

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ИММУНОТЕРАПИИ РЕТИНОБЛАСТОМЫ

Т.Л. Ушакова^{1,2}, И.С. Долгополов¹, З.А. Соколова¹, Г.З. Чкадуа¹, Н.С. Титов³, Ю.М. Букреев¹,
Ю.А. Серов¹, О.В. Горовцова¹, Д.А. Булетов¹, Н.А. Козлов¹, В.Г. Поляков^{1,2,3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе 24;

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 123242 Москва, ул. Баррикадная 2;

³ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова 1

Контакты: Татьяна Леонидовна Ушакова ushtat07@mail.ru

Введение. Внутриглазные опухоли, плохо поддающиеся химиотерапевтическому воздействию, являются основной причиной удаления глаза при попытках органосохраняющего лечения.

Цель исследования – поиск новых эффективных и безопасных органосохраняющих методов лечения интраокулярной рефрактерной и рецидивной ретинобластомы (РБ).

Материалы и методы. В исследование были включены самки кроликов породы шиншилла. В правый глаз каждому животному интравитреально была имплантирована клеточная линия WERI-Rb-1 (РБ человека). Левый глаз оставался интактным. После получения устойчивого интраокулярного роста РБ и его пролонгации в пораженный и в контрольный глаз К1 интравитреально были введены человеческие цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ) в концентрации 1×10^6 в 0,1 мл суспензии, а К2 – 5×10^6 в 0,1 мл соответственно.

Результаты. Гистологическое исследование удаленных правых глаз животных подтвердило наличие узлового разрастания злокачественной мелкокруглоклеточной опухоли на границе сосудистой и сетчатой оболочек (эпицентр в сосудистой оболочке) на задней стенке глаза. Отмечена скудная лимфоидная инфильтрация без признаков лечебного патоморфоза. В левых удаленных глазах животных отмечена сохранность гистологических структур глазного яблока без дистрофических изменений клеток сетчатой и сосудистой оболочек. В области лимба – единичный микроочаг лимфоцитарного инфильтрата (без элементов опухоли). В сосудистой оболочке – единичные рассеянные лимфоциты.

Заключение. Непродолжительный период наблюдения за ростом опухоли не позволил сделать выводы об эффективности человеческих ЦТЛ, но используемые в эксперименте концентрации ЦТЛ не привели к дистрофическим изменениям клеток сетчатки и сосудистой оболочки глаза, что является важным фактором в преодолении токсичности предлагаемой адоптивной иммунотерапии. На следующем этапе мы детально изучим цитотоксическое воздействие на здоровые структуры глаза и эффективность человеческих ЦТЛ на большем количестве пораженных опухолью глаз кроликов, применяя различные концентрации и кратность введения.

Ключевые слова: ретинобластома, экспериментальное органосохраняющее лечение, адоптивная интравитреальная иммунотерапия

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-57-64

EXPERIMENTAL IMMUNOTHERAPY MODEL OF RETINOBLASTOMA

T.L. Ushakova^{1,2}, I.S. Dolgoplov¹, Z.A. Sokolova¹, G.Z. Chkadua¹, N.S. Titov³, Yu.M. Bukreev¹, Yu.A. Serov¹,
O.V. Gorovtsova¹, D.A. Buletov¹, N.A. Kozlov¹, V.G. Polyakov^{1,2,3}

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;
24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of Russia;
2 Barricadnaya St., Moscow 123242, Russia;

³Pirogov Medical University of the Ministry of Health of Russia, 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

Introduction. The main reason for enucleation of the eye when attempting organ-preserving treatment are intraocular tumors that do not respond well to chemotherapy.

Purpose. The aim of the study was to find new effective and safe organ-preserving methods of treatment of intraocular refractory and recurrent retinoblastoma (RB).

Materials and methods. The study included female chinchilla rabbits. The cell line of human RB was intravitreally inserted into the right eye of each animal. The left eye was a control. After obtaining a stable intraocular growth of RB and prolongation of the growth of RB, human cytotoxic lymphocytes (CTL) were intravitreally injected into the affected and control eye K1 at a concentration of 1×10^6 in 0.1 ml suspension and K2 – 5×10^6 in 0.1 ml, respectively.

Results. Histological examination of the removed right eyes in animals confirmed the presence of nodal growth of malignant small-cell tumor on the border of the vascular and retinal membranes (epicenter in the choroid) on the posterior wall of the eye. There was scant lymphoid infiltration, without signs of therapeutic pathomorphosis. In the removed animal's left eyes there is a preservation of histological structures of the eyeball, without dystrophic changes in the cells of the retina and vascular membranes. In the area of limb unit microcap lymphohistiocytic infiltration (with no elements of the tumor). In the choroid single scattered lymphocytes.

