

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

2021 • том 20 • № 4

Российский Биотерапевтический Журнал



Russian Journal
of Biotherapy

4

ТОМ 20
2021

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

теоретический и научно-практический рецензируемый журнал

Основная задача издания – публикация информации о современных достижениях в области изучения патогенеза, диагностики и терапии иммуноопосредованных и онкологических заболеваний, результатов научных исследований, национальных и международных доклинических и клинических исследований.

Цели журнала – информирование читателя о результатах изучения новых биомаркеров онкологических и иммуноопосредованных заболеваний, использования биомаркеров в диагностике и терапии злокачественных новообразований и патологий иммунной системы, исследований в области лекарственной и клеточной терапии, а также по вопросам технологии создания лекарств, биомедицинских клеточных продуктов и биоматериалов, проведения доклинических и клинических исследований новых препаратов и методов лечения; обобщение научных и практических достижений в области диагностики и терапии иммунологических и онкологических заболеваний.

ОСНОВАН В 2002 г. профессором А.Ю. Барышниковым

4^{ТОМ 20}
'21

Учредитель:
ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

Адрес учредителя и редакции:
115478, Москва, Каширское
шоссе, 24, стр. 2.

Тел.: +7 (499) 324-10-65
факс +7 (499) 324-22-74

E-mail: bioterapy_rbj@mail.ru
rbjournal@ronc.ru

Адрес издательства:
115478, Москва, Каширское
шоссе, 24, стр. 15, НИИ
канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Редактор Е.М. Печерская
Корректоры: Т.Н. Помилуйко,
Р.В. Журавлева

Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук

*Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых
коммуникаций. Регистрационный
номер: № 77-11695 от 21.01.2002 г.,
ПИ № ФС77-53039 от 04.03.2013 г.*

**При полной или частичной
перепечатке материалов
ссылка на журнал «Российский
биотерапевтический журнал»
обязательна.**

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)
Российский биотерапевтический журнал.
2021. Том 20. № 4. 1–76.
Сдано в печать: 00.00.2021.

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2021

Подписной индекс в каталоге агентства
«Роспечать» — 81679.
Отпечатано в типографии «Мэйл Текнолоджи».
105082, Москва, Переведеновский пер., 13, стр. 16.
Тираж 1000 экз. Бесплатно.
<http://bioterapevt.elpub.ru>

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Киселевский Михаил Валентинович, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Караулов Александр Викторович, академик РАН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Шпрах Зоя Сергеевна, к.фарм.н., заведующая лабораторией химико-фармацевтического анализа ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, доцент кафедры фармацевтической технологии и фармакологии ИПО ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Соколова Зинаида Александровна, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Балдуева Ирина Александровна, д.м.н., доцент, заведующая научным отделом онкоиммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Бунятян Наталья Дмитриевна, д.фарм.н., профессор, главный научный сотрудник Центра клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, заведующая кафедрой фармацевтической технологии и фармакологии ИПО ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Голенков Анатолий Константинович, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, профессор кафедры терапии, врач-гематолог отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (Москва, Россия)

Евсегнеева Ирина Валентиновна, д.м.н., профессор, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Краснов Виктор Павлович, д.х.н., профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией асимметрического синтеза Института органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН (Екатеринбург, Россия)

Меерович Игорь Геннадьевич, к.б.н., научный сотрудник департамента фармации Eurofins Lancaster Laboratories, Inc. (Каламазу, США)

Мисюрин Андрей Витальевич, д.б.н., генеральный директор ООО «Генотехнология» (Москва, Россия)

Набиев Игорь Руфаилович, д.х.н., профессор, профессор лаборатории по исследованиям в области нанонаук Реймского университета (Реймс, Франция), ведущий ученый лаборатории нано-биоинженерии Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» (Москва, Россия)

Новиков Виктор Владимирович, д.б.н., профессор, профессор кафедры молекулярной биологии и иммунологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, заведующий лабораторией иммунохимии ФБУН «Нижегородский Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» (Нижний Новгород, Россия)

Оборотова Наталия Александровна, д.фарм.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Панкратов Андрей Александрович, к.б.н., руководитель отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии Московского научного исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Петров Александр Юрьевич, д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармации и химии Уральского государственного медицинского университета (Екатеринбург, Россия)

Рапопорт Наталья Яковлевна, д.х.н., профессор, почетный профессор департамента биомедицинской инженерии Университета Юты (Солт-Лейк-Сити, США)

Соколова Татьяна Михайловна, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., советник вице-президента РАН (Москва, Россия)

Титов Константин Сергеевич, д.м.н., заведующий онкохирургическим отделением опухолей кожи и мягких тканей ГБУЗ г. Москвы «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения г. Москвы» (Москва, Россия)

Уласов Илья Валентинович, д.б.н., ведущий научный сотрудник, лидер группы экспериментальной биотерапии и диагностики Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Эстрин Юрий Захарович, д.ест.н., почетный доктор РАН, действительный член Австралийской академии наук, иностранный член РАН, профессор департамента материаловедения и инжиниринга Университета им. Монаша (Клэйтон, Австралия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Барышникова Мария Анатольевна, к.фарм.н., заведующая лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Бочарова Ольга Алексеевна, д.б.н., профессор, заведующая лабораторией иммунофармакологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Демидов Лев Вадимович, д.м.н., профессор, заведующий хирургическим отделением № 10 биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Иванов Павел Константинович, д.м.н., заведующий лабораторией медицинской биотехнологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кадагидзе Заира Григорьевна, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник централизованного клинико-лабораторного отдела ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Косоруков Вячеслав Станиславович, к.б.н., директор НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Тупицын Николай Николаевич, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией иммунологии гемопоэза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Шубина Ирина Жановна, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

The "Russian Journal of Biotherapy" is put on the Higher Attestation Commission list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses). Journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

Russian Journal of Biotherapy

Peer-reviewed theoretical and SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

The main objective of Russian Journal of Biotherapy is a publication of current achievements in the study of pathogenesis, diagnostics, and therapy of immune-mediated and oncological diseases, results of the research studies, and results of national and international pre-clinical and clinical studies.

The publication aim is to present the results of the studies of new biomarkers of oncological and immune diseases, the use of biomarkers in diagnostics and therapy of tumors and disorders of the immune system, studies in the field of drug and cell therapy, studies of drug development technologies, biomedical cell products and biomaterials, pre-clinical and clinical studies of new medicines and methods of treatment. The main focus of the journal is to summarize scientific and practical achievements in the field of immunological and oncological diseases therapy.

FOUNDED IN 2002 by Professor A.Yu. Baryshnikov

4^{VOL. 20}
'21

Founder:

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation

Founder and editorial office:

Bld. 2, 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478.

Tel.: +7 (499) 324-10-65
Fax: +7 (499) 324-22-74

e-mail: biotherapy_rbj@mail.ru
rbjournal@ronc.ru

Publishing office:

Research Institute of Carcinogenesis, Floor 3, Bld. 15, 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478.

Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Editor E.M. Pecherskaya
Proofreaders T.N. Pomiluyko,
R.V. Zhuravleva

Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

The journal is registered

at the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media
Registration number: ПИ № 77-11695 dated 21.01.2002;
ПИ № ФС 77-53039 dated 04.03.2013

If materials are reprinted in whole or in part, reference must necessarily be made to the "Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal".

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal. 2021. Volume 20.
No 4. 1–76. Submitted: 00.00.2021.
© PH "ABV-Press", 2021
Rospechat' catalogue index: 81679.
Printed at the Mail Technology Ltd
Bld. 16, 13 Perevedenovsky lane, Moscow 105082.
1,000 copies. Free distribution
<http://bioterapevt.elpub.ru>

EDITOR-IN-CHIEF

Mikhail V. Kiselevskiy, PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Cell Immunity, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

DEPUTIES EDITOR-IN-CHIEF

Alexander V. Karaulov, Academician of the Russian Academy of Sciences, PhD, DSc, Professor, Head of Chair of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Zoya S. Shprakh, PhD, Head of Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Analysis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, Associate Professor of Chair of Pharmaceutical Technology and Pharmacology of the Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

EXECUTIVE EDITOR

Zinaida A. Sokolova, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Experimental Diagnostic and Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Irina A. Baldueva, PhD, DSc, Associate Professor, Head of Research Department of Oncoimmunology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)

Natalia D. Bunyatyan, PhD, DSc, Professor, Major Researcher of Center of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of Russia, Head of Chair of Pharmaceutical Technology and Pharmacology of the Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Anatoly K. Golenkov, MD, PhD, DSc, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Professor of Chair of Therapy, Doctor Hematologist of Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, M.F. Vladimirsky Moscow Region Scientific Research Clinical Institute (MONIKI) (Moscow, Russia)

Irina V. Evsegneeveva, MD, PhD, DSc, Professor, Professor of Chair of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Viktor P. Krasnov, PhD, DSc, Professor, Major Researcher, Head of Laboratory of Asymmetrical Synthesis, I. Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of Russian Academy of Sciences (Ekaterinburg, Russia)

Igor G. Meerovich, PhD, Scientist II of Pharma Department, Eurofins Lancaster Laboratories, Inc. (Kalamazoo, USA)

Andrey V. Misyurin, PhD, DSc, General Director of LLC «GeneTechnology» (Moscow, Russia)

Igor R. Nabiev, PhD, DSc, Professor, Professor of Laboratory of Studies in the Field of Nanoscience, University of Reims (Reims, France), Leading Scientist of Laboratory Nano-Bioengineering, National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute) (Moscow, Russia)

Viktor V. Novikov, PhD, DSc, Professor, Professor of Chair of Molecular Biology and Immunology of the Institute of Biology and Biomedicine, N.I. Lobachevsky Nizhegorodsky State University, Head of Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Nizhniy Novgorod, Russia)

Natalia A. Oborotova, PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of Laboratory of Development of Drug Forms, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Andrey A. Pankratov, PhD, Chief of Department of Modifiers and Protectors of Anti-tumor Therapy, P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Alexander Yu. Petrov, PhD, DSc, Professor, Head of Chair of Pharmacy, Ural's State Medical University (Ekaterinburg, Russia)

Natalya Ya. Rapoport, Ph. D., DSc., Research Professor Emerita, Department of Biomedical Engineering, University of Utah (Salt Lake City, USA)

Tatiana M. Sokolova, PhD, DSc, Leading Researcher of Laboratory of Cell Engineering, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Eugenia V. Stepanova, PhD, DSc, Advisor to the Vice-President of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

Konstantin S. Titov, MD, PhD, DSc, Head of Department of Oncosurgery of Skin and Soft Tissues, A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Health Department (Moscow, Russia)

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

- А.В. Лобов, П.И. Иванова, Е.А. Погодина, В.И. Казей, Е.Д. Максимова, И.Ж. Шубина*
Оценка клеточного звена иммунитета при новой коронавирусной инфекции COVID-19 10
- Е.А. Погодина, А.В. Лобов, П.И. Иванова, В.И. Казей, И.Ж. Шубина*
Индукция иммунного ответа на SARS-CoV-2 при иммуносупрессивных состояниях 18
- Г.М. Волгарева*
Онкогенные папилломавирусы: репродуктивные осложнения у инфицированных мужчин 26
- К.С. Титов, А.А. Маркин, А.М. Казаков, С.В. Чулкова*
Роль новой изоформы *ALK* в диагностике и таргетной терапии меланомы кожи 33
- О.А. Бочарова, В.Б. Матвеев, Е.В. Бочаров, Р.В. Карпова, В.Г. Кучеряну*
Адгезионная концепция в биологии рака: местные и центральные механизмы (часть 2) 42

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- А.В. Пономарев, А.А. Рудакова, З.А. Соколова, М.А. Барышникова, В.С. Косоруков*
Влияние Poly(I:C) и меланомы B16-F10 на иммунофенотип клеток селезенки мышей 51
- Д.С. Воробьев, М.М. Токарская, С.А. Барановская, Е.А. Стефутушкина, О.М. Афанасьева, Е.А. Асташкина, О.В. Жигунова, Ю.В. Волох, А.Ю. Леонова, Е.С. Петухова, И.Б. Семенова, Д.Н. Нечаев, Е.О. Кравцова, Н.Н. Овечко, Н.Е. Ястребова, И.М. Грубер, Н.А. Михайлова*
Протективная активность смесей пневмококковых антигенов при инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3 59
- О.И. Тарасова, А.А. Рыжова, М.И. Савинова, В.Д. Бородин*
Как получить патент на изобретение. Рекомендации по оформлению материалов заявки 66

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ 75

REVIEWS

<i>Anton V. Lobov, Polina I. Ivanova, Ekaterina A. Pogodina, Vasily I. Kazey, Ekaterina D. Maksimova, Irina Zh. Shubina</i>	
Assessment of the cellular immunity response to the new coronavirus infection COVID-19	10
<i>Ekaterina A. Pogodina, Anton V. Lobov, Polina I. Ivanova, Vasily I. Kazey, Irina Zh. Shubina</i>	
Induction of anti-SARS-CoV-2 immune reactions in immune compromised patients	18
<i>Galina M. Volgareva</i>	
Oncogenic papillomaviruses: reproductive problems in infected males	26
<i>Konstantin S. Titov, Alexander A. Markin, Alexey M. Kazakov, Svetlana V. Chulkova</i>	
The role of a new <i>ALK</i> isoform in the diagnosis and targeted therapy of skin melanoma	33
<i>Olga A. Bocharova, Vsevolod B. Matveev, Evgeniy V. Bocharov, Regina V. Karpova, Valerian G. Kucheryanu</i>	
Adhesion concept in cancer biology: local and central mechanisms (part 2)	42

ORIGINAL REPORTS

<i>Aleksandr V. Ponomarev, Anna A. Rudakova, Zinaida A. Sokolova, Maria A. Baryshnikova, Vyacheslav S. Kosorukov</i>	
Effect of Poly(I:C) and melanoma B16-F10 on the immunophenotype of murine spleen cells	51
<i>Denis S. Vorobyev, Marina M. Tokarskaya, Sofia A. Baranovskaya, Elena A. Stefutushkina, Olga M. Afanasyeva, Elena A. Astashkina, Olga V. Zhigunova, Yury V. Volokh, Anna Yu. Leonova, Ekaterina S. Petukhova, Inna B. Semenova, Dmitriy N. Nechaev, Elena O. Kravtsova, Nikolay N. Ovechko, Natalia E. Yastrebova, Irina M. Gruber, Natalia A. Mikhailova</i>	
Protective activity of mixtures of pneumococcal antigens in infection caused by <i>Streptococcus pneumoniae</i> serotype 3	59
<i>Olga I. Tarasova, Anna A. Ryzhova, Marina I. Savinova, Vitaliy D. Borodin</i>	
How to get a patent for invention. Recommendations for drawing up application materials	66

INFORMATION FOR AUTHORS	75
--------------------------------	-----------

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-4-10-17>

Оценка клеточного звена иммунитета при новой коронавирусной инфекции COVID-19

А.В. Лобов¹, П.И. Иванова¹, Е.А. Погодина¹, В.И. Казей¹, Е.Д. Максимова¹, И.Ж. Шубина²

¹ООО «Экзакт Лабс»; Россия, 117246 Москва, Научный пр-д, 20, стр. 2;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Антон Викторович Лобов anton.lobov@exactelabs.com

В декабре 2019 г. человечество столкнулось с новой коронавирусной инфекцией, возбудитель которой был идентифицирован как SARS-CoV-2, а болезнь получила название COVID-19 (ковид). Для выявления инфицированных пациентов используют получившие широкое распространение тесты на основе полимеразной цепной реакции, способные обнаружить РНК SARS-CoV-2 в мазках из носа и ротоглотки. Однако не менее важным, а во многих случаях и единственным способом диагностики является оценка реакции на возбудитель различных звеньев иммунитета, таких как гуморальное и клеточное.

Цель предлагаемого обзора литературы – обобщить и проанализировать имеющиеся данные о формировании иммунного ответа и разрабатываемые подходы к комплексной характеристике иммунного ответа пациентов с подтвержденным контактом с возбудителем COVID-19 или в результате вакцинации.

В настоящее время эффективность антиковидной вакцинации и наличие иммунитета после перенесенного заболевания оценивают, определяя специфические антитела. Наблюдения показывают, что титры анти-S и анти-RDB IgG значительно снижаются через 6–8 мес после постановки диагноза. Важным моментом является то, что даже при падении уровней антител в крови переболевших пациентов обнаруживаются клетки памяти.

Обнаружить отдельные Т-, В-лимфоциты, отвечающие выбросом различных маркеров активации (цитокины, антитела) на представленные антигены, позволяет метод ELISPOT (Enzyme-linked immunospot), являющийся разновидностью ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

Для более полного понимания формирования и эффективности иммунной памяти к SARS-CoV-2 требуется оценка содержания и функциональной активности различных ее компонентов, включая В-лимфоциты, CD8⁺, CD4⁺-Т-лимфоциты, поскольку они имеют относительно независимые друг от друга механизмы действия клеточной памяти. В связи с этим актуальна оценка иммунитета к SARS-CoV-2, когда уровень антител становится недостаточным для их определения зарегистрированными тестами, и внедрение в клинико-диагностическую практику тест-систем, позволяющих выявить маркеры долговременной клеточной памяти.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, иммунный ответ на SARS-CoV-2, В- и Т-клеточная память, лабораторная диагностика, ELISPOT

Для цитирования: Лобов А.В., Иванова П.И., Погодина Е.А. и др. Оценка клеточного звена иммунитета при новой коронавирусной инфекции COVID-19. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(4):10–7. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-10-17.

Assessment of the cellular immunity response to the new coronavirus infection COVID-19

Anton V. Lobov¹, Polina I. Ivanova¹, Ekaterina A. Pogodina¹, Vasily I. Kazey¹, Ekaterina D. Maksimova¹, Irina Zh. Shubina²

¹Exacte Labs, LLC; Bld. 2, 20 Nauchny Proezd, Moscow 117246, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Contacts: Anton Viktorovich Lobov anton.lobov@exactelabs.com

In December 2019 humanity faced a new coronavirus infection caused by SARS-CoV-2 virus and the disease referred to as COVID-19 has spread globally.

Specially adapted for the detection of SARS-CoV-2 RNA tests based on polymerase chain reaction are used to identify infected patients by processing nasal and oropharyngeal swabs. However, often it may not be sufficient to use

polymerase chain reaction only, but in many cases it is very important to assess the humoral and cellular immune reactions to the infection.

The present review aims to summarize and analyze the available literature data on the formation of the immune response and diagnostic methods used for characteristics of the immune reactions in patients who recovered from COVID-19 or received an anti-COVID-19 vaccine.

Currently, the effectiveness of anti-COVID-19 vaccination and the developing immunity after a previous illness are assessed by detecting specific antibodies. A number of observations show that anti-S and anti-RDB IgG titers significantly decline within 6–8 months after diagnosis. It is important to note that although the antibody levels in the blood of recovered patients decrease, the memory cells can be determined by the appropriate tests.

The ELISPOT (Enzyme-linked immunospot) method, which is a variation of the ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), allows estimation the T- and B-cells that release activation factors such as cytokines and antibodies in response to the presented antigens.

The assessment of the generation and effective function of the immune memory to SARS-CoV-2 requires the evaluation of the content and functional activity of its various components, including B-lymphocytes, CD8⁺, CD4⁺ T-lymphocytes, since they have rather independent mechanisms of action of cellular memory.

Therefore, it is crucially important to have tools for evaluating the immunity to SARS-CoV-2 when the level of antibodies is insufficient for determination by the available registered tests, and the introduction of test systems into clinical diagnostic practice, allowing to identify markers of long-term cellular memory, are relevant.

Key words: coronavirus infection, immune response to SARS-CoV-2, B- and T-cell memory, laboratory diagnostics, ELISPOT

For citation: Lobov A.V., Ivanova P.I., Pogodina E.A. et al. Assessment of the cellular immunity response to the new coronavirus infection COVID-19. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(4): 10–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-10-17.

