждого из нас есть машинка, которая постоянно нарезает белки на пептиды».

Ирина Александровна Тузанкина резюмирует: «Иммунная система... она, конечно, лошадь».

Александр Владимирович Семенов печалится: «Это мы хлещем и хлещем по лошади, которая и так не очень хорошо бежит».

Фируз Юсуфович Гариб видит: «Получается вот такая картина — конь погиб, сил все меньше, а патогенов все больше».

И отпугнуть их, по мнению Сергея Артуровича Недоспасова, может только «очень симпатичное чучело Бернета».

Фируз Юсуфович Гариб пессимистически заявляет: «В любой момент все может прекратиться, и он погибнет, причем погибнет инвалидом».

Параграф пятый

ЛЮБОВЬ-МОРКОВЬ

Фируз Юсуфович Гариб обобщает: «Что общего между патогеном и человеком? Способность размножаться, по крайней мере — желание».

Александр Викторович Караулов замечает: «Ведь есть молодые, и блондинки даже симпатичные».

Андрей Семенович Симбирцев (Караулову): «Если кто-то хочет задать вопрос, особенно блондинки — пусть подойдут».

Фируз Юсуфович Гариб наблюдает: «Посмотрите — рядом с активирующим рецептором всегда находится ингибирующий... для того, чтобы можно было регулировать возбуждение...»

Анна Павловна Топтыгина остужает пыл: «Она говорит: „Парень, не надо возбуждаться, походи погуляй немножко на периферии... Никакой аутоагрессии...“»

Андрей Семенович Симбирцев подтверждает: «Ни секса, ни дискотек, никаких излишеств из-за этой молекулы не будет».

Фируз Юсуфович Гариб делает оптимистичный вывод: «Остается только один путь — наиболее интенсивно размножаться».

Ирина Александровна Тузанкина наблюдает: «Есть определенная группочка людей, которым это нравится».

По мнению Вадима Владимировича Рассохина, «это люди с сексуальным поведением».

Анна Павловна Топтыгина предупреждает: «Этот интимный контакт обклеен со всех сторон молекулами адгезии».

Ирина Александровна Тузанкина советует: «Чтобы размножаться, надо сактивироваться... Иначе, понятно, ничего не получится».

Александр Владимирович Семенов замечает: «Лень вирусу размножаться кусочками — он размножается целиком».

По мнению Андрея Петровича Продеуса, «это то, что делало все население земли, прежде чем оно стало мыть руки».

Анна Павловна Топтыгина уточняет: «Они выставляют PD-1L, чтобы от них отвязались и не приставали с глупостями...»

А Ирина Вадимовна Кондратенко считает, что «втихую все этим занимаются, никто нам это не расскажет, но это существует».

Ирина Александровна Тузанкина заметила: «Когда это все случилось, осталась какая-то грязь в организме».

Фируз Юсуфович Гариб сообщает: «Я набрался нахальства и назвал это генетической грязью».

Ясность внес Александр Владимирович Семенов: «Это просто „грязнуха“ — РНК-зависимая РНК-полимераза».

Андрей Алексеевич Круглов предупреждает: «Мы должны тщательно выбирать партнера, с кем обмениваться микробиотой».

Татьяна Германовна Федоскова призывает: «Мы должны думать, каких детей они будут нам рожать, и как это все профилактировать».

Ирина Александровна Тузанкина с ней согласна: «Даже паразиты с нами, чтобы вместе жить, а не убивать друг друга».

Татьяна Германовна Федоскова полагает: «Схватишь за хвост эту первопричину — дальше легче это все раскручивать».

Анна Павловна Топтыгина настаивает: «Это молекула контакта. Но только бокового».

Ирина Петровна Балмасова сомневается: «Вот тут есть один нюанс — чудес не бывает...»

Александр Викторович Караулов сообщает: «С тех пор, как я начал гулять, прекратились инфекции».

«...что мне показалось бесконечно интересным», — заключает *Наталья Михайловна Калинина*.

Параграф шестой

ИММУНОФИЛОСОФИЯ

Валерий Александрович Черешнев удивляется: «Нам и в голову не могло прийти, что математики нам помогут, а морфологи потом нам это подтвердят».

Фируз Юсупович Гариб размышляет: «Чем больше мы познаем, тем больше размываются границы».

Сергей Артурович Недоспасов спрашивает: «Как может лимфоцит узнать — узнал он или не узнал? Кого они узнали, они не знают, но знают, что узнали...»

Андрей Алексеевич Круглов надеется: «Я верю, что вы тоже в это поверите».

Фируз Юсупович Гариб предупреждает: «Все в иммунной системе происходит „как правило“, а значит — не всегда».

Сергей Артурович Недоспасов поясняет: «Вы всем своим видом показываете, что это не вы. В смысле что вы — не он».