Conclusion. A short period of observation of the tumor did not allow conclusions about the effectiveness of CTL, but the concentrations of CTL used in the experiment did not lead to dystrophic changes in retinal cells and the choroid of the eye, which is an important factor in overcoming the toxicity of the proposed adoptive immunotherapy. At the next stage of the experiment, in our opinion, it is necessary to study in more detail the cytotoxic effect on healthy structures of the eye and the effectiveness of CTL in a larger number of affected rabbit eyes, using their different concentrations and multiplicity of administration.

Key words: retinoblastoma, experimental organ-preserving treatment, adoptive intravitreal immunotherapy

Введение

Наличие отсевов при запущенной форме интраокулярной ретинобластомы (РБ) резко ограничивает возможности сохранения глаза [1, 2]. Системная химиотерапия часто не способна воздействовать на опухолевые отсева на сетчатке и в стекловидном теле – минимальный ответ на химиотерапию частично обусловлен устойчивостью отсевов опухоли к химиотерапии или аваскулярными участками в полости стекловидного тела и субретинальном пространстве, что затрудняет адекватное проникновение доставляемых лекарств [1, 3–6]. Дополнительное назначение к первичному лечению интравитреальной химиотерапии с целью повышения биодоступности химиопрепаратов демонстрирует впечатляющий контроль над отсевами опухоли в стекловидном теле, а также субретинальными отсевами и рецидивирующими опухолями сетчатки с минимальными осложнениями [3–9]. Лечение мелфаланом широко используют в качестве интравитреальной химиотерапии, несмотря на его высокую токсичность, при этом общая органная выживаемость достигает 68 % [3–5, 7]. С различной степенью успеха использованы такие препараты, как топотекан и метотрексат. Комбинация топотекана и мелфалана является оптимальной для рефрактерных и рецидивирующих отсевов или опухолей сетчатки [6, 8–13]. Тем не менее, несмотря на разработанные схемы дополнительной интравитреальной химиотерапии, у ряда пациентов наблюдается сбой, опухоль на лечение не отвечает, что приводит к энуклеации глаза [3–7, 10]. Это подчеркивает необходимость разработки альтернативных методов органосохраняющего лечения детей с резидуальной болезнью и внутриглазными рецидивами, оценки эффективности и безопасности применения локальной адоптивной иммунотерапии, возможности которой активно

изучаются с конца 1990-х годов, когда была убедительно продемонстрирована ее эффективность в лечении пациентов с меланомой и мелкоклеточным раком легкого [14, 15].

Цель исследования – создание надежных жизнеспособных гетеротрансплантированных моделей человеческой РБ у кроликов для определения эффективности адоптивной иммунотерапии в виде человеческих цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) в контроле над опухолями сетчатки и их отсевами.

Материалы и методы

Дизайн исследования. В экспериментальное исследование включены 2 лабораторных животных – кролики-самки породы шиншилла. В работе использованы методы: офтальмологическая диагностика с применением мидриатической ретиальной камеры с фотоархивом, культивирование и имплантация лабораторным животным клеточной линии РБ человека и человеческих ЦТЛ, а также выполнение энуклеации глаз с последующим гистологическим исследованием.

Критерии соответствия – доступность для исследователя всех требуемых клинических и лабораторных данных животных, включенных в исследование.

Критерии включения:

- здоровые кролики-самки породы шиншилла с массой тела не менее 3500 г;
- отсутствие органных дисфункций.

Критерий исключения:

- Выраженное истощение лабораторных животных.

Условия проведения. С 1-го дня исследования и до его окончания лабораторных животных содержали в условиях вивария Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Блохина (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина)

с наличием экструдированных кормов и свободного доступа к воде. Исследование было проведено сотрудниками НИИ детской онкологии и гематологии, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, НИИ клинической онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Продолжительность исследования. В исследование были включены 2 кролика (K1 и K2) – самки породы шиншилла в период с 18.06.2018 по 02.08.2018. До 18.06.2018 лабораторных животных выдерживали в карантине в течение 2 нед.

Результаты

Создание модели внутриглазной опухоли (РБ человека) в стекловидном теле глаз кролика породы шиншилла. Цель – добиться устойчивого роста внутриглазной РБ. Иммуносупрессию осуществляли ежедневными внутримышечными инъекциями циклоспорина А (CsA; Sandimmune 50 мг/мл; Novartis Pharma, Basel, Switzerland). Доза циклоспорина А составляла 15 мг/кг/сут в течение 3 дней (начало иммуносупрессии – 18.06.2018) до имплантации клеточной линии человеческой РБ в глаз (дата имплантации – 21.06.2018) и на протяжении последующих дней до устойчивого роста опухоли (дата устойчивого роста опухоли – 12.07.2018). Во время наблюдения за животными ежедневно оценивались признаки токсичности циклоспорина А, такие как гипертрофия десен, слюнотечение, диарея и снижение массы тела.