Введение

В декабре 2019 г. человечество столкнулось с новой коронавирусной инфекцией, возбудитель которой был идентифицирован как SARS-CoV-2, а болезнь получила название COVID-19 (ковид). Проявления COVID-19 могут варьировать от легких и умеренных гриппоподобных симптомов до смертельного поражения легких с развитием тяжелого острого респираторного синдрома (Severe acute respiratory syndrome, SARS) [1].

SARS-CoV-2 является оболочечным РНК-содержащим вирусом. РНК вируса кодирует структурные белки: спайк-белок (S), белки оболочки (E), мембранные белки (M) и белки нуклеокапсид (N). Остальная часть генома кодирует неструктурные белки (NSP), такие как РНК-зависимая РНК-полимераза, протеаза, геликаза и другие вспомогательные белки [2].

Структура, ответственная за проникновение вируса в клетку, — поверхностный спайковый тримерный гликопротеин (S-белок). S-белок состоит из 2 субъединиц — S1 и S2, в свою очередь, S1 состоит из N-концевого (NTD) и С-концевого (CTD1, CTD2 и CTD3) доменов [3]. При этом на CTD1 расположен рецепторсвязывающий домен (receptor-binding domain, RBD), обеспечивающий проникновение вируса в клетку путем взаимодействия с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2-го типа (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) на поверхности клеток хозяина с последующим его праймированием клеточной

трансмембранной сериновой протеазой 2 (TMPRSS2) [4]. Субъединица S2 имеет ключевую роль в слиянии мембран вируса и клетки.

Установлено, что антитела к S-белку, а именно к RBD, потенциально способны нейтрализовать вирус, поскольку рецепторсвязывающий участок открыт для взаимодействия с анти-RBD-антителами, в отличие от других структур вируса, таких как нуклеопротеин (NP), который скрыт вирусной или клеточной мембранами от комплементарных антител [5].

ACE2 — нетканеспецифичный рецептор, широко представленный на поверхности клеток многих органов и тканей. Существует 2 формы белка ACE2 — клеточная (трансмембранная) и циркулирующая (растворимая); показано, что последняя способна блокировать взаимодействие S-белка SARS-CoV с его рецептором [6]. Наибольшую роль в патогенезе SARS-CoV-2 играет клеточная форма ACE2, доступная для взаимодействия с вирусом и представленная, в частности, на поверхности эпителия верхних дыхательных путей, альвеолярных клеток 2-го типа и на энтероцитах тонкого кишечника [7].

Для выявления инфицированных пациентов используют получившие широкое распространение тесты на основе полимеразной цепной реакции, способные обнаружить РНК SARS-CoV-2 в мазках из носа и ротоглотки. Однако не менее важным, а во многих случаях и единственным способом диагностики является оценка реакции на возбудитель различных звеньев иммунитета, таких как гуморальное и клеточное.

Признано, что одним из эффективных способов предотвращения распространения инфекционных заболеваний является вакцинация. Острая необходимость в вакцине против COVID-19 послужила причиной смещения фокуса в разработках научно-исследовательских институтов, фармацевтических и биотехнологических компаний по всему миру и привела к созданию вакцин с использованием различных подходов и платформ в кратчайшие сроки, что требует дальнейшего изучения их эффективности и безопасности. Наиболее полно охарактеризовать эффективность вакцинопрофилактики возможно, только применив комплексный подход, способный показать степень вовлеченности всех звеньев приобретенного специфического иммунитета.

Цель настоящего обзора литературы — обобщить и проанализировать имеющиеся на данный момент данные о формировании иммунного ответа и разрабатываемые подходы к комплексной характеристике иммунного ответа пациентов с подтвержденным контактом с возбудителем COVID-19 или в результате вакцинации.

В качестве источников литературы использовали статьи, размещенные в базе данных PubMed Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США, кроме того, использовался накопленный опыт при проведении описанных ниже клеточных и серологических исследований для диагностики инфекционных заболеваний.

Оценка иммунного ответа на основе определения специфических антител

В настоящее время эффективность антиковидной вакцинации и наличие иммунитета после перенесенного заболевания оценивают, определяя специфические антитела [8], особое внимание уделяя анти-RBD SARS-CoV-2 IgG, при этом крайне редко проводят определение клеточного иммунитета (лишь в рамках научного исследования [9–11]; ни одного зарегистрированного теста на момент написания настоящего обзора (сентябрь 2021 г.) в Российской Федерации не представлено), который позволяет выявить специфически сенсibilизированные Т-лимфоциты.

Наблюдения показывают, что титры анти-S и анти-RBD IgG остаются относительно стабильными на протяжении периода до 6 мес после постановки диагноза, с последующим значительным снижением через 6–8 мес, что было продемонстрировано в исследовании, в то время как снижение уровней анти-S и анти-RBD IgM и IgA отмечалось уже между 1-м и 3-м месяцами после начала заболевания [12, 13].

N. Sherina и соавт. провели анализ динамики уровней антител методом иммуноферментного анализа (ИФА) у 88 пациентов, образцы крови которых были собраны в разные временные точки (через

7–240 дней после появления симптомов). Было показано, что после 28-го дня наблюдалось значительное снижение уровней анти-S и анти-RBD IgM и IgA, а значительное снижение анти-S и анти-RBD IgG наблюдалось только к 181–240-му дням (6–8 мес). В исследовании при оценке динамики антител показана относительная стабильность анти-S и анти-RBD IgG при сравнении титров антител в парных образцах от 27 человек. Сравнивались титры антител в пробах, взятых в среднем на 21-й день после появления симптомов и на 126-й день [12]. Авторы другого исследования показали в реакции истинной нейтрализующей способности достоверную корреляцию между титрами нейтрализации и связывания в ИФА, при этом отметили стабильные титры антител в течение не менее 3 мес и лишь незначительное снижение в 5-месячный период времени в 121 образце с известными титрами антител при диагностике ИФА-методом [13].

Важным наблюдением является то, что даже при падении уровней самих антител в крови переболевших пациентов обнаруживаются В-клетки памяти, которые способны продуцировать иммуноглобулины при стимуляции антигеном, что было показано N. Sherina и соавт. на 24 пациентах методом ELISPOT (Enzyme-linked immunospot), более подробно о котором будет сказано ниже. Примечательно, что RBD-специфические IgG-продуцирующие В-клетки были обнаружены у 33 % пациентов через 2–4 нед, у 93 % — через 3–6 мес и у 100 % — через 6–8 мес после появления симптомов. Можно предположить, что падение уровня антител не указывает на ослабление иммунитета против SARS-CoV-2. Соответственно, использование только антител в качестве маркера наличия иммунитета после выздоровления или вакцинации является недостаточным [12].

В другом исследовании В-клетки памяти, специфичные к S-белку, RBD и N-белку, определяли с помощью флуоресцентного окрашивания на IgD⁺ и/или CD27⁺ с дальнейшим подразделением поверхностных маркеров IgM, IgG или IgA. Тем самым было показано, что количество антигенспецифичных клеток нарастало до 120-го дня после начала заболевания с последующим выходом на плато. Важно то, что количество данных В-клеток памяти практически не обнаруживалось у людей, не перенесших заболевание COVID-19 [14].

Методы определения клеточного иммунитета

Обнаружить отдельные Т-, В-лимфоциты, отвечающие выбросом различных маркеров активации (цитокины, антитела) на представленные антигены, позволяет метод ELISPOT, являющийся разновидностью метода ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

В основе данного метода лежит обнаружение в суспензии моноклеарных клеток периферической крови (МНПК) специфически активированных клеток путем захвата мембраной микропланшета с иммобилизованным сорбентом (моноклональные антитела или антиген) индуцируемых ими продуктов. Для обнаружения Т-лимфоцитов в указанном методе используют различные цитокины, характерные для активированных Т-лимфоцитов, таких как интерлейкин 2, интерферон (ИФН) γ , фактор некроза опухоли α , гранзим В и др. [15]. Для обнаружения В-клеток или плазматических клеток после стимуляции специфическим антигеном используют в качестве маркера антиген-специфические антитела [16]. После инкубации и последовательных реакций иммунодетекции на мембране образуются тени (споты) отдельных клеток, пригодных для подсчета при помощи средств фотовизуализации (рис. 1). Тест-системы на данной платформе разрабатываются и производятся многими компаниями: T-SPOT.COVID (Oxford Immunotec, Великобритания), SARS-COV-2 ELISPOT (AID GmbH, Германия), ELISpot Path (Mabtech, Швеция), Corona T-test (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Россия), ТиграТест SARS-CoV-2 (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия).

На рис. 1 представлены фотографии, полученные в результате собственного исследования. Фотографии лунок культурального микропланшета получены после проведенного исследования методом ELISPOT ТиграТест SARS-CoV-2 (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия). МНПК были выделены на градиенте фикола с плотностью 1,077 г/мл от субъекта спустя 3 нед после 2-го компонента вакцины Гам-КОВИД-Вак (Спутник V). Суспензия клеток была внесена в лунки культурального микропланшета. Затем клетки стимулировали пулом пептидов SARS-CoV-2 в течение 16 ч в усло-

виях 37°C и 5 % CO₂. После чего продукцию ИФН- γ оценивали с помощью ELISPOT. Фото лунок было сделано с помощью Elispot Reader System (AID, Германия).

Представленные 4 фотографии иллюстрируют результат исследования Т-клеточного иммунитета для 1 субъекта. Обнаружен выраженный индуцированный выброс ИФН- γ в ответ на представленные пептиды S-белка, что свидетельствует об их вакциноиндуцированной сенсibilизированности. Ответ на структурные белки (N, M, ORF3a, ORF7a) не выявлен. Спонтанная продукция ИФН- γ Т-лимфоцитами не превышает допустимого уровня. Способность индуцированной выработки ИФН- γ соответствует установленному критерию.

Описанный метод в модификации с использованием соответствующего протокола и культурального микропланшета способен выявить, помимо Т-клеточного иммунного ответа, специфические В-лимфоциты – плазматические клетки или клетки, секретирующие антитела (antibody secreting cells, ASC), в основе обнаружения которых лежит регистрация секретируемых ими антител.

Определение антигенспецифических антител не позволяет в полной мере охарактеризовать гуморальное звено иммунного ответа, поскольку не отражает наличие и активность В-клеток памяти, которые могут приобретать фенотип клеток памяти CD19⁺/CD27⁺ и становиться ASC. Это было показано при исследовании В-клеток памяти (методом ELISPOT), специфических к антигенам коклюша, столбняка, кори и гриппа. Авторы исследования В-клеток памяти [17] производили поликлональную стимуляцию человеческих МНПК, что приводило к пролиферации и дифференцировке В-клеток памяти с фенотипом CD19⁺/CD27⁺ в секретирующие

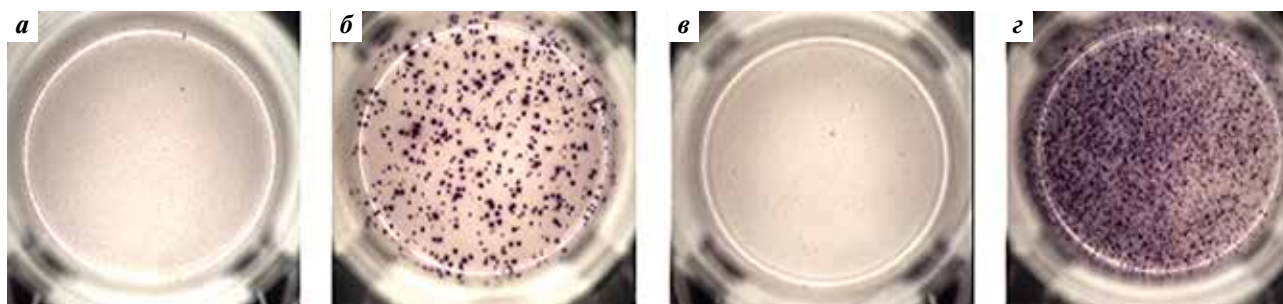


Рис. 1. Визуализация Т-клеточного ответа с помощью ELISPOT: а – после инкубации без добавления специфического антигенного индуктора с целью оценки спонтанной продукции интерферона γ ; б – после инкубации с добавлением специфического антигенного индуктора: пул пептидов S-белка; в – после инкубации с добавлением специфического антигенного индуктора: пул пептидов структурных белков (N, M, ORF3a, ORF7a); г – после инкубации с добавлением моноклонального антитела ОКТ-3, для неспецифической индукции интерферона γ в целях оценки функциональной активности Т-лимфоцитов. $\times 20$

Fig. 1. Visualization of the T-cell response with ELISPOT: а – after incubation without any specific antigen inducer in order to evaluate the spontaneous production of interferon γ ; б – after incubation with the addition of a specific antigenic inducer, a pool of S-protein peptides; в – after incubation with the addition of a specific antigenic inducer, a pool of structural protein peptides (N, M, ORF3a, ORF7a); г – after incubation with the addition of monoclonal antibody OCT-3, for non-specific induction of interferon γ in order to assess the functional activity of T-lymphocytes. $\times 20$

антитела клетки. Тем самым авторам удалось обнаружить антигенспецифические В-клетки памяти против компонентов бактериальных вакцин (*Bordetella pertussis* и столбняка), а также вирусных вакцин (против кори и гриппа) даже у людей с низкими титрами сывороточных антител [17].

Установлено, что В-клетки памяти могут существовать при отсутствии определяемых уровней антител в сыворотке [18] и их быстрая дифференцировка и выработка антител могут иметь большое значение для формирования протективного гуморального ответа. Таким образом, комбинированное использование методов анализа В-клеток и уровней антител в сыворотке может дать более полное понимание индивидуального иммунного статуса, опосредованного В-клетками, и служить маркером наличия долгосрочного клеточного иммунитета.

Впервые применение метода ELISPOT для количественной оценки В-клеток, продуцирующих специфические антитела, было описано в 1983 г. [19]. С тех пор регулярно предпринимаются попытки оптимизировать протокол исследования, в частности осуществляется поиск оптимальных неспецифических активаторов В-клеток, таких как агонист TLR R848 совместно с интерлейкином 2, которые были выбраны в качестве наиболее эффективной комбинации [20]. В то время как активные плазмциты, потенциально присутствующие в крови, можно исследовать непосредственно без активации *in vitro* в В-клеточном ELISPOT, для В-клеток памяти требуется предварительная длительная (не менее 72–98 ч) стимуляция антигеннезависимым активатором для их дифференцировки в определяемые ASC, что является существенным недостатком [21].

Альтернативным вариантом анализа IGRA (Interferon gamma release assay) является количественное определение уровня ИФН- γ (без подсчета теней (спотов) отдельных клеток) в плазме после инкубации цельной крови со смесью антигенов (индукторов). Тест-система QuantiFERON®-TB Gold (QIAGEN, Нидерланды), разрешенная и зарегистрированная в России для диагностики туберкулезного инфицирования, в том числе латентного, основана на данном подходе, однако разработанный вариант для диагностики COVID-19 под названием QuantiFERON SARS-CoV-2 и аналог от немецкой компании – CoV-2 IGRA (EUROIMMUN, Германия) не зарегистрированы и не применяются на территории Российской Федерации (на момент написания обзора, сентябрь 2021 г.).

Оценка Т-клеточного звена иммунитета

Клеточный иммунный ответ является крайне важным фактором в сдерживании SARS-CoV-2, что подробно рассматривается в одном из обзоров литературы по иммунологическим механизмам, ле-

жащим в основе COVID-19 [22]. Также на важность клеточного иммунного ответа указывает связь умеренного и тяжелого течения COVID-19 с частой выраженной лимфопенией [23].

Помимо вышесказанного, возросший интерес к изучению клеточного иммунитета обусловлен распространением новых штаммов вируса SARS-CoV-2 и возможной неэффективностью ранее приобретенных антител по отношению к ним. В отличие от антител, паратопы которых после успешной вакцинации нацелены на RBD-фрагмент S-белка (для большинства полученных вакцин), Т-клетки нацелены как минимум на 15–20 различных фрагментов белков коронавируса [24]. Это может послужить дополнительным аргументом в пользу классических инактивированных цельновирусных вакцин, которые способны формировать Т-клеточный иммунитет и антитела к различным эпитопам большого числа белков возбудителя SARS-CoV-2. Антитела способны нейтрализовать вирус, тогда как Т-лимфоциты уничтожают инфицированные клетки (цитотоксические Т-клетки, цитотоксические лимфоциты CD8⁺) или инициируют иммунный ответ, стимулируя выработку антител и активность цитотоксических лимфоцитов путем создания оптимального цитокинового окружения для направления иммунного ответа (с помощью CD4⁺-Т-хелперов). Формирование сенситизации к большему количеству антигенных детерминант значительно усложняет ускользание возбудителя от иммунной системы в результате возникновения точечных мутаций.

Способность Т-клеток распознавать новые мутации вируса SARS-CoV-2, проявляя перекрестную реактивность, была показана при исследовании различных пулов МНПК, собранных до появления COVID-19, но специфичных к простудным коронавирусам человека, таким как HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 и HCoV-HKU1 [25], что можно использовать в качестве доказательной базы того, что последующие мутации SARS-CoV-2 не смогут в полной мере ускользнуть от уже сформированного специфического клеточного иммунитета. При этом указанные данные вносят свой вклад в понимание различий в восприимчивости к инфекции и клинических результатах лечения пациентов после контакта с новой коронавирусной инфекцией.

Интерес к оценке индивидуального клеточного иммунитета в научной среде вызывает исследование T. Sekine и соавт., где показано наличие Т-клеточного иммунитета у серонегативных членов семьи и выздоравливающих лиц с бессимптомным и легким течением COVID-19 в анамнезе, что может объясняться низкой, но эпизодической вирусной нагрузкой. В исследовании были обнаружены SARS-CoV-2-специфические CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетки у серонегативных

лиц с частотой 41 %. Причем подобная ситуация наблюдалась у 3 из 31 пациента, перенесших COVID-19 в легкой степени, у 9 из 28 серонегативных членов семьи и у 5 из 31 человека с бессимптомной формой [26]. Вероятно, сочетание низких эпизодических вирусных нагрузок с имеющейся клеточной памятью к другим коронавирусам позволяет быстро нарастить перекрестно реагирующий пул Т-лимфоцитов, который препятствует развитию инфекции SARS-CoV-2 [27]. Описанные выше обстоятельства могут объяснить отсутствие специфических антител у контактировавших с инфицированными пациентами как результат того, что реакции Т-клеточного иммунитета оказывается достаточно для элиминации вируса без необходимости запуска гуморального звена с синтезом антител.

Немалую роль в таких случаях, вероятно, играют и неспецифические факторы защиты, такие как система комплемента, натуральные киллеры (НК-клетки), интерфероны. В случае SARS-CoV-2 предполагается, что вирус очень эффективно уклоняется от запуска ранних врожденных иммунных реакций, опосредованных, например, функцией ИФН 1-го и 3-го типов. Было показано, что SARS-CoV-2 оказывает влияние на запуск внутриклеточных врожденных механизмов, связанных с ИФН 1-го и 3-го типов *in vitro* и *in vivo* [28, 29]. Отсутствие полноценного отклика врожденного иммунитета ограничивает активацию адаптивных иммунных реакций. Отмечается, что если компоненты врожденного звена иммунитета не были подавлены вирусом, то инфекция протекает в бессимптомной или легкой форме, так как активация адаптивных иммунных реакций происходит относительно быстро [30].

Существенным ограничением определения Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 является то, что он основан на выявлении эффекторных Т-клеток, продолжительность циркуляции которых в периферической крови исчисляется месяцами (до 6–8 мес) [14] в случае их активации [12].

Оценка В-клеточного звена иммунитета

В связи с вышесказанным изучение и внедрение тестов для оценки В-клеточного звена долговременной памяти, особенно в случаях когда специфические поствакцинальные или после перенесенного заболевания антитела либо Т-клеточный иммунитет уже не определяют, имеют определяющее значение для установления иммунного статуса и прогноза результата контактов с SARS-CoV-2.