Елена Леонидовна Семикина замечает: «Самой иммунной системе интересно, что ей делать в этой ситуации».

Андрей Алексеевич Круглов уверен: «Мы всегда должны платить за хорошее чем-то плохим».

Наталья Борисовна Серебряная возражает: «Я не дам на отсечение какой-нибудь незначительной части».

Елена Леонидовна Семикина успокаивает: «Это процесс ремоделирования. И это не так обидно, как старение».

Андрей Алексеевич Круглов согласен: «Это не очень, но в общем пока вот так».

Наталья Михайловна Калинина сокрушается: «Такое вроде бы красивое слово, а несет инфекционную нагрузку».

Андрей Алексеевич Круглов полагает: «И у нас тем самым происходит отсутствие влияния».

Иван Генрихович Козлов предупреждает: «Бардак контролировать гораздо сложнее, и поэтому он гораздо мощнее, чем хорошо отлаженная машина».

Андрей Алексеевич Круглов поддерживает: «Согласно теории и моим ощущениям, их мало».

Иван Генрихович Козлов действует: «Теперь начинается искривление пространства... Я начинаю искривлять».

Андрей Алексеевич Круглов удивлен: «Да... то есть нет!»

Иван Генрихович Козлов радуется: «И в результате мы имеем кривое диагностическое пространство».

Ирина Петровна Балмасова восклицает: «Да что ты тут будешь делать! Увлекаюсь я!»

Андрей Алексеевич Круглов размышляет: «У вас нормально, у меня нормально, оба мы нормальные — в этом проблема».

Наталья Владиславовна Колесникова предупреждает: «В этом вопросе это еще не точка».

Иван Генрихович Козлов резюмирует: «Можно было ничего не слышать, а сказать, чем это все кончится».

Параграф седьмой (и последний)

КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Александр Викторович Караулов размышляет: «Если есть действующий препарат, изобретенный бог знает когда...»

Валерий Александрович Черешнев сомневается: «Терапия достаточно эффективная, но симптоматическая».

Наталья Михайловна Калинина делится опытом: «Расспрашиваешь пациента, как разведчик в тылу врага...»

Андрей Алексеевич Круглов сочувствует: «Они сильно страдают от патогенеза».

Сергей Артурович Недоспасов поясняет: «Вы не сможете объяснить, как вы не умираете от аутоиммунитета».

«Применяя все, что можно, — от водки до иммуномодуляторов», — *дополняет Татьяна Германовна Федоскова.*

Александр Владимирович Зурочка радуется: «Люди остались с двумя глазами. Вот для чего нужны малые субпопуляции».

Наталья Михайловна Калинина считает: «Дело не в том, где спрятались клетки, но от них страдают врачи, которые не могут добиться тех результатов, которые они хотят получить».

Валерий Александрович Черешнев ставит задачу: «Основные ответчики поражены, а теперь создайте вакцину».

Александр Николаевич Суворов предлагает: «Кулек конфет использовать в качестве вакцинного препарата».

Ирина Александровна Тузанкина восхищается: «Это идеальная мечта иммуномодуляции».

Татьяна Германовна Федоскова делится опытом: «Не все хотят колоться, поэтому мы любим назначать таблетки».

Андрей Алексеевич Круглов уверен: «Фекальная трансплантация — это круто, это дешево, но это трудно контролировать, а иногда донор не приходит».

Александр Викторович Караулов рекомендует: «Если применять коньяк, алкоголь — феномен будет обеспечен».

Ирина Александровна Тузанкина интересуется: «Когда совершается акт трансплантации?»

Андрей Алексеевич Круглов поясняет: «Пересаживаете микробиоту из очень релейэбл донора, который постоянно на работе».

Ирина Александровна Тузанкина уточняет: «Фекальную трансплантацию вы планируете через какое место?»

Александр Викторович Караулов высказывается: «Я за сублингвальный путь по сравнению с половым. Под язык положил — и радуешься дальше».

Валерий Александрович Черешнев возражает: «Все специалисты в этой области были категорически против».

Татьяна Германовна Федоскова сообщает: «У малышей капают в носик, что очень хорошо».

Ирина Александровна Тузанкина не унимается: «Как все-таки применять то, что мы уже слышали?»

Александр Викторович Караулов поясняет: «Чего-нибудь в рот, и свойства слизи изменяются».

Ирина Александровна Тузанкина понимает: «Препарат, который в народе называют иммуномодулятором».

Татьяна Германовна Федоскова считает, что прежде «нужно проверить, в каком состоянии входы и выходы организма».

Наталья Михайловна Калинина видит: «Клиницисты назначают интерфероны, индукторы интерферонов, и бог знает что... И — ничего!»

Александр Владимирович Зурочка считает: «А это в наших условиях просто очень хороший результат».