WERI-Rb-1 (РБ человека из ATCC-коллекции, США) была предоставлена лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой с добавлением L-глутамина, 10 мм HEPES, 1,0 мм пирувата натрия, антибиотика в инкубаторе при 37 °С; 5 % CO₂. Плотность клеток суспензионной культуры WERI-Rb-1 составляла 2 × 10⁶ клеток/мл.

На 3-е сутки после иммуносупрессии животным K1 и K2 в стекловидное тело правого глаза (интравитреально) были имплантированы клетки WERI-Rb-1 в концентрации 3 × 10⁶ клеток/мл в объеме 0,1 мл. Левый глаз интактный – контрольный.

21.06.2018 ввели интравитреально в правый глаз K1 и K2 по 0,1 мл клеток WERI-Rb-1 в концентрации 3 × 10⁶ клеток/мл. Повторное интравитреальное введение 0,1 мл клеток WERI-Rb-1 в концентрации 5 × 10⁶ клеток/мл проведено 05.07.2018 одному из животных (K1) в правый глаз в связи с отсутствием внутриглазного роста опухоли.

Контроль за состоянием глаз кроликов после имплантации клеточной линии РБ человека осуществляли еженедельно, используя ретинальную камеру

с архивированием фотографий глазного дна обоих глаз.

Генерация цитотоксических Т-лимфоцитов. Дендритные клетки (ДК) и цитотоксические Т-лимфоциты культивировали в среде RPMI1640, содержащей 2 % сыворотки/плазмы человека (IV группы крови), глутамин (2 мМ), гентамицин (40 нг/мл), HEPES-буфер (10 мМ), β-меркаптоэтанол (50 мкМ). Клетки культивировали в термостате при 37 °С и 5 % CO₂. Для получения человеческих ЦТЛ проводили совместное культивирование лимфоцитов периферической крови с аллогенными ДК. Из 20 мл цельной гепаринизированной крови донора выделяли обогащенную фракцию лимфоцитов, определяли количество клеток и вносили на чашку Петри (D = 60 мм) 5 × 10⁶ лимфоцитов в 5 мл полной культуральной среды. К лимфоцитам добавляли 0,5 × 10⁶ аллогенных ДК и совместно культивировали в течение 5–7 дней. Далее проводили повторную стимуляцию лимфоцитов аллогенными ДК, при этом культуру лимфоцитов переносили в новую чашку Петри (D = 100 мм) и доводили объем культуральной среды до 10 мл. Затем, через 2–3 дня, пролиферирующие лимфоциты переносили в культуральный флакон (75 см²) и добавляли 1,5 × 10⁶ аллогенных ДК, а также интерлейкин-2 (конечная концентрация – 100 МЕ/мл), объем среды доводили до 30 мл. Последующие рестимуляции проводили через каждые 2–3 дня, внося в культуру ЦТЛ аллогенные ДК и интерлейкин-2, при этом пролиферирующую популяцию лимфоцитов разводили культуральной средой в 3 раза. На последних этапах генерации ЦТЛ рестимуляцию проводили без аллогенных ДК, добавляя в культуральную среду только интерлейкин-2. Качество цитотоксических Т-лимфоцитов оценивали при помощи проточной цитофлуориметрии. Для этого исследовали экспрессию поверхностных и внутриклеточных антигенов: CD3, CD4, CD8, NKG2D, HLA-DR, Perforin, Granzyme B. По окончании культивирования ЦТЛ отмывали от культуральной среды, определяли количество и подвергали криоконсервации.

Оценка влияния человеческих ЦТЛ на здоровый глаз кролика при интравитреальном введении. В здоровый (левый) глаз K1 24.07.2018 ввели 1 × 10⁶ человеческих ЦТЛ в объеме 0,1 мл, а в здоровый (левый) глаз K2 ввели 5 × 10⁶ человеческих ЦТЛ в объеме 0,1 мл. К завершению эксперимента через 10 дней (02.08.2018) оба кролика обследованы. Цифровые изображения глазного дна зарегистрированы до эвтаназии. После смерти оба глаза энуклеированы и немедленно зафиксированы в 10 % формалине. Глаза переданы для секции и окрашены гематоксилин-эозином. Предполагалось оценить степень токсического воздействия ЦТЛ на оболочку глаза и внутриглазные структуры.

Оценка влияния человеческих ЦТЛ на внутриглазную модель человеческой РБ у кроликов. После