Установлено наличие В-клеток памяти к гомологичным участкам других простудных коронавирусов (HCoV) у лиц, не имевших контакта с SARS-CoV-2 [18]. Важно, что обнаружена возможность их пролиферации с последующим синтезом антител к гомо-

логичным участкам S2-субъединицы (имеющей более высокую гомологию среди коронавирусов, чем S1 [16, 17]) и нуклеокапсида, обладающих перекрестной активностью в отношении SARS-CoV-2. Эти данные имеют существенное значение для установления иммунного статуса по отношению к COVID-19 для лиц, у которых нет в анамнезе SARS-CoV-2 или вакцинации [18]. Особенно следует отметить наличие перекрестных комплементарных антител, что было показано для детей и подростков [20], и, по-видимому, является следствием более высокой частоты встречаемости простудных заболеваний, вызванных коронавирусами (HCoV) в детских коллективах. Примечательно, что в исследовании W. Kevin и соавт. была выявлена специфическая нейтрализующая активность сыворотки доноров, не инфицированных SARS-CoV-2, против псевдотипов SARS-CoV-2 и SARS-CoV-2-S в соответствии с уровнями S-связывающего IgG SARS-CoV-2 и с эффективностью, сопоставимой с эффективностью сыворотки пациентов с COVID-19 [19].

Одним из ключевых аспектов оценки клеточного иммунитета является обнаружение В-клеточной памяти после вакцинации или перенесенной инфекции SARS-CoV-2. Формирование и сохранение ее было показано и при уменьшении антител [31], при этом долгоживущие В-клетки памяти способны обеспечить быстрое производство специфических анти-RBD S1 и S2 COVID-19-антител.

В исследовании J.M. Dan и соавт. с участием 188 пациентов с подтвержденным COVID-19, 43 из которых были протестированы через 6 и более месяцев после заболевания, было показано, что количество В-клеток памяти в образцах крови пациентов через 6 мес после заболевания было больше, чем через 1 мес после заболевания, и не снижалось значимым образом в период до 8 мес. RBD-специфические В-клетки памяти отображали кинетику, аналогичную кинетике S-специфических В-клеток памяти. Однако подобного не наблюдалось для SARS-CoV-2-специфических CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток, период полужизни которых составил 3–5 мес [14]. Предполагается, что долгоживущие В-клетки памяти способны обеспечить быстрое производство специфических анти-RBD S1 и S2 COVID-19-антител.

Заключение

Для более полного понимания формирования и эффективности иммунной памяти к SARS-CoV-2 требуется оценка содержания и функциональной активности различных ее компонентов, включая В-лимфоциты, CD8⁺-, CD4⁺-Т-лимфоциты, поскольку они имеют относительно независимые друг от друга механизмы действия клеточной памяти. При этом В-клеточный механизм действия приводит к формированию

наиболее долговременной памяти (через 5–8 мес уровень специфических антител и количество В-клеток памяти сохранялись практически неизменными). В связи с этим актуальна оценка иммунитета к SARS-CoV-2, когда уровень антител становится недостаточным для их определения зарегистрированными тестами, и внедрение в клинико-диагностическую практику тест-систем, позволяющих выявить маркеры долговременной клеточной памяти. Очевидно, что для проведения мероприятий, направленных на диагностику и лечение новой коронавирус-

ной инфекции требуется оптимальная тест-система или установленный комплекс исследований, способных, помимо гуморального звена, оценивать Т- и В-клеточный иммунитет и долговременную иммунологическую память и при этом пригодных для рутинной клинико-диагностической практики. Важным становится и повышение осведомленности врачей клинических специальностей о способах оценки клеточного звена иммунитета и значении комплексного подхода к определению иммунного статуса пациентов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 11 (07.05.2021). М., 2020. Р. 6. [Temporary guidelines "Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19)" Version 11 (07.05.2021). Moscow, 2021. С. 6. (In Russ.)].
2. Kim D.S., Rowland-Jones S., Gea-Malvarqui E. Will SARS-CoV-2 Infection Elicit Long-Lasting Protective or Sterilising Immunity? Implications for Vaccine Strategies (2020). *Front Immunol* 2020;11:571481. DOI: 10.3389/fimmu.2020.571481.
3. Gui M., Song W., Zhou H. et al. Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. *Cell Res* 2017;27(1):119–29. DOI: 10.1038/cr.2016.152.
4. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schröder S. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020;181(2):271–80. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
5. Amanat F., Krammer F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity* 2020;52(4):583–9. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.03.007.
6. Lambert D.W., Yarski M., Warner F.J. et al. Tumor necrosis factor- α convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem* 2005;280(34):30113–9. DOI: 10.1074/jbc.M505111200.
7. Ziegler C.G.K., Allon S.J., Nyquist S.K. et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell* 2020;181(5):1016–35. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.035.
8. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V. et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet* 2021;397(10275):671–81. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00234-8.
9. Потеряев Д.А., Хамитов Р.А., Ефимов Г.А. и др. Перспективы использования технологической платформы ELISPOT в системе противоэпидемических мероприятий против новой коронавирусной инфекции COVID-19. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2020;20(3):146–58. DOI: 10.30895/2221-996X-2020-20-3-146-158. [Poteryaev D.A., Khamitov R.A., Efimov G.A. et al. Prospects for Using the ELISPOT Technological Platform as Part of Anti-Epidemic Measures Against the New Coronavirus Infection COVID-19. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2020;20(3):146–58. DOI: 10.30895/2221-996X-2020-20-3-146-158. (In Russ.)].
10. Cassaniti I., Percivalle E., Bergami F. et al. SARS-CoV-2 specific T-cell immunity in COVID-19 convalescent patients and unexposed controls measured by ex vivo ELISPOT assay. *Clin Microbiol Infect* 2021;27(7):1029–34. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.03.010.
11. Wu S., Zhong G., Zhang J. et al. A single dose of an adenovirus-vectored vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge. *Nat Commun* 2020;11(1):1–7. DOI: 10.1038/s41467-020-17972-1.
12. Sherina N., Piralla A., Du L. et al. Persistence of SARS-CoV-2-specific B and T cell responses in convalescent COVID-19 patients 6–8 months after the infection. *Med (N Y)* 2021;2(3):281–95. DOI: 10.1016/j.medj.2021.02.001.
13. Wajnberg A., Amanat F., Firpo A. et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science* 2020;370(6521):1227–30. DOI: 10.1126/science.abd7728.
14. Dan J.M., Mateus J., Kato Y. et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* 2021;371(6529):eabf4063. DOI: 10.1126/science.abf4063.
15. Slota M., Lim J.B., Dang Y. et al. ELISpot for measuring human immune responses to vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2011;10(3):299–306. DOI: 10.1586/erv.10.169.
16. Crotty S., Aubert R.D., Glidewell J. et al. Tracking human antigen-specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system. *J Immunol Methods* 2004;286(1–2):111–22. DOI: 10.1016/j.jim.2003.12.015.
17. Buisman A.M., de Rond C.G., Oztürk K. et al. Long-term presence of memory B-cells specific for different vaccine components. *Vaccine* 2009;28(1):179–86. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.09.102.
18. West D.J., Calandra G.B. Vaccine induced immunologic memory for hepatitis B surface antigen: implications for policy on booster vaccination. *Vaccine* 1996;14(11):1019–27. DOI: 10.1016/0264-410x(96)00062-x.
19. Czerkinsky C.C., Nilsson L.A., Nygren H. et al. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983;65(1–2):109–21. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90308-3.
20. Jahnmatz M., Kesa G., Netterlid E. et al. Optimization of a human IgG B-cell ELISPOT assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. *J Immunol Methods* 2013;391(1–2):50–9. DOI: 10.1016/j.jim.2013.02.009.
21. Bernasconi N.L., Traggiai E., Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells.

- Science 2002;298(5601):2199–202.
DOI: 10.1126/science.1076071.
22. Vabret N., Britton G.J., Gruber C. et al. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity* 2020;52(6):910–41.
DOI: 10.1016/j.immuni.2020.05.002.
 23. Ni L., Ye F., Cheng M.L. et al. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. *Immunity* 2020;52(6):971–7.
DOI: 10.1016/j.immuni.2020.04.023.
 24. Tarke A., Sidney J., Kidd C.K. et al. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. *Cell Rep Med* 2021;2(2):100204.
DOI: 10.1016/j.xcrn.2021.100204.
 25. Mateus J., Grifoni A., Tarke A. et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science* 2020;370(6512):89–94.
DOI: 10.1126/science.abd3871.
 26. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Baltes O. et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell* 2020;183(1):158–168.
DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.017.
 27. Braun J., Loyal L., Frentsch M. et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature* 2020;587(7833):270–4.
DOI: 10.1038/s41586-020-2598-9.
 28. Bastard P., Rosen L.B., Zhang Q. et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 2020;370(6515):eabd4585.
DOI: 10.1126/science.abd4585.
 29. Blanco-Melo D., Nilsson-Payant B.E., Liu W.C. et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* 2020;181(5):1036–45.
DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.026.
 30. Sette A., Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell* 2021;184(4):861–80.
DOI: 10.1016/j.cell.2021.01.007.
 31. Nguyen-Contant P., Embong A.K., Kanagaiah P. et al. S Protein-Reactive IgG and Memory B Cell Production after Human SARS-CoV-2 Infection Includes Broad Reactivity to the S2 Subunit. *mBio* 2020;11(5):e01991–20.
DOI: 10.1128/mBio.01991-20.

Вклад авторов

А.В. Лобов, П.И. Иванова: сбор и анализ данных литературы, написание текста статьи;
И.Ж. Шубина: разработка дизайна обзора, участие в написании текста статьи;
Е.А. Погодина, В.И. Казей, Е.Д. Максимова: анализ источников литературы.

Authors contributions

A.V. Lobov, P.I. Ivanova: collection and analysis of literature data, writing the text of the article;
I.Zh. Shubina: review design development, participation in writing the text of the article;
E.A. Pogodina, V.I. Kazey, E.D. Maksimova: analysis of literature sources.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.В. Лобов / A.V. Lobov: <https://orcid.org/0000-0002-4703-5863>
П.И. Иванова / P. I. Ivanova: <https://orcid.org/0000-0002-3481-2854>
Е.А. Погодина / E.A. Pogodina: <https://orcid.org/0000-0002-0421-3287>
Е.Д. Максимова / E.D. Maksimova: <https://orcid.org/0000-0003-2027-6621>
В.И. Казей / V.I. Kazey: <https://orcid.org/0000-0003-2032-6289>
И.Ж. Шубина / I.Zh. Shubina: <https://orcid.org/0000-0002-9374-3158>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 01.10.2021. Принята к публикации: 22.10.2021.

Article submitted: 01.10.2021. Accepted for publication: 22.10.2021.

Индукция иммунного ответа на SARS-CoV-2 при иммуносупрессивных состояниях

Е.А. Погодина¹, А.В. Лобов¹, П.И. Иванова¹, В.И. Казей¹, И.Ж. Шубина²

¹ООО «Экзактэ Лабс»; Россия, 117246 Москва, Научный пр-д, 20, стр. 2;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Екатерина Александровна Погодина ekaterina.pogodina@exactelabs.com

Цель обзора – изучение иммунного ответа на коронавирусную инфекцию (COVID-19), вызываемую вирусом SARS-CoV-2, у разных категорий людей, в том числе у лиц с заведомыми нарушениями иммунитета, обусловленными как сопутствующими заболеваниями, так и иммуносупрессивной терапией.

Особый интерес представляют Т-клетки, в частности их роль в сравнении с выработкой антител, а также эффективность Т-клеточного иммунитета против инфекции SARS-CoV-2 и в обеспечении устойчивости к повторному инфицированию. Все состояния, сопровождающиеся ослабленным иммунитетом, такие как аутоиммунные заболевания, не аутоиммунные воспалительные заболевания, состояния, связанные с воздействием препаратов-иммуносупрессоров, и, несомненно, онкологические патологии, повышают восприимчивость к SARS-CoV-2 и развитию COVID-19, а также ухудшают течение болезни.

Ряд исследований подтверждает, что пациенты с онкологическими патологиями подвержены риску нарушений иммунного ответа, связанных с основным злокачественным заболеванием, а также получением иммуномодулирующей терапии онкологического заболевания. Однако при этом в ряде исследований была показана иммуногенность после вакцинации у пациентов с сопутствующей иммуносупрессией.

Метотрексат, антиметаболит фолиевой кислоты, может быть применен как в высоких дозах в качестве антиметаболита в терапии онкологических заболеваний, так и в низких дозах в качестве иммуносупрессора при аутоиммунных патологиях. В связи с этим в обзоре также рассматриваются результаты исследования, в ходе которого была проведена оценка гуморального и клеточного иммунного ответа на вакцину BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) против COVID-19 у пациентов, принимающих метотрексат. Частота выработки антител была ниже у группы пациентов, принимающих метотрексат, однако уровень Т-клеточного ответа был сходным во всех исследуемых группах. При отсутствии вакцинации показатели гуморального иммунитета пациентов с онкологическими заболеваниями были низкими в сравнении с пациентами контрольных групп. Однако при вакцинации пациентов с сопутствующей иммуносупрессией отмечался клеточный и гуморальный иммунный ответ на вакцинопрофилактику.

В некоторых исследованиях показано, что тяжесть течения COVID-19 у ВИЧ-инфицированных пациентов сопоставима с данными по этому критерию у населения в целом, что дает основания предположить адекватный иммунный ответ на SARS-CoV-2 у таких пациентов.

Таким образом, при рассмотренных в статье иммуносупрессивных состояниях возможно образование гуморального и клеточного иммунитета к коронавирусной инфекции, однако для подтверждения этих данных требуются дополнительные исследования.

Ключевые слова: Т-клеточный иммунитет, COVID-19, метотрексат, вакцинация, онкология

Для цитирования: Погодина Е.А., Лобов А.В., Иванова П.И. и др. Индукция иммунного ответа на SARS-CoV-2 при иммуносупрессивных состояниях. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(4):18–25. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-18-25.

Induction of anti-SARS-CoV-2 immune reactions in immune compromised patients

Ekaterina A. Pogodina¹, Anton V. Lobov¹, Polina I. Ivanova¹, Vasily I. Kazey¹, Irina Zh. Shubina²

¹Exacte Labs LLC; Bld. 2, 20 Nauchny Proezd, Moscow 117246, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Contacts: Ekaterina Aleksandrovna Pogodina ekaterina.pogodina@exactelabs.com

The aim of the review is studying the immune response to the new coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by the SARS-CoV-2 virus in different populations, including those with immunosuppression due to concomitant diseases or immunosuppressive therapy.

The role of T cells in building up the anti-COVID-19 immunity is of special interest, particularly, when comparing T cell and antibody based immunity. A number of studies are focused on the effectiveness of T-cell immunity against SARS-CoV-2 infection, as well as on the resistance to re-infection. The decreased immunity associated with such illnesses as autoimmune diseases, non-autoimmune inflammations, and the effect of immunosuppressive drugs and obviously, different cancers increase the susceptibility to SARS-CoV-2 and COVID-19 development, and exacerbate the course of the disease.

Several studies showed that patients with cancer are at risk of impaired immune response associated with a malignant neoplasm. The inefficient immune response was also shown in cancer patients receiving immunomodulatory therapy. However, some studies registered the specific immunogenicity after vaccination in patients with concomitant immunosuppression.

Methotrexate is a folate antimetabolite. The drug can be used both in high doses as an antimetabolite in the anti-tumor therapy, and in low doses as an immunosuppressive agent in patients with autoimmune diseases. Therefore, the review also discusses a study that evaluated the humoral and cellular immune response to the BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) anti-COVID-19 vaccine in patients receiving methotrexate. The rate of antibody production was lower in patients receiving methotrexate, though the level of T-cell response was similar in all groups studied.

The review discussed immune compromised patients with cancer and hematological malignancies and patients living with HIV who had COVID-19. Most studies reported no significant differences of COVID-19 outcomes between major population and the patients with suppressed immune system.

Hereby, the cell and humoral immune response in immune compromised patients is possible, however, additional studies are required to confirm these data.

Key words: T-cell immunity, COVID-19, methotrexate, vaccination, cancer

For citation: Pogodina E.A., Lobov A.V., Ivanova P.I. et al. Induction of anti-SARS-CoV-2 immune reactions in immune compromised patients. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(4): 18–25. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-18-25.

Введение

В период распространения новой коронавирусной инфекции (COVID-19), вызываемой вирусом SARS-CoV-2, особую актуальность приобретает изучение иммунного ответа на инфекцию у разных категорий людей, в том числе у лиц с заведомыми нарушениями иммунитета, обусловленными как сопутствующими заболеваниями, так и иммуносупрессивной терапией.

Оценка вирусспецифической иммунной памяти, формирующейся в ответ на перенесенный COVID-19 в обычных условиях в течение как минимум 6-месячного периода, необходима для определения устойчивости иммунной памяти к SARS-CoV-2. Для комплексной оценки иммунного статуса необходимо измерять титр антител, определять наличие В-клеток памяти, CD4⁺-Т-клеток и CD8⁺-Т-клеток в периферической крови субъектов, выздоровевших от COVID-19, в течение по крайней мере 8 мес после заражения.

Иммунная память, формирующаяся после COVID-19, включает все 4 основных типа иммунной памяти. В исследовании J.M. Dan [1] было показано, что около 95 % субъектов сохранили иммунную память примерно через 6 мес после заражения. Однако титр циркулирующих антител не коррелировал с уровнем Т-клеточной памяти. Таким образом, про-

стые серологические тесты на антитела к SARS-CoV-2 не отражают полностью устойчивость иммунной памяти к SARS-CoV-2. Эти результаты важно учитывать при оценке защитного иммунитета против SARS-CoV-2 и повторного заболевания COVID-19.

Роль клеточного звена иммунитета в устойчивости к новой коронавирусной инфекции

Особый интерес представляют Т-клетки, в частности их роль в сравнении с выработкой антител. Растущий интерес сосредоточен на эффективности Т-клеточного иммунитета против инфекции SARS-CoV-2 и в обеспечении устойчивости к повторному инфицированию. Более того, анализ специфических Т-клеток пациентов, перенесших COVID-19, подтверждает, что клеточный иммунитет остается активным в отношении сразу нескольких вариантов вируса [2].

Был изучен иммунный ответ Т-клеток на структурные (нуклеокапсидный (N) белок) и неструктурные (NSP7 и NSP13 ORF1) участки вируса SARS-CoV-2 у пациентов, выздоравливающих от COVID-19 ($n = 36$) [3]. У всех пациентов были обнаружены CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетки, специфичные к нескольким областям N-белка. Затем было показано, что пациенты

($n = 23$), перенесшие SARS (заболевание, ассоциированное с инфекцией SARS-CoV), обладают Т-клетками памяти, которые демонстрируют ответ на N-белок SARS-CoV через 17 лет после вспышки SARS в 2003 г.; эти Т-клетки продемонстрировали устойчивую перекрестную активность с N-белком SARS-CoV-2. Также были обнаружены Т-клетки, специфичные для SARS-CoV-2, у субъектов, не имевших в анамнезе SARS, COVID-19 или контакта с пациентами с подтвержденным SARS и/или COVID-19 ($n = 37$). SARS-CoV-2-специфические Т-клетки у неинфицированных доноров реагировали на участки NSP7 и NSP13, а также на белок N. Характеристика эпитопа NSP7-специфичных Т-клеток показала распознавание фрагментов белка, которые являются консервативными среди бета-коронавирусов животных, но имеют низкую гомологию с коронавирусами человека, ассоциированными с «обычной простудой». Таким образом, инфицирование бета-коронавирусом индуцирует разнонаправленный и длительный Т-клеточный иммунитет против структурного N-белка. Понимание того, как N- и ORF1-специфические Т-клетки, присутствующие в общей популяции, влияют на патогенез и восприимчивость к инфекции SARS-CoV-2, имеет важное значение для разработки подходов к борьбе с текущей эпидемией COVID-19.

Клеточное звено иммунитета также реагирует на вакцинацию против COVID-19.