Ирина Александровна Тузанкина мечтает: «Возьмешь один препарат, а он сам понимает, что стимулировать, что подавлять, а что не трогать, потому что и так нормально работает».

Оксана Анатольевна Свитич сомневается: «Всех людей лечить одинаково — это тоже не очень хорошо».

Ирина Александровна Тузанкина раздражена: «Доктор, не получив знаний на такой вот школе, применяет их на приеме».

Иван Генрихович Козлов напоминает: «Он сейчас вставит вам про большую белую таблетку».

Валерий Александрович Черешнев делится опытом: «По совету русских попробовал хлорку, и через 20 минут — ни одного приона».

«С каким-то даже хаосом в продукции цитокинов», — беспокоится *Наталья Михайловна Калинина*.

Ирина Александровна Тузанкина считает: «Пусть лучше эффекта не будет... Главное, чтобы препарат был безопасен».

Андрей Петрович Продеус уверен: «Если кто-то, не дай бог, вылечится, то его сразу кто-нибудь заразит».

Ирина Александровна Тузанкина обличает: «Это когда доктор работает как фельдшер».

«Учился только тому, что нужно», — поддерживает *Валерий Александрович Черешнев*.

Фируз Юсупович Гариб заключает: «В общем Эволюция продолжается!»

Законспектировали:

Семикина Елена Леонидовна: Москва, ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава РФ, заведующая ЦКДЛ; РНИМУ им. Н.И. Пирогова, профессор кафедры факультетской педиатрии, д.м.н.

Топтыгина Анна Павловна: Москва, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, лаборатория цитокинов, ведущий научный сотрудник, д.м.н.

29 января — 04 февраля 2017 г., Псковская область, Пушкинские горы

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

С апреля 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление. — 2012. — Т. 11, №1. — С. 64–69.

Varjushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbircev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no.1, pp. 64–69.

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. — М.: Анахарсис, 2009. — 328 с.

Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. *Moscow: Anacharsis*, 2009, 328 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503–5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. *Basic and Clinical Immunology*. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т.е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Антонец Д.В.	127	Маленко А.Ф.	197
Балазовский М.Б.	197	Маслянский А.Л.	175
Богомолова Е.Г.	157	Мелешко А.Н.	145
Будкова А.И.	175	Непомнящих Т.С.	127
Виткина Т.И.	191	Орлов А.И.	197
Гергерт В.Я.	197	Саядян Х.С.	111
Денисенко Ю.К.	191	Сенников С.В.	185
Добровольская О.А.	157	Серебрякова М.К.	175
Духовлинов И.В.	197	Сидлецкая К.А.	191
Духовлинов И.В.	157	Силков А.Н.	185
Еремеев В.В.	197	Симбирцев А.С.	157
Ищук С.А.	157	Стёганцева М.В.	145
Казыгашева Е.В.	165	Тотоян Арег А.	175
Калиновская Н.Ю.	165	Тришина И.Н.	175
Каштиго Т.В.	111	Федорова Е.А.	157
Колмаков Н.Н.	157	Федорова Е.А.	197
Кондрашкина А.М.	157	Чердынцева Н.В.	185
Кудрявцев И.В.	175	Черенова Л.В.	111
Лапин С.В.	175	Ширинский В.С.	165
Максимов В.Н.	185	Ширинский И.В.	165
Максютов Р.А.	127	Шмаров М.М.	111

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аденовирус человека	111	провоспалительные свойства	191
аденовирус шимпанзе	111	протекция	197
аденовирусный вектор	111	противовоспалительные свойства	191
рецепторы активируемые пероксисомным пролифератором	166	противоопухолевый иммунитет	145
антигенная активность	157	проточная цитометрия	175
антигены	145	рак	127
вакцина	111, 145, 197	рак молочной железы	185
вирус осповакцины	127	рекомбинантные антигены	197
воспаление	166	рекомбинантный CRM197	157
генетический полиморфизм	185	ремиссия	191
дендритные клетки	127	рецепторы цитокинов	185
иммунитет	197	сахарный диабет 2 типа	166
иммунокомпетентные клетки	191	системные ревматические заболевания	175
иммунотерапия	127, 145	субпопуляции В-лимфоцитов	175
инфекционные заболевания	111	Т-лимфоциты	127
классический сигналинг	191	туберкулез	197
клинические испытания	111, 127	химерный антигенный рецептор	127
коморбидность	166	хроническая обструктивная болезнь легких ...	191
конъюгированные вакцины	157	цитокины	166
липиды	166	CD126	191
микобактерия	197	IL1RI	185
мышы Balb/c	157	IL1RII	185
онколитические вирусы	127	IL-6R	191
онкология	145	TNFRSF1A	185
остеоартрит	166	TNFRSF1B	185