получения устойчивого роста опухоли в стекловидном теле правого глаза 24.07.2018 интравитреально ввели ЦТЛ человека. В больной (правый) глаз К1 ввели 1×10^6 человеческих ЦТЛ в объеме 0,1 мл. В больной (правый) глаз К2 ввели 5×10^6 человеческих ЦТЛ в объеме 0,1 мл. К завершению эксперимента через 10 дней (02.08.2018) оба кролика обследованы. Цифровые изображения глазного дна и ультразвуковое исследование глаз зарегистрированы до эвтаназии. После смерти оба глаза энуклеированы и немедленно зафиксированы в 10 % формалине. Глаза переданы для секции и окрашены гематоксилин-эозином. Предполагалось оценить степень токсического воздействия ЦТЛ на оболочки глаза и внутриглазные структуры, степень инвазии оболочек глаза опухолью, экстрасклеральный рост и степень лечебного патоморфоза. На момент окончания иммуносупрессии перед имплантацией клеточной линии человеческой РБ 21.06.2018 состояние лабораторных животных оценивалось как удовлетворительное, без органических дисфункций. Ежедневно после имплантации 21.06.2018 клеток WERI-Rb-1 осуществлялся поднаркозный осмотр глаз кроликов на ретинальной камере. На 7-й день после имплантации при офтальмоскопии у К1 не было признаков опухолевого роста, у К2 отмечен начальный рост РБ на сетчатке (рис. 1).

Повторное интравитреальное введение 0,1 мл клеток WERI-Rb-1 в концентрации 5×10^6 клеток/мл было проведено на 14-й день в правый глаз К1 в связи с сомнительным ростом опухоли, что продемонстрировано на рис. 2.

На 7-й день после повторного интравитреального введения клеток WERI-Rb-1 у К1 отмечен рост РБ (рис. 3), после пролонгации роста опухоли на 33-й день было проведено интравитреальное введение человеческих ЦТЛ (рис. 4). В здоровый (левый) глаз и пораженный РБ (правый) глаз К1 ввели 1×10^6 человеческих ЦТЛ в объеме 0,1 мл. В здоровый (левый) глаз и пораженный РБ (правый) глаз К2 ввели 5×10^6 человеческих ЦТЛ в объеме 0,1 мл.

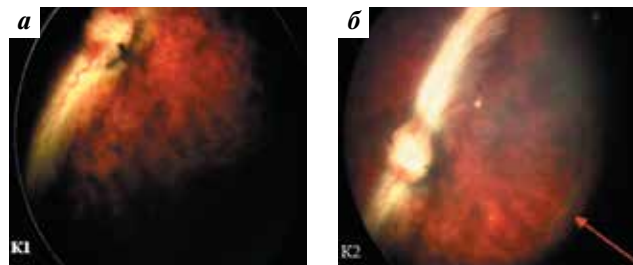


Рис. 1. Глазное дно на 7-й день: а – после имплантации клеток WERI-Rb-1 OD K1 без признаков роста РБ; б – после имплантации WERI-Rb-1 OD K2 начальный рост РБ на сетчатке (помечено стрелкой)

Fig. 1. Fundus on the 7th day: а – after implantation of WERI-Rb-1 OD K1 cells without signs of RB growth; б – after implantation of WERI-Rb-1 OD K2 initial RB growth on the retina (marked with an arrow)

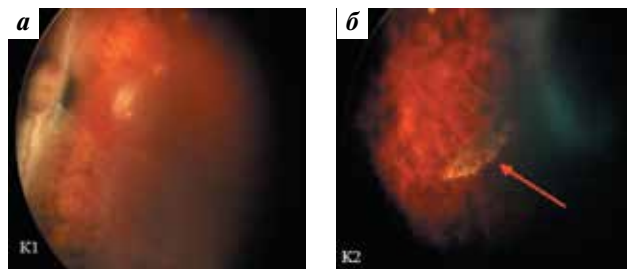


Рис. 2. Глазное дно на 14-й день: а – после имплантации клеток WERI-Rb-1 OD K1 без признаков роста РБ; б – после имплантации клеток WERI-Rb-1 OD K2 продолженный рост РБ (помечено стрелкой)

Fig. 2. Fundus on the 14th day: а – after implantation of WERI-Rb-1 OD K1 cells without signs of RB growth; б – after implantation of WERI-Rb-1 OD K2 cells continued growth of RB (marked with an arrow)

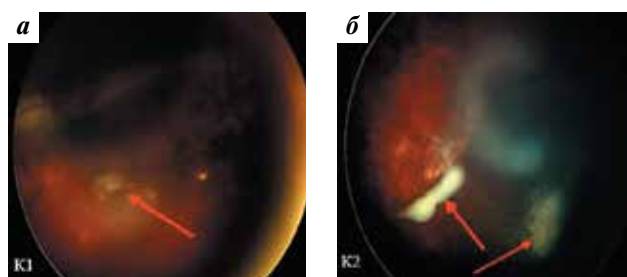


Рис. 3. Глазное дно: а – на 7-й день после повторной имплантации клеток WERI-Rb-1 отмечен рост РБ в OD K1; б – на 21-й день после имплантации клеток WERI-Rb-1 продолженный рост РБ в OD K2 (помечено стрелками)

Fig. 3. Fundus: а – on the 7th day after re-implantation of cells WERI-Rb-1 marked growth of RB in OD K1; б – on the 21st day after implantation of cells WERI-Rb-1 continued growth of RB in OD K2 (marked with arrows)