В ходе исследования М.М. Painter и соавт. был проанализирован клеточный иммунный ответ в группе участников, не имеющих COVID-19 в анамнезе ($n = 36$), и перенесших SARS-CoV-2 ($n = 11$), которые впоследствии получили вакцины на основе мРНК [4]. Было обнаружено, что 1-я доза вакцины вызывает иммунный ответ со стороны Т-хелперов ($CD4^+$ -Т-лимфоциты), часть из которых способствует выработке антител, а другая стимулирует пролиферацию цитотоксических $CD8^+$ -Т-клеток (цитотоксических Т-лимфоцитов). Интенсивность первичного ответа $CD4^+$ -Т-лимфоцитов коррелирует с последующей выработкой антител и цитотоксических Т-лимфоцитов.

Антигенспецифичные $CD4^+$ -Т-клеточные ответы на 1-ю дозу вакцины усиливаются 2-й дозой у субъектов, ранее не имевших контакта с SARS-CoV-2. Большинство участников, перенесших ранее SARS-CoV-2, имели четко определяемые антигенспецифичные популяции $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-клеток на исходном уровне, в отличие от участников, не имевших SARS-CoV-2 в анамнезе. Только у 24 (71 %) из 34 субъектов, не перенесших COVID-19, был обнаружен $CD8^+$ -Т-клеточный ответ после 1-й дозы. Вторая доза вакцины индуцировала выработку $CD8^+$ -Т-клеток у 22 (88 %) из 33 участников, ранее не инфицированных SARS-CoV-2 [4].

Эти данные демонстрируют индукцию антигенспецифических Т-клеток путем вакцинации мРНК, которая может способствовать, помимо гуморального ответа, стойкому Т-клеточному иммунитету.

Иммунный ответ на SARS-CoV-2 при онкологических заболеваниях

Все состояния, сопровождающиеся ослабленным иммунитетом, такие как аутоиммунные заболевания, не аутоиммунные воспалительные заболевания, состояния, связанные с воздействием препаратов-иммуносупрессоров, и, конечно, онкологические патологии, повышают восприимчивость к развитию COVID-19 и ухудшают течение болезни [5].

А. Massarweh и соавт. исследовали гуморальный иммунный ответ на SARS-CoV-2 у пациентов с солидными злокачественными новообразованиями в период активной противоопухолевой терапии [6]. В работе приведены данные о 90 % серопозитивности у 102 пациентов с солидным опухолем в Израиле, протестированных не менее чем через 12 дней после получения 2-й дозы вакцины мРНК BNT162b2, по сравнению со 100 % серопозитивностью у условно здоровых добровольцев. Средний титр иммуноглобулина G (IgG) у онкологических пациентов был ниже, чем у контрольной группы (1931 AU/мл против 7160 AU/мл).

В другой работе [7] представлены результаты популяционного исследования распространенности антител к SARS-CoV-2 среди 500 пациентов с онкологическими заболеваниями и 1190 медицинских работников в Японии, проведенного с августа по октябрь 2020 г. Хотя распространенность антител к SARS-CoV-2 была низкой и не различалась между онкологическими пациентами и медработниками (1,0 % против 0,67 %), уровни IgG против N-белка и спайкового (S) белка были значительно ниже среди пациентов со злокачественными заболеваниями.

Задачами исследования L. Monin и соавт. [8] стало изучение и сравнение безопасности и иммуногенности 1 или 2 доз вакцины BNT162b2 против COVID-19 у онкологических пациентов. В исследование был включен 151 пациент (95 пациентов с солидными опухолями и 56 — с гематологическими злокачественными заболеваниями) и 54 здоровых добровольца в качестве контрольной группы (в основном медицинские работники) из 3 лондонских больниц в период с 8 декабря 2020 г. по 18 февраля 2021 г. Участники, вакцинированные с 8 по 29 декабря 2020 г., получили 2 дозы BNT162b2 по 30 мкг, вводимые внутримышечно с интервалом 21 день; пациенты, вакцинированные после этой даты, получали только 1 дозу 30 мкг с запланированной повторной вакцинацией через 12 нед. В задачи исследования входила оценка времени, в течение которого происходила

выработка детектируемого уровня специфических антител против S-белка вируса SARS-CoV-2 после введения 1 или 2 доз вакцин. Результаты показали, что у онкологических пациентов 1 доза вакцины BNT162b2 дает низкую эффективность по выработке антител. Иммуногенность значительно повысилась у пациентов с солидными опухолями в течение 2 нед после повторной вакцинации — на 21-й день после 1-й дозы. L. Sun и соавт. [9] считают, что онкологические пациенты подвержены риску нарушений иммунного ответа, связанных с основным злокачественным заболеванием, а также при проведении этим пациентам химиотерапии или противоопухолевой иммуномодулирующей терапии.

Эффективный иммуносупрессор – метотрексат

Как было упомянуто выше, к факторам, нарушающим адекватную реакцию иммунной системы пациентов, относится применение иммуносупрессоров в терапии различных заболеваний. Одним из наиболее давно и широко применяемых цитостатиков является метотрексат. Метотрексат относится к препаратам группы антиметаболитов и является структурным аналогом и антагонистом фолиевой кислоты. Создание антиметаболитов фолиевой кислоты обосновано тем, что тетрагидрофолиевая кислота имеет важное значение для биосинтеза многих метаболитов нуклеинового обмена, особенно тимидиловой кислоты и пуринилнуклеозидов. Поскольку в опухолевых клетках биосинтетические процессы происходят довольно быстро, потребность в этих соединениях повышена. Этот механизм действия обуславливает применение метотрексата в высоких дозах в терапии онкологических заболеваний, в том числе у детей.

В низких дозах метотрексат применяется для лечения трофобластических опухолей, острого лимфобластного лейкоза и неходжкинских лимфом, грибкового микоза, тяжелых форм псориаза, а также при ревматоидном артрите, когда неэффективны другие методы терапии. Кроме того, препарат может быть применен в высоких дозах в качестве антиметаболита в терапии онкологических заболеваний.

Применение интенсивной химиотерапии, в том числе с использованием высоких доз метотрексата, позволило снизить детскую смертность при остеосаркоме [10]. Однако большой проблемой остаются тяжелые побочные эффекты и токсичность данного препарата [11, 12]. Гепатотоксичность была рассмотрена в ходе исследования у детей с остеосаркомой. При введении метотрексата контролировались уровни аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы, билирубина. Было подтверждено, что при введении высоких доз метотрексата показатели резко возрастают, возвращаясь

в норму только после выведения метотрексата [13]. Были также проанализированы клинические случаи задержек выведения метотрексата при применении его в высоких дозах и сопутствующая гепатотоксичность [14].

В результате ряда исследований было установлено, что метотрексат обладает иммуносупрессивным действием. В низких дозах метотрексат применяется в качестве иммуносупрессора при лечении аутоиммунных заболеваний (в том числе ревматоидного артрита) [15].

Например, ранее было проведено 18-недельное плацебо-контролируемое исследование 189 пациентов с активным ревматоидным артритом [16]. Изначально пациенты получали метотрексат в дозе 7,5 мг/нед с увеличением дозы до 15 мг/нед. У всех пациентов при применении метотрексата наблюдалось улучшение параметров эффективности: у 32 % пациентов индекс болезненности суставов снизился как минимум на 50 %, а у 21 % наблюдалось аналогичное снижение индекса отека суставов. Таким образом, при лечении аутоиммунных заболеваний использование иммуносупрессоров в низких дозах является успешным практическим методом.

Вакцинопрофилактика COVID-19 на фоне применения иммуносупрессоров

Известно, что иммуносупрессивный статус может наблюдаться у различных групп пациентов с онкологическими заболеваниями, получающих химиотерапию или таргетную иммунотерапию. Пациентов, принимающих терапевтические иммунодепрессанты для лечения иммуноопосредованных воспалительных заболеваний, обычно не включают в клинические исследования вакцин, например, такая популяция пациентов была исключена из испытаний вакцины Гам-КОВИД-Вак (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) против COVID-19 [17, 18].

Тем не менее в исследовании S.K. Mahil и соавт. проводилась оценка гуморального и клеточного иммунного ответа на вакцину BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) против COVID-19 у пациентов, принимающих метотрексат и препараты таргетной иммунотерапии, в сравнении со здоровыми добровольцами из контрольной группы [19, 20]. В период с 14 января по 4 апреля 2021 г. в исследование были включены 84 пациента с псориазом (17 пациентов, получавших терапию, основанную на метотрексате; 27 — на ингибиторах фактора некроза опухоли; 15 — на ингибиторах интерлейкина (ИЛ) 17; 25 — на ингибиторах ИЛ-23) и 17 здоровых добровольцев в качестве контрольной группы. Иммуногенность оценивали до вакцинации и на 28-й день (± 2 дня) после вакцинации. Частота выработки антител была ниже у пациентов, получавших иммунодепрессанты, чем у пациентов контрольной

группы: 60 (78 %; 95 % доверительный интервал (ДИ) 67–87) из 77 и 17 (100 %; 95 % ДИ 80–100) из 17 соответственно. При этом с наименьшей частотой титр специфических антител отмечался у пациентов, получавших метотрексат: 7 (47 %; 95 % ДИ 21–73) из 15. В то же время специфический Т-клеточный иммунный ответ формировался у пациентов всех групп. Уровень Т-клеточного ответа, определяемый по продукции интерферона γ , ИЛ-2, ИЛ-21 и других цитокинов, также был сходным во всех исследуемых группах.

COVID-19 при гематологических злокачественных заболеваниях

К настоящему времени в результате многочисленных исследований показано, что приблизительно 1/3 пациентов с диагностированным COVID-19 в тяжелой форме с необходимостью госпитализации имеют неблагоприятный прогноз заболевания при сопутствующих гематологических злокачественных заболеваниях. Пациенты со злокачественными лимфоидными заболеваниями относятся к категории тех, кто подвержен особому риску как заражения COVID-19, так и неблагоприятного исхода данного заболевания. Обзор данных из более чем 80 источников [21] показал, что у пациентов с лимфоидными злокачественными заболеваниями регистрируют 33–41 % смертность при заражении SARS-CoV-2. Риск смерти от COVID-19 у таких пациентов в 2 раза выше, чем у населения в целом.

Неожиданным оказался результат некоторых исследований, в которых было обнаружено небольшое или полное отсутствие негативного влияния на излечение от COVID-19 сопутствующей или недавно завершённой противоопухолевой терапии пациентов с лимфомами. Известно, что наиболее эффективное лечение этого типа злокачественных заболеваний сопряжено со значительной лимфоплецией. Логично было бы ожидать, что нормальный иммунный ответ на SARS-CoV-2 будет скомпрометирован под воздействием препаратов, применяемых при лечении пациентов с лимфомой, что повлечет за собой продолжительное и более тяжелое течение инфекционной болезни. Однако даже на ранних этапах распространения новой коронавирусной инфекции стало ясно, что такие последствия проявляются не всегда. Часто начало инфекционного заболевания характеризуется слабовыраженными симптомами, которые, если их не контролировать, переходят к 10-м суткам в тяжелую форму, ассоциированную с «цитокиновым штормом» в результате индукции реакций адаптивного иммунитета. Можно предположить, что иммуносупрессивное действие противоопухолевых препаратов, применяемых при лимфоме, может оказывать позитивное влияние на этой стадии развития COVID-19,

снижая гиперпродукцию провоспалительных цитокинов [21]. Такая возможность основана на изучении механизма запуска «цитокинового шторма».

В работе, посвященной иммунопатогенезу COVID-19, всесторонне рассмотрен механизм развития «цитокинового шторма» и перспективы его преодоления [22]. В частности, отмечается, что при мониторинге течения COVID-19 наибольшее прогностическое значение имеет лимфопения, отражающая степень прогрессирования заболевания и наблюдавшаяся у 85 % критически больных пациентов с COVID-19. Индикатором прогноза может служить как относительное содержание, так и абсолютное количество лимфоцитов в периферической крови. У пациентов с COVID-19, особенно при тяжелом течении, лимфопения развивалась главным образом за счет уменьшения количества $CD4^+$ -Т-хелперов. При этом не наблюдалось значительного изменения количества $CD8^+$ -Т-клеток и В-клеток. Выраженная лимфопения сопровождалась не только снижением числа $CD3^+CD4^+$ -Т-клеток, но и ингибированием их дифференцировки из наивных $CD4^+$ -Т-клеток в эффекторные клетки памяти, которые являются одним из наиболее важных компонентов адаптивного противоинфекционного иммунитета. Известно, что баланс между наивными $CD4^+$ -Т-хелперами и Т-клетками памяти имеет решающее значение для формирования эффективного иммунного ответа. У больных с тяжелыми формами инфекции COVID-19 отмечалось также уменьшение Т-регуляторных клеток, которые играют ключевую роль в ослаблении гипертрофического ответа при вирусной инфекции [23]. При инфекции, вызванной SARS-CoV-2, отмечается повышенная экспрессия активационных маркеров Т-клеток, таких как CD69, CD38, CD44 и CD134 (OX40), стимулирующих клональную экспансию лимфоцитов и продукцию различных, в том числе провоспалительных, цитокинов. Активированные Т-лимфоциты характеризуются повышенной продукцией ИЛ-2, интерферона γ , а также высоким уровнем содержания внутриклеточных цитокинов, таких как ИЛ-6 и GM-CSF, которые играют важную роль в индукции «цитокинового шторма» при коронавирусных инфекциях.

При борьбе с интоксикацией при COVID-19 основное внимание сосредоточено на нивелировании гипертрофического ответа. Однако авторы отмечают, что не менее важной проблемой является развитие иммуносупрессивных состояний, вплоть до иммунопаралича, которые приводят к присоединению вторичной инфекции. Иммуносупрессия развивается вследствие апоптоза лимфоцитов и их фагоцитоза активированными макрофагами, что проявляется в виде прогрессирующей лимфопении, преимущественно за счет снижения содержания в крови

Т-хелперов. Т-хелперы являются центральным звеном в регуляции адаптивного Т- и В-клеточного иммунитета посредством секреции регуляторных цитокинов. Таким образом, для адекватного применения имеющихся схем лечения основного и сопутствующего заболеваний важно понимание механизма иммуноопосредованных осложнений коронавирусной инфекции, чтобы в борьбе с «цитокиновым штормом» не пропустить момент «иммунного штиля», переходящего в иммунопаралич [22].

В связи с противоопухолевой терапией пациентов с лимфомами отмечается, что при заболевании COVID-19, несмотря на обеспокоенность по поводу иммуносупрессивного действия препаратов, связанных с В-клеточной деплецией, в частности ритуксимаба, повышенного риска смерти обнаружено не было. Напротив, некоторые препараты, такие как ибрутиниб, могут оказаться более эффективны благодаря их модифицирующему действию в отношении опасной гипертрофической фазы инфекционного заболевания [21]. Вследствие этого очевидна необходимость оценки гуморального и клеточного звеньев иммунитета у таких пациентов.

В исследовании L.E. Roeker и соавт. [24] было включено 30 пациентов с хроническим лимфолейкозом и инфекцией SARS-CoV-2, подтвержденной методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Из них 4 пациента умерли от COVID-19. У 21 из 30 пациентов в среднем через 55 дней после подтверждения COVID-19 определяли антитела IgG к SARS-CoV-2. Исследование показало, что у 33 % пациентов (7 из 21) не было антител класса G после перенесенного заболевания. При этом всего 3 (21 %) из 14 пациентов с выявленными антителами IgG получали во время заболевания COVID-19 лечение по поводу хронического лимфолейкоза, в то же время 4 (57 %) из 7 пациентов без выявленного гуморального ответа также получали противоопухолевую терапию. Это позволяет предположить негативное влияние противоопухолевой терапии на образование антител IgG после перенесенного заболевания.

В исследовании K. Woźniak и соавт. [25] описан клинический случай пациента с первичной В-клеточной лимфомой, который в ходе лечения бессимптомно перенес COVID-19. Пациент при положительном результате ПЦР-анализа на РНК SARS-CoV-2 адекватно отвечал на основное лечение. В ходе лечения было принято решение не использовать ритуксимаб из-за риска негативного эффекта на течение бессимптомного COVID-19, однако после получения отрицательного результата ПЦР-анализа пациент продолжил терапию ритуксимабом.

В целом терапия иммуносупрессантами при лимфомах снижает уровень гуморального иммунитета после перенесенного COVID-19 [26, 27]. Тем не менее

Т-клеточному ответу, который в данном случае может представлять ключевое звено иммунной защиты, уделяется недостаточное внимание.

Инфекция SARS-CoV-2 у пациентов с вирусом иммунодефицита человека

В настоящее время более 38 млн человек во всем мире являются носителями вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [28]. Из них, по оценочным данным, всего 26 млн человек получают антиретровирусную терапию (АРТ), при этом большинство из тех, кто не получает АРТ, живут в странах Африки, к югу от Сахары, и эта категория является группой риска для тяжелого течения COVID-19. К счастью, до сих пор не было выявлено территориального совпадения распространенности COVID-19 и ВИЧ.

Однако следует отметить, что вследствие распространения заболеваемости COVID-19 и сопутствующих проблем в функционировании служб профилактики и лечения ВИЧ было зарегистрировано увеличение смертности от ВИЧ/синдрома приобретенного иммунодефицита в 2020 г.

В работе J. Ambrosioni и соавт. [28] рассматривается целый ряд исследований течения заболевания и иммунного ответа на SARS-CoV-2 у ВИЧ-инфицированных пациентов. В этих исследованиях учитывались пол и возраст пациентов, количество CD4⁺-Т-лимфоцитов, вирусная нагрузка ВИЧ и сопутствующие заболевания. Представленные данные оказались вполне ожидаемыми. Так же, как у пациентов без ВИЧ-инфекции в анамнезе, факторами риска тяжелого течения COVID-19 у ВИЧ-инфицированных пациентов оказались возраст, мужской пол и сопутствующие заболевания, такие как артериальная гипертензия, сердечно-сосудистые заболевания, хроническая болезнь легких, ожирение и диабет.

В обзоре S. Prabhu и соавт. [29] описан ряд исследований, подтверждающих, что показатели зарегистрированной смертности от COVID-19 ВИЧ-инфицированных пациентов не отличались от таковых данных для общей популяции пациентов с COVID-19; сходными оказались и данные по критериям необходимости госпитализации и искусственной вентиляции легких у этих категорий пациентов.

В частности, в исследовании, проведенное в Нью-Йорке K. Sigel и соавт. [30], были включены 88 пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19, имеющих ВИЧ в анамнезе и получавших АРТ. В контрольную группу были включены 405 ВИЧ-отрицательных пациентов с подтвержденным COVID-19. В результате анализа данных различий в тяжести течения COVID-19 между 2 группами выявлено не было: 18 % пациентов с ВИЧ нуждались в искусственной вентиляции легких и 21 % умерли во время исследования, аналогичные

показатели в контрольной группе составили 23 и 20 % соответственно.

Существует предположение, что ВИЧ-инфицированные субъекты с количеством CD4⁺-Т-лимфоцитов менее 200 клеток на мкл входят в группу риска развития более тяжелой формы COVID-19 [28]. В то же время АРТ восстанавливает иммунный статус у пациентов с ВИЧ, что дает основание ожидать адекватного иммунного ответа у таких пациентов. Однако данных, полностью подтверждающих взаимосвязь течения и формирования иммунитета к SARS-CoV-2 и наличия ВИЧ-инфекции и ее терапии, в настоящий момент недостаточно (возможно, будут проведены дополнительные исследования в будущем) [28].

Заключение

В различных исследованиях был обнаружен как гуморальный иммунный ответ в сочетании с клеточным, так и только клеточный иммунный ответ на вакцинацию. Иммуносупрессия, вызванная соответствующими заболеваниями или сопутствующей терапией, изначально рассматривалась как противопоказание к вакцинации от COVID-19 (на примере исследований с применением вакцин Гам-КОВИД-Вак (ФГБУ

«НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) и BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)) вследствие предполагаемой неэффективности вакцинации. При отсутствии вакцинации показатели гуморального иммунитета пациентов с онкологическими заболеваниями были низкими в сравнении с пациентами контрольных групп. Такие же результаты были получены у пациентов, получавших иммуносупрессивную терапию. Тем не менее при вакцинации пациентов с сопутствующей иммуносупрессией отмечался клеточный и гуморальный иммунный ответ на проводимую вакцинопрофилактику.