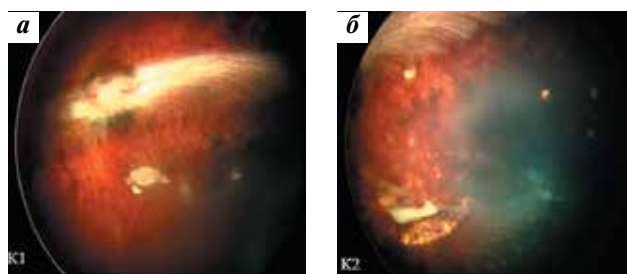


Рис. 4. Глазное дно на 33-й день после имплантации клеток WERI-Rb-1, продолженный рост опухоли в OD у K1 (а) и K2 (б)

Fig. 4. Fundus on the 33rd day after implantation of cells WERI-Rb-1 continued tumor growth in OD in K1 (а) and K2 (б)

К завершению эксперимента через 10 дней (02.08.2018) после введения человеческих ЦТЛ оба кролика обследованы. Цифровые изображения глазного дна зарегистрированы до эвтаназии (рис. 5, 6). Нежелательные местные проявления в виде воспаления, атрофии, отека, некроза, отслойки сетчатки, катаракты, гемофтальма и других не выявлены.

После эвтаназии К1 и К2 оба глаза у каждого животного энуклеированы и немедленно зафиксированы в 10 % формалине. Глаза переданы для секции

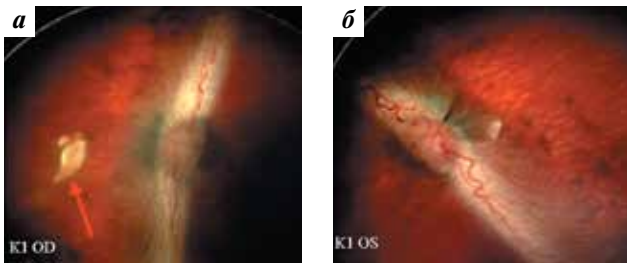


Рис. 5. Глазное дно: а – глазное дно OD K1, опухолевые очаги; б – нормальное глазное дно OS K1

Fig. 5. Fundus: a – fundus OD K1, tumor foci; б – normal fundus OS K1

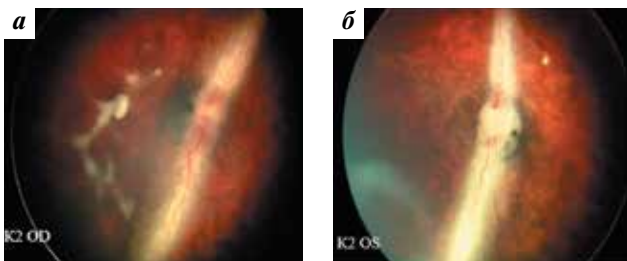


Рис. 6. Глазное дно: а – глазное дно OD K2, опухолевые очаги; б – нормальное глазное дно OS K2

Fig. 6. Fundus: a – fundus OD K2, tumor foci; б – normal fundus OS K2

и окрашены гематоксилин-эозином. Предполагалось оценить степень токсического воздействия ЦТЛ на оболочки глаза и внутриглазные структуры, степень инвазии оболочек глаза опухолью, экстрасклеральный рост и степень лечебного патоморфоза.

В правых пораженных опухолью глазах К1 и К2 были обнаружены очаги разрастания мелкокругло-клеточной опухоли сетчатки (рис. 7) с распространением

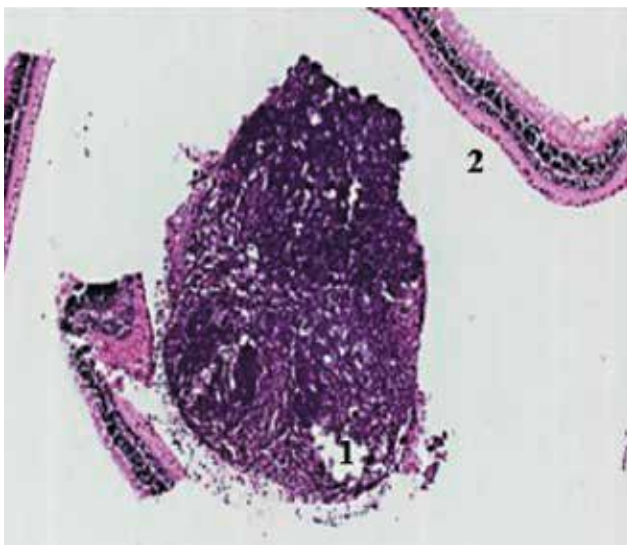


Рис. 7. Мелкокруглоклеточная опухоль сетчатки: 1 – опухолевый очаг, 2 – сетчатка

Fig. 7. Small cell retinal tumor: 1 – tumor focus, 2 – retina

на хориоидею (рис. 8), без экстрасклерального роста и признаков лечебного патоморфоза, со скудной лимфоидной инфильтрацией, без дистрофических изменений оболочек глаза. В обоих левых (контрольных) глазах К1 и К2 в области лимба выявлены единичные микроочаги лимфогистиоцитарного инфильтрата (точка инъекции при введении человеческих ЦТЛ).

Обсуждение

Адоптивная иммунотерапия подразумевает перенос больному иммунных клеток, обладающих активностью в отношении опухоли. Цитотоксический Т-лимфоцит может распознать клетку-мишень по крайней мере двумя способами: 1-й – антигензависимый, т.е. Т-лимфоцит узнает фрагмент опухолевого антигена вместе с молекулой главного комплекса гистосовместимости I класса на поверхности опухолевой клетки; 2-й – антигеннезависимый, т.е. за счет взаимодействия молекулы NKG2D на Т-лимфоците и стресс-индуцированных молекул MICA, MICB, ULBP1 на опухолевой клетке. В случае аллогенной системы, когда лимфоциты от одного человека, а опухоль (клеточная линия РБ) от другого, распознавание клетки-мишени может идти только 2-м способом. Новый виток интереса к адоптивной иммунотерапии связан с разработкой и внедрением в практику технологии CAR-T-клеточной терапии. Химерные CAR-T-клетки против клеточного поверхностного рецептора CD 19 показали свою высокую эффективность в лечении рецидивных и рефрактерных форм В-клеточных лимфобластных опухолей [16, 17]. В настоящее время ведутся исследования I фазы по применению адоптивной иммунотерапии при солидных опухолях,

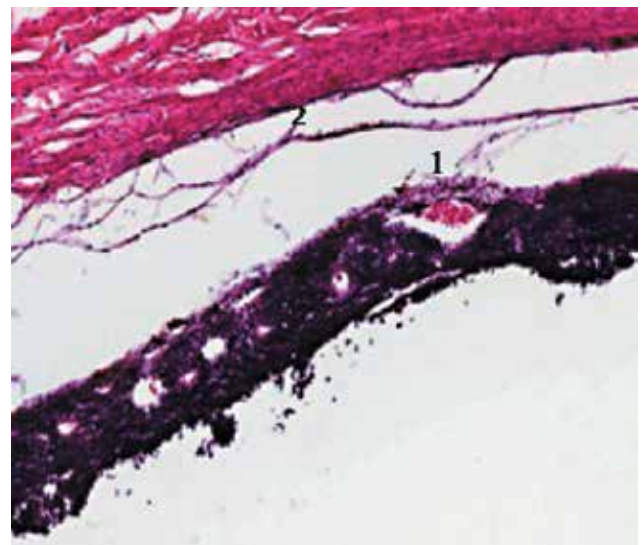


Рис. 8. Мелкокруглоклеточная опухоль сетчатки: 1 – инфильтрация опухолью хориоидеи; 2 – склера

Fig. 8. Small cell retinal tumor: 1 – infiltration by tumor choroid; 2 – sclera

таких как нейробластома, гепатоцеллюлярная карцинома, саркомы мягких тканей и глиомы головного мозга [18]. Применение человеческих ЦТЛ при макроскопической РБ может быть оправданным с целью создания внутриглазного иммунитета, так как известно, что глаз обладает весьма скудной лимфатической системой. С помощью иммуногистохимического окрашивания на маркеры эндотелия лимфатических сосудов (Pdrp и LYVE-1) и при гистологическом исследовании было показано наличие лимфатической системы в следующих структурах: в конъюнктиве, лимбе роговицы, цилиарном теле, слезной железе, интраорбитальной части твердой мозговой оболочки зрительного нерва и экстраокулярных мышцах. Кроме этого, есть доказательства наличия макрофагов в хориоиде, что можно рассматривать как часть лимфатической системы. В общем внутриглазная лимфатическая система у человека представлена только в цилиарном теле [19]. В нашем исследовании для создания модели макроскопической интраокулярной РБ, оценки токсического и возможно терапевтического действия ЦТЛ мы использовали глаза кролика, учитывая некоторую схожесть его строения с глазом человека и возможность регистрации глазных симптомов с помощью ретинальной камеры.

Заключение

Интравитреальное введение WERI-Rb-1 после предварительной иммуносупрессии привело к устой-