В ряде исследований было показано, что тяжесть течения COVID-19 у ВИЧ-инфицированных пациентов сопоставима с данными по этому критерию у населения в целом, что дает основания предположить адекватный иммунный ответ на SARS-CoV-2 у таких пациентов. Однако на данный момент результаты лабораторных показателей ВИЧ-инфицированных пациентов с COVID-19 или прошедших вакцинацию практически отсутствуют. Проведения исследований по иммунной реакции на SARS-CoV-2 пациентов с иммунокомпрометированным статусом следует ожидать в будущем.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Dan J.M., Mateus J., Kato Y. et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* 2021;371(6529):eabf4063. DOI: 10.1126/science.abf4063.
2. Sheridan C. COVID-19 testing turns to T cells. *Nat Biotechnol* 2021;39(5): 533–4. DOI: 10.1038/s41587-021-00920-9.
3. Le Bert N., Tan A.T., Kunasegaran K. et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* 2020;584(7821):457–62. DOI: 10.1038/s41586-020-2550-z.
4. Painter M.M., Mathew D., Goel R.R. et al. Rapid induction of antigen-specific CD4⁺ T cells is associated with coordinated humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *Immunity* 2021;54(9):2133–42. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.08.001.
5. Yeoh C.B., Lee K.J., Rieth E.F. et al. COVID-19 in the Cancer Patient. *Anesth Analg* 2020;131(1):16–23. DOI: 10.1213/ANE.0000000000004884.
6. Massarweh A., Eliakim-Raz N., Stemmer A. et al. Evaluation of seropositivity following BNT162b2 messenger RNA vaccination for SARS-CoV-2 in patients undergoing treatment for cancer. *JAMA Oncol* 2021;7(8): 1133–40. DOI: 10.1001/jamaoncol.2021.2155.
7. Yazaki S., Yoshida T., Kojima Y. et al. Difference in SARS-CoV-2 antibody status between patients with cancer and health care workers during the COVID-19 pandemic in Japan. *JAMA Oncol* 2021;7(8):1141–8. DOI: 10.1001/jamaoncol.2021.2159.
8. Monin L., Laing A.G., Muñoz-Ruiz M. et al. Safety and immunogenicity of one versus two doses of the COVID-19 vaccine BNT162b2 for patients with cancer: interim analysis of a prospective observational study. *Lancet Oncol* 2021;22(6):765–78. DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00213-8.
9. Sun L., Warner J.L., Parikh R.B. Immune Responses to SARS-CoV-2 Among Patients With Cancer: What Can Seropositivity Tell Us? *JAMA Oncol* 2021;7(8):1123–5. DOI: 10.1001/jamaoncol.2021.2096.
10. Jaffe N., Gorlick R. High-Dose Methotrexate in Osteosarcoma: Let the Questions Surcease – Time for Final Acceptance. *Journal of Clinical Oncology* 2008;26(27):4365–6. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.7793.
11. Breithaupt H., Küenzlen E. High-dose methotrexate for osteosarcoma: toxicity and clinical results. *Oncology* 1983;40(2):85–9. DOI: 10.1159/000225700.
12. Wippel B., Gundle K.R., Dang T. et al. Safety and efficacy of high-dose methotrexate for osteosarcoma in adolescents compared with young adults. *Cancer Med* 2019;8(1):111–6. DOI: 10.1002/cam4.1898.
13. Стрижевская А.М., Погодина Е.А., Лебедева А.В. и др. Гепатотоксичность при терапии метотрексатом детей с остеосаркомой. *Детская онкология* 2012;2:87–90. [Strizhevskaya A.M., Pogodina E.A., Lebedeva A.V. et al. Hepatotoxicity during methotrexate therapy in children with osteosarcoma. *Detskaya onkologiya = Pediatric Oncology* 2012;2:87–90. (In Russ.)].
14. Стрижевская А.М., Погодина Е.А., Лебедева А.В. и др. Задержка выведения метотрексата у ребенка с остеосаркомой. *Детская онкология* 2011;2:39–41. [Strizhevskaya A.M., Pogodina E.A., Lebedeva A.V. et al. Delayed elimination of methotrexate in a child with osteosarcoma. *Detskaya onkologiya = Pediatric Oncology* 2011;2:39–41. (In Russ.)].
15. Genestier L., Paillot R., Fournel S. et al. Immunosuppressive properties

- of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. *J Clin Invest* 1998;102(2):322–8. DOI: 10.1172/JCI2676.
16. Williams H.J., Willkens R.F., Samuelson C.O. Jr. et al. Comparison of low-dose oral pulse methotrexate and placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. A controlled clinical trial. *Arthritis Rheum* 1985;28(7):721–30. DOI: 10.1002/art.1780280702.
 17. Jones L., Roy P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *The Lancet* 2021;397(10275):642–3. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00191-4.
 18. Logunov D., Dolzhikova I., Shchelyakov D. et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet* 2021;397(10275):671–81. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00234-8.
 19. Mahil S., Bechman K., Raharja A. et al. The effect of methotrexate and targeted immunosuppression on humoral and cellular immune responses to the COVID-19 vaccine BNT162b2: a cohort study. *The Lancet* 2021;3(9):E627–37. DOI: 10.1016/S2665-9913(21)00212-5.
 20. Connolly C.M., Paik J.J. Impact of methotrexate on first-dose COVID-19 mRNA vaccination. *Lancet Rheumatol* 2021;3(9):E607–9. DOI: 10.1016/S2665-9913(21)00217-4.
 21. Riches J.C. Impact of COVID-19 in patients with lymphoid malignancies. *World J Virol* 2021;10(3):97–110. DOI: 10.5501/wjv.v10.i3.97.
 22. Kiselevskiy M., Shubina I., Chikileva I. et al. Immune Pathogenesis of COVID-19 Intoxication: Storm or Silence? *Pharmaceuticals (Basel)* 2020;13(8):166. DOI: 10.3390/ph13080166.
 23. Qin C., Zhou L., Hu Z. et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* 2020;71(15):762–8. DOI: 10.1093/cid/ciaa248.
 24. Roeker L.E., Knorr D.A., Pessin M.S. et al. Anti-SARS-CoV-2 antibody response in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2020;34(11):3047–9. DOI: 10.1038/s41375-020-01030-2.
 25. Woźniak K., Sachs W., Boguradzki P. et al. Chemotherapy During Active SARS-CoV2 Infection: A Case Report and Review of the Literature. *Front Oncol* 2021;11:662211. DOI: 10.3389/fonc.2021.662211.
 26. Baker D., Roberts C.A.K., Pryce G. et al. COVID-19 vaccine-readiness for anti-CD20-depleting therapy in autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 2020;202(2):149–61. DOI: 10.1111/cei.13495.
 27. Grabbe S., Beissert S., Enk A. Systemic immunosuppression in times of COVID-19: Do we need to rethink our standards? *J Dtsch Dermatol Ges* 2020;18(8):810–13. DOI: 10.1111/ddg.14194.
 28. Ambrosioni J., Blanco J.L., Reyes-Urueña J.M. et al. Overview of SARS-CoV-2 infection in adults living with HIV. *Lancet HIV* 2021;8(5):e294–e305. DOI: 10.1016/S2352-3018(21)00070-9.
 29. Prabhu S., Poongulali S., Kumarasamy N. Impact of COVID-19 on people living with HIV: A review. *J Virus Erad* 2020;6(4):100019. DOI: 10.1016/j.jve.2020.100019.
 30. Sigel K., Swartz T., Golden E. et al. Coronavirus 2019 and People Living With Human Immunodeficiency Virus: Outcomes for Hospitalized Patients in New York City. *Clin Infect Dis* 2020;71(11):2933–8. DOI: 10.1093/cid/ciaa880.

Вклад авторов

Е.А. Погодина: сбор и анализ данных литературы, написание текста статьи;
А.В. Лобов, П.И. Иванова, В.И. Казей: анализ источников литературы;
И.Ж. Шубина: разработка дизайна обзора, участие в написании текста статьи.

Authors' contributions

E.A. Pogodina: collection and analysis of literature data, writing the text of the article;
A.V. Lobov, P.I. Ivanova, V.I. Kazey: analysis of literary sources;
I.Zh. Shubina: review design development, participation in writing the text of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Погодина / E.A. Pogodina: <https://orcid.org/0000-0002-0421-3287>
А.В. Лобов / A.V. Lobov: <https://orcid.org/0000-0002-4703-5863>
П.И. Иванова / P.I. Ivanova: <https://orcid.org/0000-0002-3481-2854>
В.И. Казей / V.I. Kazey: <https://orcid.org/0000-0003-2032-6289>
И.Ж. Шубина / I.Zh. Shubina: <https://orcid.org/0000-0002-9374-3158>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 01.10.2021. Принята к публикации: 22.10.2021.

Article submitted: 01.10.2021. Accepted for publication: 22.10.2021.

Онкогенные папилломавирусы: репродуктивные осложнения у инфицированных мужчин

Г.М. Волгарева

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

Контакты: Галина Михайловна Волгарева galina.volgareva@ronc.ru

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) типов высокого риска вызывают карциномы шейки матки, вульвы, влагалища, полового члена, ануса, а также некоторых областей головы и шеи – ротовой полости, ротоглотки, миндалин, гортани; самыми распространенными среди них являются ВПЧ 16-го и 18-го типов. Папилломавирусы низкого онкогенного риска, ВПЧ 6-го и 11-го типов, вызывают рецидивирующий респираторный папилломатоз и аногенитальные бородавки. Профилактическая вакцинация против ВПЧ в России не включена в национальный календарь обязательных прививок, но реализуется в ряде областей на уровне региональных программ. Значительная часть населения страны не охвачена этими программами. Привить своего ребенка-подростка каждая семья может на добровольной платной основе. Для принятия решения о вакцинации необходима полная информированность о последствиях ВПЧ-инфекции. В связи с тем что ВПЧ стали известны прежде всего как этиологические агенты рака шейки матки, сохраняется опасность «феминизации» представлений о неблагоприятных последствиях ВПЧ-инфекции, следствием чего являются дискуссии о целесообразности профилактической вакцинации мальчиков.

Цель настоящего обзора – рассмотрение эффектов ВПЧ на репродуктивный потенциал мужчин. Онкогенные ВПЧ часто выявляют в сперме здоровых доноров. ДНК ВПЧ в эксперименте проникает из сперматозоида в яйцеклетку. Сперма ВПЧ-положительных мужчин – это резервуар для сохранения вируса и источник его распространения в популяции. ДНК онкогенных ВПЧ обнаружена в эндосомах лимфоцитов из семенной жидкости, что противоречит каноническому представлению о строгой эпителиотропности ВПЧ и допускает возможность распространения ВПЧ с током крови по организму. Существует корреляция между ВПЧ-положительностью спермы и понижением фертильности мужчины. Неудачи супружеских пар при применении вспомогательных репродуктивных технологий, по мнению репродуктологов, могут быть обусловлены наличием ВПЧ в сперматозоидах партнера. Известна успешная попытка нормализации характеристик семенной жидкости у мужчин с пониженной фертильностью после введения им четырехвалентной вакцины Гардасил. Представляется целесообразным рассматривать данные о неблагоприятном воздействии ВПЧ-инфекции на репродуктивный потенциал мужчин как аргумент в пользу профилактических ВПЧ-прививок мальчиков. Это может не только предупреждению онкологических ВПЧ-ассоциированных заболеваний среди мужчин, но также уменьшению распространения данной инфекции в популяции в целом и более успешному решению демографических проблем.

Ключевые слова: генитальные папилломавирусы человека, мужчины, репродуктивные проблемы, профилактическая вакцинация

Для цитирования: Волгарева Г.М. Онкогенные папилломавирусы: репродуктивные осложнения у инфицированных мужчин. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(4):26–32. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-26-32.

Oncogenic papillomaviruses: reproductive problems in infected males

Galina M. Volgareva

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Contacts: Galina Mikhailovna Volgareva galina.volgareva@ronc.ru

Human papillomaviruses (HPV) of the high-risk types cause carcinomas in cervix uteri, vulva, vagina, penis, anus, as well as in certain sites of head and neck – oral cavity, oropharynx, tonsils, larynx. HPV of types 16 and 18 are the most

widespread ones. Papillomaviruses of low oncogenic risk, HPV of types 6 and 11, cause recurrent respiratory papillomatosis and anogenital warts. Preventive vaccinations against HPV are not included into the National mandatory immunization schedule in Russia; however, they are being executed in several country areas in a form of regional programs. Substantial contingents are not embraced by the procedures as yet. A family can make decision of its own whether to vaccinate the adolescent child on paid basis. To make decision in favor of vaccination complete awareness is needful on the HPV infection consequences. As far as viruses of the given group became primarily known as cervical cancer etiological agents certain risk persists of "feminization" of notions about unfavorable effects of the HPV infection thus resulting in debates on usefulness of boys' preventive vaccination.

In this connection the purpose of the review was consideration of HPV effects on male reproductive potential.

Oncogenic HPVs are frequently found in healthy donors' sperm. HPV DNA can penetrate from sperm into oocyte under experimental conditions. Seminal fluid of HPV-positive males is a storage tank of the virus as well as the source of its distribution throughout population. DNA of oncogenic HPV was detected in endosomes of seminal lymphocytes. The latter fact opposes the canonic notion of strict HPV epitheliotropy. Correlation exists between the seminal fluid HPV-positivity of a certain man and his fertility drop. Reproductologists believe failures of some married couples when using assisted reproductive technologies may result from partner's seminal HPV positivity. The successful attempt is known of semen parameters' normalization in men with reduced fertility after inoculation with the quadrivalent Gardasil vaccine.

It seems reasonable to consider the data on unfavorable effects of HPV infection on male reproductive potential as an argument for boys' preventive HPV vaccination. It would help not only to prevent the HPV-associated oncological diseases in men but the distribution of the given infection around the population as a whole; it would contribute to more successes in solving demographic problems.

Key words: genital human papillomaviruses, men, reproductive complications, preventive vaccination

For citation: Volgareva M.G. Oncogenic papillomaviruses: reproductive problems in infected males. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(4):26–32. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-26-32.

Введение

Определенные папилломавирусы, так называемые папилломавирусы типов высокого онкогенного риска, являются этиологическими агентами карцином, поражающих эпителий слизистых оболочек аногенитальной сферы человека — шейки матки, вульвы, влагалища, полового члена, ануса, а также некоторых областей головы и шеи — ротовой полости, ротоглотки, миндалин, гортани; к наиболее распространенным относятся онкогенные вирусы папилломы человека (ВПЧ) 16-го и 18-го типов [1, 2]. ВПЧ 6-го и 11-го типов, именуемые папилломавирусами низкого онкогенного риска, являются причиной возникновения доброкачественных новообразований — рецидивирующего респираторного папилломатоза и аногенитальных бородавок [1]. Помимо этого, онкогенные ВПЧ обнаруживают в ряде других, в том числе и широко распространенных злокачественных новообразований человека, таких как рак пищевода, легких, толстого кишечника, яичников, молочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, а также в карциномах носовых и синоназальных полостей; роль ВПЧ в онкогенезе в перечисленных органах в последние годы интенсивно исследуется [3].

К настоящему времени для предупреждения распространенного онкологического заболевания женщин — рака шейки матки (РШМ) — созданы 3 вакцины, способные, предположительно, предупредить от 70 до 90 % случаев РШМ; судя по первым результатам, эти вакцины успешно используются

для профилактики аногенитальных бородавок и предраковых изменений в эпителии шейки матки; они рекомендованы для прививок не только девочек, но и мальчиков [3–6]. Две из этих вакцин рекомендованы к применению в России. В национальный календарь прививок профилактические ВПЧ-вакцинации в нашей стране пока не включены, однако они проводятся в ряде областей страны на уровне региональных программ. Значительная часть населения страны не охвачена этими программами. Вакцинировать своего ребенка каждая семья может на добровольной платной основе. Решение делать или не делать подростку профилактическую прививку против ВПЧ зависит от результата обдумывания этого вопроса самим подростком и его родителями при возможной консультативной помощи врача. Каким окажется это решение, определяется (помимо бюджетных возможностей семьи) осведомленностью принимающих его лиц о пагубных последствиях инфицирования ВПЧ. В связи с тем что онкогенные ВПЧ получили широкую известность прежде всего как агенты, индуцирующие рак шейки матки, не вполне преодолена тенденция к «феминизации» проблемы неблагоприятных последствий ВПЧ-инфекции для здоровья человека. Следствием этого являются дискуссии о целесообразности профилактической прививки мальчиков против ВПЧ.

Онкогенные ВПЧ, как отмечено выше, часто обнаруживаются в аногенитальном эпителии человека. Резонно предположить, что ВПЧ-инфекция может

непосредственно влиять на репродуктивный потенциал *Homo sapiens*. Представляется уместным считать влияние ВПЧ-инфекции на пролиферацию эпителиальных клеток, приводящее к появлению опухоли, с одной стороны, и возможные сбои в функционировании репродуктивных органов, связанные с присутствием в них ВПЧ, с другой, двумя сторонами одной медали; неоднократно отмечалась недостаточность внимания к этой «оборотной стороне» аногенитальной инфекции ВПЧ [7, 8]. Не вызывает сомнений, что учет этой «оборотной стороны» важен среди прочего при принятии решения о профилактической ВПЧ-вакцинации. В последние годы появились сообщения о том, что папилломавирусная инфекция может вызывать сбои в функционировании репродуктивных органов как у женщин, так и у мужчин [9].

Цель настоящего обзора — рассмотрение влияния ВПЧ на репродуктивную функцию мужского организма.

Некоторые особенности естественной циркуляции ВПЧ у мужчин

Папилломавирусная инфекция — одна из наиболее распространенных инфекций, передаваемых половым путем. ВПЧ типов высокого онкогенного риска, как было отмечено выше, являются причиной возникновения рака в некоторых органах у мужчин.

Естественная циркуляция ВПЧ в мужском организме имеет ряд отличий от циркуляции этих вирусов у женщин. Так, генитальная ВПЧ-инфекция выявляется у мужчин достоверно чаще, чем у женщин; возраст, который у женщин отрицательно коррелирует с ВПЧ-инфекцией, практически не влияет на частоту ВПЧ-инфицированности мужчин; иммунный ответ на повторное заражение ВПЧ у мужчин выражен слабее, чем у женщин; как следствие, темп заражения генитальными ВПЧ *de novo* у мужчин достоверно выше и не уменьшается, в отличие от женщин, с возрастом; помимо перечисленного, осведомленность мужчин о неблагоприятных последствиях данной инфекции для их здоровья достоверно хуже, чем информированность женщин о влиянии ВПЧ на женское здоровье [10].

В настоящее время отсутствуют морфологические критерии для выявления под микроскопом бессимптомной генитальной ВПЧ-инфекции в мужском организме, подобные тем гистологическим и цитологическим критериям, которые разработаны и успешно используются в ранней диагностике РШМ у женщин.

В дополнение к упомянутым выше (раздел «Введение») ВПЧ-ассоциированным формам онкологических заболеваний мужчин этиологическая связь с этими вирусами по мере дальнейших исследований,

возможно, будет установлена также и для некоторых других форм рака. Заслуживают внимания исследования, выполненные у больных раком яичка, — сравнительно редкой формой онкологического заболевания, частота которого, однако, заметно возросла среди молодых мужчин в ряде стран Европы и Северной Америки [11, 12]. Было установлено значимое превышение ВПЧ-инфицированности спермы среди 155 больных перед хирургическим лечением (9,5 % ВПЧ-положительных случаев) по сравнению с контрольной группой здоровых мужчин с подтвержденной фертильностью (84 обследованных, из них 2,4 % ВПЧ-положительных). Параллельно была проведена оценка параметров спермы (количества клеток, их морфологии и подвижности) у здоровых мужчин и мужчин с раком яичка. У онкологических больных эти характеристики фиксировали на момент постановки диагноза, а также спустя год после оперативного лечения, в течение которого за частью пациентов вели наблюдение, другой части пациентов проводили рентгеновское облучение, третьей — химиотерапию. Во всех случаях параметры сперматозоидов у здоровых доноров значимо превосходили аналогичные показатели половых клеток больных. В течение года после операции параметры спермы улучшились только у больных из первой группы (наблюдения), тогда как после облучения и химиотерапии эти характеристики продолжали ухудшаться, а ВПЧ-инфицированность спермы возросла после облучения и химиотерапии до 30,8 и 61,5 % соответственно. Объясняя полученные результаты иммуносупрессией, вызванной адъювантной терапией, и учитывая тот факт, что ВПЧ являются факторами риска возникновения рака в других органах, авторы предлагают проводить всем больным тестикулярным раком скрининг на ВПЧ при постановке диагноза, и особенно после адъювантной терапии.