чивому росту опухоли в глазах испытуемых через 3 нед после имплантации. Для устойчивого роста опухоли *in vivo* необходима достаточная концентрация опухолевых клеток в 1 мл культуры, не менее 3×10^6 . Созданная модель человеческой РБ глаза кролика может хорошо визуализироваться с помощью ретинальной камеры. Введение человеческих ЦТЛ в концентрации от 1×10^6 до 5×10^6 в 0,1 мл не привело к дистрофическим и воспалительным изменениям в сетчатке и сосудистой оболочке здоровых глаз, за исключением обнаруженного единичного микроочага вблизи лимба, а также отмечены единичные лимфоциты в хориоиде, что может быть вариантом нормы. Скудная лимфоидная инфильтрация наблюдалась вокруг опухолевых разрастаний во всех образцах. Непродолжительный период наблюдения за опухолью не позволил сделать выводы об эффективности предложенного способа лечения, но используемые в эксперименте количества человеческих ЦТЛ не привели к дистрофическим изменениям клеток сетчатки и сосудистой оболочки глаза, что является важным фактором в преодолении токсичности предлагаемой адоптивной иммунотерапии. В дальнейшем мы планируем более подробно изучить цитотоксическое воздействие человеческих ЦТЛ на здоровые структуры глаза кролика, а также оценить эффективность применяемого метода, варьируя дозу и кратность введения человеческих ЦТЛ, и время наблюдения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Shields C.L., Honavar S.G., Shields A.J. et al. Factors predictive of recurrence of retinal tumors, vitreous seeds, and subretinal seeds following chemoreduction for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2002;120(4):460–4. DOI: 10.1001/archophth.120.4.460.
- Gündüz K., Günalp I., Yalçındağ N. et al. Causes of chemoreduction failure in retinoblastoma and analysis of associated factors leading to eventual treatment with external beam radiotherapy and enucleation. *Ophthalmology* 2004;111(10):1917–24. DOI: 10.1016/j.ophtha.2004.04.016.
- Berry J.L., Bechtold M., Shah S. et al. Not all seeds are created equal: seed classification is predictive of outcomes in retinoblastoma. *Ophthalmology* 2017;124(12):1817–25. DOI: 10.1016/j.ophtha.2017.05.03.
- Ghassemi F., Shields C.L. Intravitreal melphalan for refractory or recurrent vitreous seeding from retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2012;130(10):1268–71. DOI: 10.1001/archophthalmol.2012.1983.
- Shields C.L., Manjandavida F.P., Arepalli S. et al. Intravitreal melphalan for persistent or recurrent retinoblastoma vitreous seeds: preliminary results. *JAMA Ophthalmol* 2014;132(3):319–25. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2013.7666.
- Rao R., Honavar S.G., Sharma V., Reddy V.A.P. Intravitreal topotecan in the management of refractory and recurrent vitreous seeds in retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 2018;102(4):490–5. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2017-310641.
- Kiratli H., Koç İ., Varan A., Akyüz C. Intravitreal chemotherapy in the management of vitreous disease in retinoblastoma. *Eur J Ophthalmol* 2017;27(4):423–7. DOI: 10.5301/ejo.5000921.
- Abramson D.H., Catalanotti F., Brodie S.E. et al. Intravitreal chemotherapy and laser for newly visible subretinal seeds in retinoblastoma. *Ophthalmic Genet* 2018;39(6):353–6. DOI: 10.1080/13816810.2018.1443343.
- Abramson D.H., Ji X., Francis J.H. et al. Intravitreal chemotherapy in retinoblastoma: expanded use beyond intravitreal seeds. *Br J Ophthalmol* 2018;103(4):488–93. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2018-312037.
- Kivelä T., Eskelin S., Paloheimo M. et al. Intravitreal methotrexate for retinoblastoma. *Ophthalmology* 2011;118(8):1689. DOI: 10.1016/j.ophtha.2011.02.005.
- Ghassemi F., Shields C.L., Ghadimi H. et al. Combined intravitreal melphalan and topotecan for refractory or recurrent vitreous seeding from retinoblastoma. *JAMA Ophthalmol* 2014;132(8):936–41. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2014.414.2014.
- Долгушин Б.И., Ушакова Т.Л., Погребняков И.В. и др. Роль селективной

- интраартериальной и интравитреальной химиотерапии в органосохраняющем лечении детей с ретинобластомой. *Забайкальский медицинский вестник* 2018;1:7–24. [Dolgushin B.I., Ushakova T.L., Pogrebnyakov I.V. et al. The role of selective intraarterial and intravitreal chemotherapy in the organ-preserving treatment of children with retinoblastoma. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik = The Transbaikalian medical Bulletin* 2018;1:7–24. (In Russ.)].
13. Горовцова О.В., Ушакова Т.Л., Поляков В.Г. Современные возможности органосохраняющего лечения детей с интраокулярной ретинобластомой. *Онкопедиатрия* 2018;5(3):175–87. DOI: 10.15690/onco.v5i3.1935. [Gorovtsova O.V., Ushakova T.L., Polyakov V.G. Modern possibilities of organ-preserving treatment in children with intraocular retinoblastoma. *Onkopediatriya = Oncoepidemiology* 2018;5(3):175–87. (In Russ.)].
 14. Luke J.J., Flaherty K.T., Ribas A., Long G.V. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(8):463–82. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.43.
 15. Mayor M., Yang N., Sterman D. et al. Immunotherapy for non-small cell lung cancer: current concepts and clinical trials. *Eur J Cardiothorac Surg* 2016;49(5):1324–33. DOI: 10.1093/ejcts/ezv371.
 16. Rotolo A., Karadimitris A., Ruella M. Building upon the success of CAR T19: chimeric antigen receptor T cells for hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* 2017;59(9):2040–55. DOI: 10.1080/10428194.2017.1403024.
 17. Neelapu S.S., Locke F.L., Bartlett N.L. et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2017;377(26):2531–44. DOI: 10.1056/NEJMoa1707447.
 18. Tesfaye M., Savoldo B. Adoptive cell therapy in treating pediatric solid tumors. *Curr Oncol Rep* 2018;20(9):73. DOI: 10.1007/s11912-018-0715-9.
 19. Shintaro N., Hafezi-Moghadam A., Ishibashi T. Review Article. Lymphatics and Lymphangiogenesis in the Eye. *J Ophthalmol* 2012;2012:783163. DOI: 10.1155/2012/783163.

Благодарность. Авторы выражают благодарность заведующему отделением онкоофтальмологии и радиологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России доктору медицинских наук А.А. Яровому за предоставленную возможность доложить о результатах данного исследования на научно-практической конференции «Федоровские чтения – 2019».

Acknowledgment. The authors would like to express their gratitude to the head of the Department of Oncophthalmology and Radiology, S.N. Fedorov NMRC “MNTK “Eye Microsurgery”, Doctor of Medical Sciences A.A. Yarovoy for the opportunity to report the results of the study at the scientific and practical conference “Fedorov Readings – 2019”.

Вклад авторов

Т.Л. Ушакова: разработка дизайна исследования, офтальмологическое обследование лабораторных животных, имплантации клеточной линии РБ человека, интравитреальное введение человеческих ЦТЛ, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 И.С. Долгополов: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 З.А. Соколова: культивирование клеточной линии РБ человека, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 Г.З. Чкадуа: разработка дизайна исследования, культивирование человеческих ЦТЛ; анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 Н.С. Титов: сбор информации о международных данных по созданию модели внутриглазной опухоли у лабораторных животных;
 Ю.М. Букреев: организация содержания лабораторных животных, иммуносупрессивная подготовка животных;
 Ю.А. Серов: офтальмологическое обследование лабораторных животных, энуклеация глаз лабораторным животным; обзор данных по лимфатической системе глаза;
 О.В. Горовцова: офтальмологическое обследование лабораторных животных;
 Д.А. Булетов: энуклеация глаз лабораторным животным;
 Н.А. Козлов: гистологическое исследование, интерпретация полученных данных с фотоархивом;
 В.Г. Поляков: критические замечания, коррекция, редактирование.

Authors' contributions

T.L. Ushakova: developing the research design, ophthalmologic examination of laboratory animals; implanting human RB cell line, intravitreal administration of human CTLs; analysis of obtained data, writing the manuscript;
 I.S. Dolgoplov: developing the research design, analysis of obtained data, writing the manuscript;
 Z.A. Sokolova: cultivating human RB cell line; analysis of obtained data, writing the manuscript;
 G.Z. Chkadua: developing the research design cultivating human CTLs; analysis of obtained data, writing the manuscript;
 N.S. Titov: collecting international data on an intraocular tumor model in laboratory animals;
 Yu.M. Bukreev: maintenance of laboratory animals, animals' immunosuppressive preparation;
 Yu.A. Serov: ophthalmologic examination of laboratory animals; eye enucleation to the laboratory animals; reviewing data on the lymphatic eye system;
 O.V. Gorovtsova: ophthalmologic examination of laboratory animals;
 D.A. Buletov: eye enucleation to the laboratory animals;
 O.N. Kozlov: histological examination, interpreting obtained data using the photo archive;
 V.G. Polyakov: critical comments, correction, editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

Т.Л. Ушакова/T.L. Ushakova: <https://orcid.org/0000-0003-3263-6655>
 И.С. Долгополов/I.S. Dolgoplov: <https://orcid.org/0000-0001-9777-1220>
 З.А. Соколова/Z.A. Sokolova: <https://orcid.org/0000-0003-4755-5313>
 Г.З. Чкадуа/G.Z. Chkadua: <https://orcid.org/0000-0002-4633-049X>
 Н.С. Титов/N.S. Titov: <https://orcid.org/0000-0002-5151-4920>

Ю.А. Серов/S.Yu. Serov: <https://orcid.org/0000-0003-0634-3314>
О.В. Горовцова/O.V. Gorovtsova: <https://orcid.org/0000-0001-5402-062X>
Д.А. Булетов/D.A. Buletov: <https://orcid.org/0000-0002-8559-6709>
Н.А. Козлов/N.A. Kozlov: <https://orcid.org/0000-0003-3852-3969>
В.Г. Поляков/V.G. Polyakov: <https://orcid.org/0000-0002-8096-0874>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.
Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 11.08.2019. Принята в печать: 18.09.2019.
Article submitted: 11.08.2019. Accepted for publication: 18.09.2019.