Однако ассоциация рака яичка с ВПЧ, согласно метаанализу данных литературы, проведенному в той же лаборатории, остается предметом дискуссий и требует дальнейшего изучения [12].

Инфицированность семенной жидкости вирусами папилломы человека и характеристики спермы

Внимание к присутствию ВПЧ в сперматозоидах здоровых мужчин одними из первых привлекли M.D. Kaspersen и соавт. [13]. Эти авторы провели детекцию 35 типов ВПЧ у 188 доноров спермы в Дании. У каждого 7-го донора сперматозоиды оказались ВПЧ-положительными, причем у 66,7 % из них были выявлены ВПЧ типов высокого онкогенного риска, а у 5 % — 2 и более типа ВПЧ. Таким образом, было сформулировано предположение, что источником протекающей бессимптомно ВПЧ-инфекции у лиц

обоого пола могут служить половые клетки здоровых мужчин. Сопоставимы с этими результатами данные, полученные E. Lopez-Diez и соавт.: сформировав группу повышенного риска из числа сексуальных партнеров тех женщин, у которых были диагностированы тяжелые дисплазии шейки матки, эти исследователи обнаружили у 45 % из них ВПЧ типов высокого риска на гениталиях, в том числе в содержимом мочеиспускательного канала, а у 10 % — генитальные бородавки [14].

Об изменениях морфологии сперматозоидов, уменьшении их подвижности и снижении фертильности ВПЧ-инфицированной спермы недавно сообщили E. Damke и соавт. [15] и M. Moghimi и соавт. [16]. Результаты метаанализов данных литературы, включивших более ранние публикации, подтверждают факты нередкой инфицированности сперматозоидов ВПЧ, в том числе ВПЧ типов высокого онкогенного риска, и существование корреляции между этой инфекцией и снижением фертильности спермы [17, 18]. ВПЧ-инфицированность спермы мужчин, которые по неизвестным причинам имели сниженную фертильность, оказалась достоверно выше, чем аналогичный показатель для популяции в целом, что дало основание рекомендовать тестирование на ВПЧ мужчин, которые собираются использовать вспомогательные репродуктивные технологии или стать донорами спермы [19, 20]. Однако необходимо упомянуть и о единственной известной нам публикации, авторы которой опровергают как существование корреляции между ВПЧ-инфицированностью спермы и нарушениями морфологии сперматозоидов, так и корреляции между наличием у мужчин ВПЧ в сперме, с одной стороны, и нарушениями их фертильности, с другой [21]. В связи с этим представляется целесообразным продолжать исследования данного вопроса.

Механизмы влияния ВПЧ на фертильность мужчин

Данные о том, как именно ВПЧ могут оказывать влияние на морфологию и подвижность сперматозоидов, а также снижать фертильность спермы, пока достаточно фрагментарны. Показано, что ДНК ВПЧ способна проникать в сперматозоид, где она локализуется в экваториальной области головки, а также в хвосте [13, 22]. Сперматозоиды человека, трансфицированные онкогенами E6/E7 ВПЧ 16-го типа, в экспериментальных условиях в составе рекомбинантной плазмиды проникали в яйцеклетку хомячка; была зарегистрирована транскрипция трансфицированных онкогенов вируса [22]. Имеются упоминания о повреждениях ДНК сперматозоидов в случае их инфицирования папилломавирусами [22–24]. В семенной жидкости мужчин с нарушениями фертильности,

инфицированных ВПЧ, иногда обнаруживаются антитела к сперматозоидам, присутствие которых коррелирует со снижением подвижности этих клеток [25].

Специального внимания заслуживают результаты C. Foresta и соавт., показавших методом флуоресцентной гибридизации *in situ* присутствие ДНК ВПЧ 16-го типа, а также капсидного белка L1 и онкобелка E6 вируса (методом иммунофлуоресценции) в CD45⁺- и CD20⁺-лейкоцитах спермы и периферической крови мужчин, характеризующихся пониженной фертильностью, в сперме которых был обнаружен ВПЧ 16-го типа [26]. В контрольной группе ВПЧ-отрицательных мужчин, которые также характеризовались сниженной фертильностью, эти маркеры обнаружены не были. Таким образом, вопреки общепринятому «устоявшемуся» представлению о том, что ВПЧ-инфекция обладает строгим тропизмом к эпителиальным клеткам, эти результаты, свидетельствующие о возможности попадания онкогенного ВПЧ в эндосомы В-лейкоцитов и натуральных киллеров, дают основание ожидать, что папилломавирус, единожды проникнув в организм, способен распространяться с током крови и вызывать рак в отдаленных органах. В связи с этим уместно допустить, еще раз обратившись к использованной выше метафоре, что обратная сторона медали может влиять на ее лицевую сторону: не исключено, что ВПЧ-инфекция семенной жидкости может сначала вызвать снижение фертильности, а через какое-то время — и последствия в виде ВПЧ-ассоциированного онкологического заболевания. Вопрос о существовании такой связи пока остается открытым и нуждается в дальнейших исследованиях.

Затруднения, возникающие у супружеских пар при использовании вспомогательных репродуктивных технологий, и ВПЧ-положительность спермы партнера

Все более широкое применение получают различные вспомогательные репродуктивные технологии. В связи с этим встал вопрос о том, как влияет на результат использования этих технологий ВПЧ-инфицированность спермы партнера. Оказалось, что частота обнаружения ВПЧ в семенной жидкости мужчин с пониженной фертильностью неясной природы, прибегающих к помощи таких технологий, достоверно превышает соответствующий показатель для фертильных мужчин, — так, по данным G.S. Caglar и N. Garrido, в первой группе мужчин она может достигать 38 %; при этом вирус невозможно удалить простым отмыванием ВПЧ-положительной спермы [27]. Последовательность событий в организме женщины, оплодотворенной ВПЧ-положительными сперматозоидами, заслуживает отдельного детального

рассмотрения — здесь ограничимся упоминанием основанной на многочисленных фактах точки зрения специалистов-репродуктологов, согласно которой ДНК ВПЧ из сперматозоида может попадать в яйцеклетку, далее — в бластоцисту, в трофобласт, где вызывает апоптоз клеток, что, в свою очередь, ведет к дальнейшим нарушениям ранних стадий развития эмбриона [27, 28].

Влияние ВПЧ-инфицированности семенной жидкости на результат применения вспомогательной репродуктивной технологии иллюстрируют данные S. Tangal и соавт. [29]. Используя технологию ИКСИ (от англ. ICSI — intra-cytoplasmic sperm injection — введение сперматозоида в цитоплазму яйцеклетки, выполняемое под микроскопом, как этап экстракорпорального оплодотворения) в супружеских парах, в которых ранее имели место 2 или более случая неудач при применении данной технологии, авторы обнаружили, что ВПЧ-положительной в данной выборке семенная жидкость оказалась у 8 % партнеров. У 83 % этих мужчин частота сперматозоидов с фрагментированной ДНК была достоверно выше (до 30 % сперматозоидов), чем у ВПЧ-отрицательных мужчин. В случаях, когда семенная жидкость была взята от ВПЧ-инфицированного партнера, удавалось получить достоверно меньше полноценных эмбрионов, чем при использовании ВПЧ-отрицательной спермы; частота ранних выкидышей оказалась более высокой, если использовалась ВПЧ-положительная сперма, — 33 % по сравнению с 10 %.

Продолжение подобных исследований весьма актуально для прояснения вопроса о том, как ВПЧ-инфицированность семенной жидкости может влиять на результаты современных репродуктивных технологий.

Может ли профилактическая вакцинация против ВПЧ нормализовать характеристики спермы ВПЧ-положительного мужчины?

Среди здоровых мужчин частота обнаружения генитальных ВПЧ варьирует в очень широких пределах — от 13 до 88 % [30]. Семенная жидкость таких мужчин представляет собою резервуар для сохранения и распространения ВПЧ в популяции, она также может служить материалом для неинвазивной диагностики данной инфекции. Как было отмечено выше, выявлена корреляция между снижением фертильности мужчин, которое не имеет очевидных объяснений, с одной стороны, и присутствием ВПЧ в их семенной жидкости, с другой.

Успешную попытку удаления ВПЧ из семени мужчин с подтвержденной пониженной фертильностью предприняли С. Foresta и соавт. с помощью четырехвалентной вакцины Гардасил: в группе, состоявшей из 42 мужчин в возрасте старше 30 лет,

в семенной жидкости которых присутствовали вирусы тех типов, против которых эффективна данная вакцина, клиренса удалось достигнуть через 12 мес после начала ее введения [31]. Продолжив исследование, авторы зафиксировали достоверную нормализацию таких показателей, как подвижность сперматозоидов и наличие в семенной жидкости антител к ним, у вакцинированных мужчин по сравнению с невакцинированными (обе группы — ВПЧ-положительные на момент начала исследования). Супружеские пары, ранее обратившиеся в клинику по поводу репродуктивных затруднений, в которых мужчины получили вакцину Гардасил, в дальнейшем по числу зачатий, самопроизвольных аборт и нормальных доношенных беременностей оказались благополучнее пар, в которых ВПЧ-положительный супруг вакцинирован не был [32].

Заключение

Неблагоприятные воздействия генитальной ВПЧ-инфекции на репродуктивную функцию *Homo sapiens* привлекли внимание исследователей значительно позже, чем были установлены онкогенные эффекты некоторых представителей данной группы вирусов. Вакцинация против онкогенных ВПЧ в России не включена в национальный календарь прививок. Она проводится в ряде областей в рамках региональных программ, которыми, однако, большая часть населения страны не охвачена. Вакцинировать ребенка-подростка семья может на добровольной платной основе. Для принятия решения о профилактической прививке против ВПЧ необходима полная информация о неблагоприятных последствиях данной инфекции для здоровья. В обзоре рассмотрено влияние ВПЧ на репродуктивную функцию мужчины.

Накапливаются данные, указывающие на возможную ассоциацию ВПЧ-инфекции с некоторыми «мужскими» формами злокачественных новообразований — раком предстательной железы, яичка.

Генитальная ВПЧ-инфекция длительное время протекает бессимптомно; имеется ряд отличий в циркуляции ВПЧ у мужчин по сравнению с таковой у женщин: иммунный ответ на повторное заражение ВПЧ у мужчин выражен слабее, чем у женщин; темп заражения генитальными ВПЧ *de novo* у мужчин достоверно выше и не снижается, в отличие от женщин, с возрастом.

Онкогенные ВПЧ часто обнаруживаются в сперме здоровых доноров. ДНК ВПЧ в экспериментальных условиях способна проникать из сперматозоида в яйцеклетку. Есть основания рассматривать семенную жидкость ВПЧ-положительных мужчин как резервуар для сохранения вируса и источник его распространения в популяции.

Существует корреляция между ВПЧ-инфицированностью семенной жидкости мужчины и снижением

фертильности. Неудачи супружеских пар, прибегающих к помощи вспомогательных репродуктивных технологий, могут быть отчасти обусловлены наличием ВПЧ в сперматозоидах партнера. Известна успешная попытка нормализации характеристик семенной жидкости у мужчин с пониженной фертильностью, возраст которых превышал 30 лет, после введения им четырехвалентной вакцины Гардасил.

Представляется целесообразным рассматривать приведенные факты как аргумент в пользу профилактических ВПЧ-вакцинаций мальчиков. Такая вакцинация поможет достигнуть не только снижения частоты онкологических ВПЧ-ассоциированных заболеваний в популяции, но также и благоприятных демографических изменений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. V. 90. Human Papillomaviruses. Lyon, 2007.
2. Zur Hausen H. Cancers in humans: a lifelong search for contributions of infectious agents, autobiographic notes. *Annu Rev Virol* 2019;6(1):1–28. DOI: 10.1146/annurev-virology-092818-015907.
3. zur Hausen H. Papillomaviruses – to vaccination and beyond. *Biochemistry (Mosc.)* 2008;73(5):498–503. DOI: 10.1134/S0006297908050027.
4. Ульрих Е.А., Урманчеева А.Ф., Гуркин Ю.А. и др. Первичная профилактика рака шейки матки. Эффективность, безопасность, экономическая приемлемость вакцинации. *Онкогинекология* 2018;28(4):61–71. [Ulrikh E.A., Urmancheeva A.F., Gurkin Yu.A. et al. Primary prevention of cervical cancer. Effectiveness, safety, economic feasibility of vaccination. *Oncoginekologiya = Oncological Gynecology* 2018;28(4):61–71. (In Russ.)].
5. Волгарева Г.М. Папилломавирусный канцерогенез. Основные достижения и некоторые проблемы. Часть 1. Общие представления о папилломавирусах. Формы рака, ассоциированные с вирусами папиллом человека. *Российский биотерапевтический журнал* 2020;19(1):6–12. [Volgareva G.M. Papillomaviral carcinogenesis. Major achievements and certain challenges. Part I. General notions of papillomaviruses. Human papillomaviruses-associated cancers. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(1):6–12. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-6-12.
6. Волгарева Г.М. Папилломавирусный канцерогенез. Основные достижения и некоторые проблемы. Часть 2. ВПЧ-ассоциированные формы рака в России. Профилактические ВПЧ-вакцины. *Российский биотерапевтический журнал* 2020;19(2):31–8. [Volgareva G.M. Papillomaviral carcinogenesis. Major achievements and certain challenges. Part 2. HPV-associated cancers in Russia. Preventive HPV vaccines. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(2):31–8. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-31-38.
7. Souho T., Benlem M., Bennani B. Human papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review. *PLoS One* 2015;10(5):e0126936. DOI: 10.1371/journal.pone.0126936.
8. Xiong Y.Q., Chen Y.X., Cheng M.J. et al. The risk of human papillomavirus infection for male fertility abnormality: a meta-analysis. *Asian J Androl* 2018;20(5):493–7. DOI: 10.4103/aja.aja_77_17.
9. Краснополянский В.И., Зароченцева Н.В., Краснополянская К.В. и др. Папилломавирусная инфекция и репродукция. *Вестник Российской академии медицинских наук* 2020;75(3):189–95. [Krasnopolsky V.I., Zarochentseva N.V., Krasnopolskaya K.V. et al. Papillomavirus infection and reproduction. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskih nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences* 2020;75(3):189–95. (In Russ.)]. DOI: 10.15690/vramn1332.
10. Волгарева Г.М. Естественная циркуляция вирусов папилломы человека у мужчин – что о ней известно? *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(1):28–33. [Volgareva G.M. Natural history of papillomaviruses in men – what is known? *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(1):28–33. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-28-33.
11. Garolla A., Pizzol D., Bertoldo A. et al. Testicular cancer and HPV semen infection. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;3:172. DOI: 10.3389/fendo.2012.00172.
12. Garolla A., Vitagliano A., Muscianisi F. et al. Role of viral infections in testicular cancer etiology: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10:355. DOI: 10.3389/fendo.2019.00355.
13. Kaspersen M.D., Larsen P.B., Ingerslev H.J. et al. Identification of multiple HPV types on spermatozoa from human sperm donors. *PLoS One* 2011;6(3):e18095. DOI: 10.1371/journal.pone.0018095.
14. Lopez-Diez E., Perez S., Carballo M. et al. Lifestyle factors and oncogenic papillomavirus infection in a high-risk male population. *PLoS One* 2017;12(9):e0184492. DOI: 10.1371/journal.pone.0184492.
15. Damke E., Kurscheidt F.A., Balani V.A. et al. Male partners of infertile couples with seminal infections of human papillomavirus have impaired fertility parameters. *Biomed Res Int* 2017;2017:4684629. DOI: 10.1155/2017/4684629.
16. Moghimi M., Zabihi-Mahmoodabadi S., Kheirkhah-Vakilabad A., Kargar Z. Significant correlation between high-risk HPV DNA in semen and impairment of sperm quality in infertile men. *Int J Fertil Steril* 2019;12(4):306–9. DOI: 10.22074/ijfs.2019.5421.
17. Lyu Z., Feng X., Li N. et al. Human papillomavirus in semen and the risk for male infertility: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2017;17(1):714. DOI: 10.1186/s12879-017-2812-z.
18. Xiong Y.Q., Chen Y.X., Cheng M.J. et al. The risk of human papillomavirus infection for male fertility abnormality: a meta-analysis. *Asian J Androl* 2018;20(5):493–7. DOI: 10.4103/aja.aja_77_17.
19. Foresta C., Noventa M., De Toni L., Garolla A. HPV-DNA sperm infection and infertility: from a systematic literature review to a possible clinical management proposal. *Andrology* 2015;3(2):163–73. DOI: 10.1111/andr.284.
20. Depuydt C.E., Donders G., Verstraete L. et al. Time has come to include Human Papillomavirus (HPV) testing in sperm donor banks. *Facts Views Vis Obgyn* 2018;10(4):201–5.
21. Golob B., Poljak M., Verdenik I. et al. High HPV infection prevalence in men from infertile couples and lack of relationship between seminal HPV infection and sperm quality. *Biomed Res Int* 2014;2014:956901. DOI: 10.1155/2014/956901.

22. Foresta C., Patassini C., Bertoldo A. et al. Mechanism of human papilloma-virus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. PLoS One 2011;6(3):e15036. DOI: 10.1371/journal.pone.0015036.
23. Connelly D.A., Chan P.J., Patton W.C., King A. Human sperm deoxyribonucleic acid fragmentation by specific types of papillomavirus. Am J Obst Gynecol 2001;184(6):1068–70. DOI: 10.1067/mob.2001.115226.
24. Pourmasumi S., Sabeti P., Rahiminia T. et al. The etiologies of DNA abnormalities in male infertility: An assessment and review. Int J Reprod Biomed (Yazd) 2017;15(6):331–44.
25. Garolla A., Pizzol D., Bertoldo A. et al. Association, prevalence, and clearance of human papillomavirus and antisperm antibodies in infected semen samples from infertile patients. Fertil Steril 2013; 99(1):125–31. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.09.006.
26. Foresta C., Bertoldo A., Garolla A. et al. Human papillomavirus proteins are found in peripheral blood and semen Cd20+ and Cd56+ cells during HPV-16 semen infection. BMC Infect Dis 2013;13:593. DOI: 10.1186/1471-2334-13-593.
27. Caglar G.S., Garrido N. The implications of male human papilloma virus infection in couples seeking assisted reproduction technologies. J Turk Ger Gynecol Assoc 2018;19(1):48–52. DOI: 10.4274/jtgga.2017.0031.
28. Pereira N., Kucharczyk K.M., Estes J.L. et al. Human papillomavirus infection, infertility, and assisted reproductive outcomes. J Pathog 2015;2015:578423. DOI: 10.1155/2015/578423.
29. Tangal S., Tasci Y., Pabuccu E.G. et al. DNA fragmentation index and human papilloma virus in males with previous assisted reproductive technology failures. Turk J Urol 2018;45(1):12–6. DOI: 10.5152/tud.2018.96393.
30. Giuliano A.R., Anic G., Nyitray A.G. Epidemiology and pathology of HPV disease in males. Gynecol Oncol 2010;117(2 Suppl):S15–9. DOI: 10.1016/j.ygyno.2010.01.026.
31. Foresta C., Garolla A., Parisi S. et al. HPV prophylactic vaccination in males improves the clearance of semen infection. EBioMedicine 2015;2(10):1487–93. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.09.005.
32. Garolla A., De Toni L., Bottacin A. et al. Human papillomavirus prophylactic vaccination improves reproductive outcome in infertile patients with HPV semen infection: a retrospective study. Sci Rep 2018;8(1):912. DOI: 10.1038/s41598-018-19369-z.

ORCID автора/ ORCID of author

Г.М. Волгарева / G.M. Volgareva: <http://orcid.org/0000-0002-6817-2103>

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 04.10.2021. Принята к публикации: 22.10.2021.

Article submitted: 04.10.2021. Accepted for publication: 22.10.2021.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-4-33-41>

Роль новой изоформы *ALK* в диагностике и таргетной терапии меланомы кожи

К.С. Титов^{1,2}, А.А. Маркин¹, А.М. Казаков³, С.В. Чулкова^{3,4}

¹ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 11123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 21, корп. 3;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

⁴ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия 117997 Москва, ул. Островитянова, 1а

Контакты: Александр Андреевич Маркин markinalexander1993@yandex.ru

Открытия фундаментальной науки последних десятилетий в области онкологии привели к появлению новых высокоэффективных противоопухолевых препаратов: таргетных и ингибиторов иммунных контрольных точек, применение которых вызвало прорыв в лечении онкологических заболеваний, особенно в терапии меланомы кожи. Меланома по-прежнему остается одной из самых злокачественных опухолей. Каждый год в мире увеличивается доля пациентов, резистентных к таргетной терапии и иммунотерапии. У онкологов остается крайне мало опций лечения меланомы после развития резистентности к лекарственной терапии. На данный момент одними из самых распространенных препаратов в лечении меланомы кожи являются BRAF-/MEK-ингибиторы, поскольку мутация *BRAF* в меланоме обнаруживается у 40–60 % пациентов. Однако через 6–8 мес может возникнуть резистентность к данной таргетной терапии у половины таких пациентов. В связи с этим ученые всего мира ищут новые молекулярные мишени для таргетных препаратов, одним из подходов может служить ингибирование новой изоформы киназы анапластической лимфомы (*ALK*).

Цель исследования – систематизировать данные ведущих исследований по изучению новой изоформы *ALK* и определить наиболее перспективные направления ее дальнейшего изучения.

В работе проанализированы 6 наиболее крупных исследований за последние 5 лет, посвященных новой изоформе *ALK*.

Совместное ингибирование новой изоформы *ALK* и *BRAFV600* показало положительные результаты в нескольких исследованиях с различными уровнями экспрессии *ALK*^{ATI} (альтернативная инициация транскрипции *ALK*). Новая изоформа *ALK* может стимулировать онкогенез только в пределах определенного «порогового» уровня экспрессии. Иммуногистохимическое исследование не может быть основным методом определения экспрессии новой изоформы *ALK* ввиду его низкой чувствительности. Практически во всех исследованиях установлено, что опухоли с транслокацией *ALK* отвечали на терапию ингибиторами *ALK*.

Несмотря на то что в последние годы активно изучается роль новой изоформы *ALK*, до сих пор не определен оптимальный метод оценки экспрессии *ALK*^{ATI} в рутинной практике. Для понимания эффективности применения ингибиторов *ALK* в комбинации с BRAF- и ERK-ингибиторами необходимы дополнительные исследования. Кроме того, представляют интерес блокада способствующих развитию резистентности к терапии внеклеточных везикул и изучение роли интерлейкина 3 в ингибировании *ALK*^{ATI}.

Ключевые слова: метастатическая меланома, таргетная терапия, ингибиторы BRAF, *ALK* (киназа анапластической лимфомы), *ALK*^{ATI} (альтернативная инициация транскрипции *ALK*), *BRAFV600*, лекарственная резистентность

Для цитирования: Титов К.С., Маркин А.А., Казаков А.М., Чулкова С.В. Роль новой изоформы *ALK* в диагностике и таргетной терапии меланомы кожи. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(4):33–41. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-33-41.

The role of a new *ALK* isoform in the diagnosis and targeted therapy of skin melanoma

Konstantin S. Titov^{1,2}, Alexander A. Markin¹, Alexey M. Kazakov³, Svetlana V. Chulkova^{3,4}

¹A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Healthcare Department; 86 Entuziastov Shosse, Moscow 11123, Russia;

²RUDN University; Bld. 3, 21 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

⁴N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1a Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

Contacts: Alexander Andreevich Markin markinalexander1993@yandex.ru

Contemporary discoveries of fundamental science in recent decades in the field of oncology have led to the emergence of new highly effective anticancer drugs: targeted drugs and immune checkpoint inhibitors, use of which has made a breakthrough in the treatment of oncological diseases, including skin melanoma. Melanoma is still one of the most cancerous tumors. The number of patients resistant to targeted therapy and immunotherapy increases in the world every year. Oncologists have practically no leverage to influence the disease after the development of resistance to this type of therapy. In this regard, scientists around the world are looking for new application points for targeted drugs. Nowadays, the most common treatment method is BRAF inhibitors, since the *BRAF* mutation is detected in 40–60 % of patients with skin melanoma. However, the resistance to BRAF inhibitor therapy occur in half cases after 6–8 months. To overcome the resistance to the target therapy is one the most important issue, the studying of new isoform of anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) may help to solve this problem.

Purpose of the study – to order the data of the leading researchers of a new isoform of *ALK*, and reveal the most promising directions for its further progress.

In the article, there are comparisons and analyses the 6 of the largest studies over the past 5 years devoted to a new isoform of *ALK*.

The joint inhibition of the new *ALK* isoform and *BRAFV600* showed positive results in several studies with different levels of *ALK^{ATI}* expression (alternative initiation of *ALK* transcription). The new *ALK* isoform can stimulate oncogenesis only within a certain “threshold” level of expression. Immunohistochemical examination cannot be the main method for determining the expression of a new *ALK* isoform due to low sensitivity. In almost all studies, tumors with *ALK* translocation responded to therapy with *ALK* inhibitors.

Even though that the role of the new *ALK* isoform has been studied in recent years, the optimal method for evaluating the expression of *ALK^{ATI}* in routine practice has not yet been determined. Additional studies are also needed to understand the effectiveness of the use of *ALK* inhibitors in combination with BRAF and ERK inhibitors. Of interest is the blockade of extracellular vesicles and the study of the role of interleukin-3 in the inhibition of *ALK^{ATI}*.

Key words: metastatic melanoma, targeted therapy, BRAF inhibitors, *ALK* (anaplastic lymphoma kinase), *ALK^{ATI}* (alternative initiation of *ALK* transcription), *BRAFV600*, drug resistance

For citation: Titov K.S., Markin A.A., Kazakov A.M., Chulkova S.V. The role of a new *ALK* isoform in the diagnosis and targeted therapy of skin melanoma. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(4):33–41. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-33-41.

Введение

По данным международных эпидемиологических исследований, отмечается стремительный рост заболеваемости меланомой кожи во всем мире – в среднем на 10 % в год [1]. В России за последние 10 лет заболеваемость меланомой кожи увеличилась на 28,72 % и по общему приросту среди всех злокачественных образований кожи занимала 2-е место [2].

Меланома относится к злокачественным опухолям наружных локализаций, но, несмотря на это, она занимает ведущие позиции в структуре смертности от онкологических заболеваний во многих странах мира [3]. Меланома часто отличается крайне агрессивным течением. Даже при современном уровне развития медицины, диагностических и лечебных технологий каждый 3-й случай меланомы заканчивается летальным исходом [4]. Это обусловлено выраженным инвазивным потенциалом опухолевых клеток меланомы и, как следствие, высоким риском прогрессирования, особенно у больных с ПС–ПНД стадиями, у которых, несмотря на использование совре-

менных режимов лекарственной терапии, диссеминация меланомы наблюдается в первые 2 года [5]. Одной из причин агрессивности течения меланомы, ее устойчивости к проводимой терапии является наличие популяции опухолевых стволовых клеток, которые имеют абберантные фенотипы с экспрессией маркеров резистентности и характеризуются нарушениями различных сигнальных путей [6–8]. Известно, что клетки меланомы, экспрессирующие CD271, обуславливают резистентность к терапии BRAF-ингибиторами [9]. Необходимо отметить, что изучению сигнальных путей, экспрессии различных генов, молекулярных детерминант опухолевых клеток, участвующих в поддержании выживаемости клеток меланомы и способствующих прогрессии этой опухоли, посвящено немало исследований, которые не только раскрывают уникальное фенотипическое разнообразие меланомы, но и подчеркивают важность разнообразных лечебных подходов [10–12].

Особенно сложной задачей является лечение метастатической меланомы, которая требует комплексного

лечебного подхода, один из компонентов которого — хирургический метод [13]. К сожалению, метастатическая меланома прогностически крайне неблагоприятна, поскольку даже использование новейших таргетных и иммуноотропных препаратов не позволяет достичь стойкой ремиссии. Развивающаяся резистентность меланомы к проводимой терапии лишает возможности продолжить лечение такой категории больных. Таким образом, на сегодняшний день существует острая необходимость разработки возможных диагностических и прогностических маркеров, которые в будущем могли бы стать потенциальной мишенью лекарственной терапии. Одним из перспективных маркеров является *ALK* (Anaplastic lymphoma kinase) — мутация, исследованная при других опухолях (немелкоклеточном раке легкого, анапластической карциноме щитовидной железы, раке яичников, раке молочной железы и др.) и выявляемая при первичной меланоме кожи в 2–8 % случаев [14]. Существуют 3 изоформы мутантной *ALK* — *ALK^{ΔT1}*, *ALK^{wt}*, *EML4-ALK*, различающиеся по механизму образования [15, 16]. Мутантная *ALK* содержит преимущественно интрацеллюлярный домен и обладает повышенной способностью к аутоактивации, что вызывает неконтролируемое деление клеток [17]. Интересно, что мутация *ALK* может встречаться как отдельно, так и в комбинации с мутацией *BRAF*. Известно, что у половины больных, получающих таргетную терапию ингибиторами *BRAF*, через 6–8 мес развивается резистентность [18]. Предполагается, что *ALK^{ΔT1}* является одним из механизмов резистентности к *BRAF*-ингибиторам [19]. Это открывает новые перспективы в преодолении данного вида лекарственной устойчивости.

Цель исследования — систематизировать данные ведущих исследований по изучению новой изоформы *ALK* и определить наиболее перспективные направления ее дальнейшего изучения.

В работе проведен анализ 6 наиболее крупных исследований за последние 5 лет, посвященных новой изоформе *ALK*: T. Wiesner и соавт. (2015) [20], K.J. Busam и соавт. (2016) [21], K.L. Coutts и соавт. (2017) [22], G. Cesi и соавт. (2018) [19], H.T. Niu и соавт. (2020) [23], K.K. Shah и соавт. (2020) [24].

Строение *ALK*

В конце 80-х годов прошлого столетия была описана повторяющаяся транслокация t(2;5)(p23;q35) в части CD30-позитивных анапластических крупноклеточных лимфом. В 1994 г. был обнаружен рекомбинантный белок слияния трансмембранного рецептора тирозинкиназы анапластической лимфомы (*ALK*) и нуклеофозмина (*NPM*), кодируемый соответствующим геном и названный киназой анапластической лимфомы. В дальнейших исследованиях

обнаружено более десятка генов слияния транслокаций *ALK* [25].

Рецептор *ALK* участвует в миграции, пролиферации и выживании клеток через активацию путей Ras/Raf/MEK/ERK1/2, JAK/STAT, PI3K/Akt и PLC-γ15-8. Белок *ALK* состоит из 1620 аминокислот, включает в себя внеклеточный домен для связи с 2 лигандами *ALK* (мидкин и плеiotропин), одноцепочечный трансмембранный рецептор и внутриклеточный домен [26, 27]. Белок *ALK* должен быть неактивен у взрослых, так как физиологически экспрессируется только во время эмбриогенеза в нервной системе [26, 28, 29]. С помощью секвенирования последнего поколения обнаружено более 20 различных слияний генов. Наиболее часто встречается слияние *NPM1-ALK*, на долю которого приходится до 80 % от всех *ALK*-транслокаций. Перестройки гена *ALK* с участием *EML4* гораздо чаще встречаются при немелкоклеточном раке легких, чем при других опухолях. Транслокации *EML4-ALK* (echinoderm microtubule-associated protein like 4) имеют более 10 различных вариантов, но в большинстве случаев сосредоточены на интроне 19 [30].

Редкие перестройки в генах *ALK* встречаются и в других новообразованиях, например при колоректальном раке, раке молочной железы, почечно-клеточном раке, раке пищевода, яичников, анапластической карциноме щитовидной железы, диффузной В-клеточной лимфоме и злокачественных новообразованиях кожи [31]. Во всех вариантах транслокации *ALK*, в то время как С-терминальный домен киназы *ALK* не изменен, на N-терминальном конце находятся активированные промоторы различных генов, усиливающие экспрессию белков слияния. Таким образом, уровень экспрессии *ALK* зависит от генов слияния. Это также может объяснить разную чувствительность различных белков слияния *ALK* к ингибиторам тирозинкиназы [32].

Химерные белки *ALK* активируют множество путей, в том числе PI3K/AKT и MEK/ERK, влияющих на клеточную пролиферацию и апоптоз. Однако, помимо транслокаций, ген *ALK* может участвовать в других генетических изменениях. Амплификации гена *ALK* со сверхэкспрессией белка *ALK* были обнаружены в различных опухолях, включая меланому, мелкоклеточный рак легких, нейробластому, глиобластому, рабдомиосаркому, рак яичников, молочной железы, астроцитому, саркому Юинга и ретинобластому. Сверхэкспрессия белка *ALK* встречается редко, поэтому чрезмерная экспрессия *ALK* может быть вызвана как известными, так и неизвестными генетическими механизмами [33].

Новая изоформа

В 2015 г. в журнале Nature были опубликованы результаты исследования T. Wiesner и соавт., в котором

определили в 11 % тканей меланомы изменение в инициации транскрипции, расположенное в интроне 19, что приводит к экспрессии новой усеченной изоформы *ALK* – *ALK^{ATI}* (alternative transcription initiation, ATI), которая включает в себя длинный конечный повтор (LTR) в интроне 19 и длинную цепь в интроне 18 [20]. Было изучено более 5000 образцов из 15 различных типов опухолей для определения участков альтернативной инициации транскрипции (ATI). *ALK^{ATI}* была обнаружена в 1600 образцах методом секвенирования РНК. Мутации F1174L (*ALK^{F1174}*) и EML4–*ALK* были обнаружены, главным образом, в цитоплазме или на клеточной мембране. Иммуногистохимически подтверждена ядерная и цитоплазматическая локализация *ALK^{ATI}*. Была обнаружена онкогенная способность дикого типа, которая согласуется с предыдущими сообщениями о том, что высокая эндогенная экспрессия или геномная амплификация *ALK* стимулирует онкогенез. Однако установлено, что повышение уровня экспрессии *ALK^{ATI}* не ускоряет формирование и рост опухолевого трансплантата, что указывает на то, что *ALK^{ATI}* может стимулировать онкогенез только в пределах порога экспрессии. Также продемонстрирован ответ пациентов с мутацией *ALK^{ATI}* на терапию стандартными ингибиторами *ALK* [20].

Встречаемость *ALK* и методы исследования

Первое время считалось, что мутация *ALK^{ATI}* встречается только в меланоме Шпица [20]. В 2016 г. K.J. Busam и соавт. [21] попытались определить, может ли *ALK* экспрессироваться в других меланоме, и изучили экспрессию *ALK^{ATI}* в метастатической меланоме кожи. Однако в своем исследовании они использовали иммуногистохимический (ИГХ) метод на 1-м этапе, из-за чего *ALK^{ATI}*-экспрессия была обнаружена лишь в 7 (2,3 %) первичных и 9 (3 %) метастатических опухолях; 5 из 7 опухолей были узловыми меланомами [21]. Такой низкий процент заставил задуматься о целесообразности выявления данной мутации.

В 2017 г. K.L. Couts и соавт. исследовали 45 меланом методом полимеразной цепной реакции и обнаружили, что 24,4 % меланом экспрессировали *ALK*; в 7 из 45 меланом выявлена *ALK^{ATI}*, причем гистологически это были абсолютно разные опухоли (3 узловые, 2 слизистые, 1 поверхностная и 1 акральная) [22]. Такие результаты обнадеживают, несмотря на малую выборку пациентов, так как секвенирование — слишком дорогостоящий метод для использования в рутинной практике, а ИГХ-метод имеет низкую чувствительность (55 %), по данным некоторых исследований [24].

Стоит отметить, что, по данным сравнительного изучения мутаций *ALK* ИГХ-методом с несколькими клономми моноклональных антител и методом *ALK*-

FISH, лучшие результаты показал ИГХ-метод с использованием моноклонального антитела клона D5F3A (Cell signaling) [34]. Однако в данном исследовании оценивали опухоли легкого и изучалась только транслокация *ALK*. При изучении экспрессии *ALK* у больных меланомой A. Uguen и соавт. [35] не выявили ни одной мутации в серии из 133 больных с метастазами, используя ИГХ-метод с моноклональным антителом клона 5A4 (Novocastra).

В исследовании I. Yeh и соавт. обнаружена лишь 1 мутация слияния *SDHA-ALK* (ни одной экспрессии *ALK^{ATI}*) при изучении 122 акральных меланом [36]. По данным G. Cesi и соавт. [19], ИГХ-метод определяет наличие мутации лишь при ее выраженном проявлении (3+). Также они провели изучение данных о пациентах с меланомой, используя базы данных TCGA. Установлено, что у 203 из 470 пациентов имеется мутация *BRAFV600*, у 111 (23,6 %) пациентов — мутация в *ALK*, а в 41 случае мутации установлены в обоих генах [28].

В таблице представлены результаты основных исследований новой изоформы *ALK*.

Роль ингибиторов *ALK* при лечении пациентов с мутациями гена *ALK* в меланоцитарных опухолях

Учитывая успех таргетной терапии у пациентов с транслокацией *ALK* при немелкоклеточном раке легкого и наличие клинически эффективных ингибиторов *ALK*, в последних исследованиях ученые стремились выявить меланомы с измененными *ALK* и проанализировать эффективность их ингибиторов.

Уже в исследовании T. Wiesner и соавт. была продемонстрирована терапевтическая эффективность ингибиторов *ALK*: авторы отмечали регрессию опухоли в ответ на все ингибиторы *ALK* [20]. Можно было бы сказать, что все исследования проводились на клеточных линиях (NIN3T3, Ba/F3 и melan-a), которые экзогенно экспрессируют *ALK^{ATI}*, а не на клеточных линиях меланомы человека или опухолях, имеющих эндогенную экспрессию *ALK^{ATI}*. Однако у пациента с отрицательной динамикой на фоне иммунотерапии ипилимумабом и ниволумабом, паллиативного облучения метастазов и химиотерапии дакарбазином наблюдали выраженную регрессию опухоли на фоне ингибиторов *ALK*. Несмотря на это, результаты последующих исследований оказались противоречивыми [22, 25].

Так, уже в 2017 г. K.L. Couts и соавт. показали, что опухоли с транслокацией EML4–*ALK* отвечали на ингибиторы *ALK*, в то время как опухоли с *ALK^{ATI}* никак не реагировали на эти препараты [22]. Все проанализированные в работе меланомы, экспрессирующие *ALK^{ATI}*, имели сопутствующую мутацию или слияние в 1 из распространенных генов-драйверов

Сравнение основных исследований новой изоформы ALK (2015–2020 гг.)
Comparison of the main studies of a new isoform of ALK (2015–2020)

Характеристика Characteristic	Т. Wiesner и соавт. (2015) [3] T. Wiesner et al. (2015) [3]	К.Л. Coutts и соавт. (2017) [5] K.L. Coutts et al. (2017) [5]	Г. Cesi и соавт. (2018) [2] G. Cesi et al. (2018) [2]	Н.Т. Ниу и соавт. (2020) [6] H.T. Niu et al. (2020) [6]	К.К. Шах и соавт. (2020) [7] K.K. Shah et al. (2020) [7]
Исследовано меланом Researched melanomas	334	45	Отобрано 26×10^3 клеток A375X1 из 20 клонов. В 4 (15 %) из 26 случаев выявлена мутация ALK, во всех из них выявлена мутация BRAF 26 × 10 ³ A375X1 cells were selected from 20 clones. In 4 (15 %) out of 26 cases, an ALK mutation was detected. And the BRAF mutation was detected in all of them	30 образцов азиатской популяции 30 samples of the Asian population	324 (153 опухоли пациентов с III стадией и 171 опухоль от пациентов с IV стадией) 324 (153 tumors from patients of stage III and 171 tumors from patients of stage IV)
Метод исследо- вания Method of investigation	RNA-seq, ИГХ-метод с D5F3 (Cell Signaling) Immuno-histological analysis with D5F3 (Cell Signaling)	qRT-PCR с подтверждением иммуноблоттингом qRT-PCR confirmed by immunoblotting	Определение микроРНК с последующей ПЦР, ИГХ-метод с D5F5 Determination of microRNAs followed by PCR. Immuno-histological analysis with D5F5	Флуоресцентная гибридизация in situ, ИГХ-метод с D5F3 Fluorescence in situ hybridization, Immuno-histological analysis with D5F3	ИГХ-метод с D5F3 (чувствительность – 52,2 %, специфичность – 100 %), NanoString (чувствительность – 81,5 %, специфичность – 84,9 %), Immuno-histological analysis with D5F3 (sensitivity 52.2 %, specificity 100 %), NanoString (sensitivity 81.5 %, specificity 84.9 %)
Выявление ALK ALK detection	11,34 % ALK в 7 (2,3 %) первичных и 9 (3 %) метастатических опухолях ALK in 7 (2.3 %) primary and 9 (3 %) metastatic tumors	11 (24,4 %) из 45 метаном экспрессировали ALK; 4 (8,9 %) из 45 – ALK ^{wt} , 7 (15,6 %) из 45 – ALK ^{wt} и 1 (2,2 %) из 45 – EML4-ALK 11 (24.4 %) out of 45 melanomas expressed ALK. In 4 (8.9 %) out of 45 – ALK ^{wt} , in 7 (15.6 %) out of 45 – ALK ^{wt} and 1 (2.2 %) out of 45 – EML4-ALK	–	Транслокация ALK в 4 (13,3 %) образцах ALK translocation was detected in 4 (13.3 %) samples	Экспрессия ALK выявлена в 23 опухолях ИГХ-методом, в 37 – методом NanoString; ALK ^{wt} – в 12,7 % опухолей III стадии и в 4,8 % – IV стадии ALK expression was detected in 23 tumors by Immuno-histological analysis and in 37 by NanoString. ALK ^{wt} in 12.7 % of stage III and 4.8 % at stage IV

Окончание таблицы
End of table

Характеристика Characteristic	T. Wiesner и соавт. (2015) [3] T. Wiesner et al. (2015) [3]	K.J. Busam и соавт. (2016) [4] K.J. Busam et al. (2016) [4]	K.L. Coutts и соавт. (2017) [5] K.L. Coutts et al. (2017) [5]	G. Cesi и соавт. (2018) [2] G. Cesi et al. (2018) [2]	H.T. Niu и соавт. (2020) [6] H.T. Niu et al. (2020) [6]	K.K. Shah и соавт. (2020) [7] K.K. Shah et al. (2020) [7]
Тип опухоли Type of tumor	Опухоли Шпица Spitz tumors	В 5 из 7 первичных опухолей ALK^{AT} обнаружена в узловых меланомах, 1 — в подногтевой In 5 out of 7 primary tumors, ALK^{AT} were found in nodular melanomas, 1 in the subarticular	2 слизистые, 1 поверхностная, 1 акральная, 3 узловые 2 mucous, 1 superficial, 1 acral, 3 nodular	—	—	Без гистологического определения Without histological determination
Использованные лекарственные препараты Drugs were used	Кризотиниб, перитиниб, TAE-684 Crizotinib, ceritinib, TAE-684	—	Кризотиниб, перитиниб, энтректиниб, ASP3046, алектиниб, вемурафениб Crizotinib, ceritinib, entrectinib, ASP3046, alectinib, vemurafenib	PLX4032 (вемурафениб) в сочетании с кризотинибом, перитинибом, ASP3026 PLX4032 (vemurafenib) with crizotinib, ceritinib and ASP3026	—	—
Ответ на лечение Response to medications	Кризотиниб: выраженное улучшение и уменьшение опухоли в течение 6 недель терапии метастатической опухоли с делецией $CDKN2A$ и $PTEN$ (без интерлейкина 3) Treatment with crizotinib resulted in a marked symptomatic improvement and reduction of the tumor during 6 weeks of therapy of metastatic tumor with $CDKN2A$ and $PTEN$ deletion (without interleukin 3)	—	Ответ на траметиниб без выигрыша от добавления кризотиниба. Слияние $EML4-ALK$ и ALK^{AT} продемонстрировало сильный ответ на оба ингибитора. А ингибирование только ALK^{AT} не показало результатов The answer to trametinib without the benefit of adding crizotinib. The fusion of $EML4-ALK$ and ALK^{AT} demonstrated a strong response to both inhibitors. And inhibition of only ALK^{AT} did not show results	Комбинация ингибиторов ALK и вемурафениба эффективна в резистентных клетках меланомы The combination of ALK inhibitors and vemurafenib is effective in resistant melanoma cells	—	Ингибиторы BRAF/MEK с ALK — у 4 пациентов с мутациями $BRAF/ALK$ отмечен начальный ответ, но затем прогрессия. Уровни экспрессии ALK^{AT} в этой подгруппе пациентов были низкими Four patients with $BRAF/ALK$ mutations were treated with inhibitors $BRAF/MEK$ with ALK and showed the initial response, but then progressed. Levels of ALK^{AT} expression in this subgroup of patients were low

Примечание. ИГХ-метод — иммуногистохимический метод; ПЦР — полимеразная цепная реакция.
Note. PCR — polymerase chain reaction.

меланомы (*BRAF*, *NRAS*, *GNAI1*). Было предположено, что наличие дополнительного драйвера онкогена может предотвращать ответ на ингибирование ALK, но комбинация ингибитора ALK с ингибитором MEK на клеточной линии меланомы, содержащей слияние *AGK-BRAF*, не улучшила чувствительность к ингибиторам ALK. Интересно, что ни в одной опухоли не было обнаружено *ALK^{ATP}* совместно с *BRAFV600* [22].

В 2018 г. группа исследователей из Люксембурга опубликовала свой опыт в журнале *Molecular Cancer* [19]. Авторы анализировали гиперэкспрессию белка усеченной формы ALK (*ALK^{RES}*) как новый механизм приобретения лекарственной устойчивости в клетках меланомы. В исследовании показано, что угнетение *ALK^{RES}*-экспрессирующих резистентных клеток меланомы ингибиторами siRNA или ALK в комбинации с любым из ингибиторов BRAF или MEK приводит к эффективному подавлению роста клеток и запуску апоптоза.

G. Cesi и соавт. впервые установили, что экспрессирующийся *ALK^{RES}* выделяется во внеклеточные везикулы (extracellular vesicles, EVs) и переносится на чувствительные ALK-отрицательные клетки меланомы. Там *ALK^{RES}* функционирует при активации сигнального пути MAPK и таким образом участвует в передаче лекарственной устойчивости. Наконец, при комбинированном использовании ингибиторов BRAF и ALK у мышей с *ALK*-положительными опухолями образования резко уменьшались в объеме. Было установлено, что *ALK* является драйвером резистентности в субклоне BRAF-резистентных клеток. На примере транслокации с вирусной последовательностью мышинного лейкоза было показано, что к усеченному белку приводит лишение N-концевой части (экзоны 1–17). Чтобы определить реакцию на лекарства, было протестировано 3 различных ингибитора ALK в комбинации с ингибитором BRAF. Как и ожидалось, комбинированный режим работает эффективно, а ингибирование в монорежиме не оказывало никакого влияния на рост резистентных клеток, если фосфорилирование *ERK* не было заблокировано. Таким образом, комбинированное ингибирование BRAF и ALK может иметь непосредственное клиническое значение для тех пациентов, которые приобрели вторичные мутации дополнительно к *ALK*, или для тех, кто несет *BRAFV600E* вместе с онкогенной изоформой *ALK* и проявляет внутреннюю устойчивость к ингибитору BRAF в монорежиме [19]. Передача фенотипических признаков через EVs — это развивающаяся область исследований [37].

В апреле 2020 г. K.K. Shah и соавт. провели исследование экспрессии *ALK^{ATP}* и ответа на терапию у пациентов с меланомой [24]. Из 324 пациентов только у 4 были одновременно мутации *ALK* и *BRAF*, и они

были выбраны кандидатами для комбинированной терапии BRAF/ALK. Пациенты получали ингибитор BRAF или комбинированный ингибитор BRAF/MEK и изначально показывали ответ на комбинацию с *ALK*, но впоследствии наступило прогрессирование заболевания, в отличие от результатов, полученных G. Cesi и соавт. [19]. Интересно, что экспрессия *ALK^{ATP}* у этих 4 пациентов была на низком уровне и ни в одном случае не наблюдали уровня экспрессии ALK, прогнозирующего чувствительность к монотерапии (сильное диффузное окрашивание) [24].

Обсуждение

Возможно, *ALK^{ATP}* является одним из механизмов резистентности к BRAF-ингибиторам. Совместное ингибирование *ALK^{ATP}* и *BRAFV600* показало положительные результаты в нескольких исследованиях [26, 27]. Учитывая полученные в исследовании T. Wisner и соавт. данные о том, что *ALK^{ATP}* может стимулировать онкогенез только в пределах определенного «порогового» уровня экспрессии, низкий уровень экспрессии *ALK^{ATP}* в сочетании со статусом *BRAF* также может служить биомаркером устойчивости к BRAF-и пользы от назначения ALK-ингибиторов.

По данным K.K. Shah, экспрессия *ALK^{ATP}* в метастатических опухолях оказалась ниже, чем в первичных, что может свидетельствовать о потере данной мутации с развитием болезни. Практически во всех исследованиях ингибиторы ALK работали при транслокации *ALK* в клетках меланомы [24].

Дополнительный интерес представляет блокада внеклеточных везикул (EVs) и изучение роли интерлейкина 3 в ингибировании *ALK^{ATP}*, поскольку в исследовании T. Wisner и соавт. в присутствии интерлейкина 3 возникала резистентность к ингибиторам ALK.

В настоящее время идет II фаза исследования эффективности ингибиторов ALK в лечении пациентов с меланомой и изменениями *ALK* или ее гиперэкспрессией [38].

Заключение

Иммуногистохимическое исследование не может быть основным методом определения экспрессии *ALK^{ATP}* ввиду низкой чувствительности метода. Учитывая возможный эффект ингибиторов ALK на фоне низкой экспрессии *ALK^{ATP}* с сопутствующей мутацией *BRAFV600*, важность определения низкой экспрессии *ALK^{ATP}* возрастает.

Требуются дополнительные исследования для определения оптимального, недорогого метода оценки *ALK^{ATP}* в рутинной практике, способного детектировать низкий уровень экспрессии; кроме того, необходимо продолжить поиск способов ингибирования данной генетической мишени.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Karimkhani C., Green A.C., Nijsten T. et al. The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease study 2015. *Br J Dermatol* 2017;177(1):134–40.
- Потекаев Н.Н., Титов К.С., Маркин А.А., Кашурников А.Ю. Эпидемиология меланомы кожи в Российской Федерации и в городе Москве за 10 лет (2008–2018 гг.). *Клиническая дерматология и венерология* 2020;19(6):810–6. [Potekaev N.N., Titov K.S., Markin A.A., Kashurnikov A.S. Epidemiology of skin melanoma in the Russian Federation and in Moscow for 10 years (2008–2018). *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya* = Russian Journal of Clinical Dermatology and Venereology 2020;19(6):810–6. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/klinderma202019061810.
- Melanoma of skin. *Globocan*, 2020. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/16-Melanoma-of-skin-fact-sheet.pdf>.
- Чулкова С.В., Маркина И.Г., Чернышева О.А. и др. Роль стволовых опухолевых клеток в развитии лекарственной резистентности меланомы. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(2):6–14. [Chulkova S.V., Markina I.G., Chernysheva O.A. et al. The role of tumor stem cells in the development of drug resistance of melanoma. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(2):6–14. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-6-14.
- Михеева О.Ю., Титов К.С., Серяков А.П. и др. Метастатическое поражение кожи при меланоме. *Злокачественные опухоли* 2016;3:37–43. [Mikheeva O.Y., Titov K.S., Seryakov A.P. et al. Melanoma skin metastasis. *Zlokachestvennye opukholi* = Malignant Tumours 2016;3:37–43. (In Russ.)]. DOI: 10.18027/2224-5057-2016-3-37-43.
- Титов К.С., Барышникова М.А., Казаков А.В. и др. Прогностическое значение стволовых клеток опухоли и экспрессии ALK у пациентов с первичной меланомой кожи. *Практическая онкология* 2019;20(1):72–9. [Titov K.S., Baryshnikova M.A., Kazakov A.M. et al. Prognostic significance of stem cells tumors and ALK expression in patients with primary skin melanoma. *Prakticheskaya onkologiya* = Practical oncology 2019;20(1):72–9. (In Russ.)]. DOI: 10.31917/2001072.
- Чулкова С.В., Маркина И.Г., Антипова А.С. и др. Роль стволовых опухолевых клеток в канцерогенезе и прогнозе меланомы. *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии* 2018;18(4):100–16. [Chulkova S.V., Markina I.G., Antipova A.S. et al. The role of stem tumor cells in carcinogenesis and prognosis of melanoma. *Vestnik Rossiyskogo nauchnogo tsentra rentgenoradiologii* = Bulletin of the Russian Scientific Center of X-ray Radiology 2018;18(4):100–16. (In Russ.)].
- Topczewska J.M., Postovit L.M., Margaryan N.V. et al. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat Med* 2006;12(8):925–32. DOI: 10.1038/nm1448.
- Lehraiki A., Cerezo M., Rouaud F. et al. Increased CD271 expression by the NF- κ B pathway promotes melanoma cell survival and drives acquired resistance to BRAF inhibitor vemurafenib. *Cell Discov* 2015;1:15030. DOI: 10.1038/celldisc.2015.30.
- Ротин Д.Л., Титов К.С., Казаков А.М. Васкулогенная мимикрия при меланоме: молекулярные механизмы и клиническое значение. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(1):16–24. [Rotin D.L., Titov K.S., Kazakov A.M. Vasculogenic mimicry in melanoma: molecular mechanisms and clinical significance. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(1):16–24. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-16-24.
- Chernysheva O., Markina I., Demidov L. et al. Bone marrow involvement in melanoma. Potentials for detection of disseminated tumor cells and characterization of their subsets by flow cytometry. *Cells* 2019;8(6):627. DOI: 10.3390/cells8060627.
- Чулкова С.В., Рябчиков Д.А., Дудина И.А. и др. Перспективы использования микроРНК в качестве диагностических и прогностических биомаркеров меланомы. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(4):51–6. [Chulkova S.V., Ryabchikov D.A., Dudina I.A. et al. The Prospects for the use of microRNA as diagnostic and prognostic melanoma biomarkers. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(4):51–6. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-51-56.
- Титов К.С., Михеева О.Ю., Казаков А.М., Егорова А.В. Роль хирургии в лечении отдаленных метастазов меланомы кожи. *Злокачественные опухоли* 2016;3(3):27–33. [Titov K.S., Mikheeva O.Y., Kazakov A.M., Egorova A.V. The role of surgery in the treatment of distant metastases of skin melanoma. *Zlokachestvennye opukholi* = Malignant Tumours 2016;3(3):27–33. (In Russ.)]. DOI: 10.18027/2224-5057-2016-3-27-33.
- Титов К.С., Ротин Д.Л., Казаков А.М. и др. Частота экспрессии тирозинкиназы гена ALK и онкобелка TAG-72 при первичной меланоме кожи. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(3):50–4. [Titov K.S., Rotin D.L., Kazakov A.M. Expression rate of ALK Tyrosine Kinase and TAG-72 oncoprotein in primary skin melanoma. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal* = Russian journal of biotherapy 2018;17(3):50–4. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-50-54.
- Montavon G., Jauquier N., Coulon A. et al. Wild-type ALK and activating ALK-R1275Q and ALK-F1174L mutations upregulate Myc and initiate tumor formation in murine neural crest progenitor cells. *Oncotarget* 2014;5(12):4452–66. DOI: 10.18632/oncotarget.2036.
- Takezawa K., Okamoto I., Nishio K. et al. Role of ERK-BIM and STAT3-survivin signaling pathways in ALK inhibitor-induced apoptosis in EML4-ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(8):2140–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2798.
- Lemmon M.A., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141(7):1117–34. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.011.
- Holderfield M., Deuker M.M., McCormick F., McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer* 2014;14(7):455–67. DOI: 10.1038/nrc3760.
- Cesi G., Philippidou D., Kozar I. et al. A new ALK isoform transported by extracellular vesicles confers drug resistance to melanoma cells. *Molecular Cancer* 2018;17(1):145. DOI: 10.1186/s12943-018-0886-x.
- Wiesner T., Lee W., Obenaus A.C. et al. Alternative transcription initiation leads to expression of a novel ALK isoform in cancer. *Nature* 2015;526(7573):453–7. DOI: 10.1038/nature15258.
- Busam K.J., Vilain R.E., Lum T. et al. Primary and metastatic cutaneous melanomas express ALK through alternative transcriptional initiation. *Am J Surg Pathol* 2016;40(6):786–95. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000611.
- Couts K.L., Bemis J., Turner J.A. et al. ALK inhibitor response in melanomas

- expressing EML4-ALK fusions and alternate *ALK* isoforms. *Mol Cancer Ther* 2018;17(1):222–31. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0472.
23. Niu H.T., Zhou Q.M., Wang F. et al. Identification of anaplastic lymphoma kinase break points and oncogenic mutation profiles in acral/mucosal melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013;26(5):646–53. DOI: 10.1111/pcmr.12129.
 24. Shah K.K., Neff J.L., Erickson L.A. et al. Correlation of Novel *ALK*^{WT} with ALK Immunohistochemistry and Clinical Outcomes in Metastatic Melanoma. *Histopathology* 2020;77(4):601–10. DOI: 10.1111/his.14191.
 25. Чернышова Е.В., Абрамов Д.С., Коновалов Д.М. и др. Молекулярно-биологические характеристики ALK-позитивной анапластической крупноклеточной лимфомы. *Онкогематология* 2016;1(4):25–31. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-25-31. [Chernyshova E.V., Abramov D.S., Kononov D.M. et al. Molecular biological characteristics of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Onkogematologia = Oncohematology* 2016;1(4):25–31. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-25-31.
 26. Holla V.R., Elamin Y.Y., Bailey A.M. et al. (2017) ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 2017;3(1):a001115. DOI: 10.1101/mcs.a001115.
 27. Zito Marino F., Liguori G., Aquino G. et al. Intratumor heterogeneity of ALK-rearrangements and homogeneity of *EGFR*-mutations in mixed lung adenocarcinoma. *PLoS One* 2015;10(9):e0139264. DOI: 10.1371/journal.pone.0139264.
 28. Iwahara T., Fujimoto J., Wen D. et al. Molecular characterization of *ALK*, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* 1997;14(4):439–49. DOI: 10.1038/sj.onc.1200849.
 29. George R.E., Sanda T., Hanna M. et al. Activating mutations in *ALK* provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 2008;455(7215):975–8. DOI: 10.1038/nature07397.
 30. Li G., Dai W.R., Shao F.C. Effect of *ALK*-inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21(15):3496–503.
 31. Lin J.J., Riely G.J., Shaw A.T. Targeting *ALK*: precision medicine takes on drug resistance. *Cancer Discov* 2017;7(2):137–55. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-1123.
 32. Lin J.J., Shaw A.T. Differential sensitivity to crizotinib: does EML4-ALK fusion variant matter? *J Clin Oncol* 2016;34(28):3363–5. DOI: 10.1200/JCO.2016.68.5891.
 33. Ronchi A., Montella M., Cozzolino I. et al. The potential diagnostic and predictive role of anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene alterations in melanocytic tumors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020;24(7):3829–38. DOI: 10.26355/eurrev_202004_20849.
 34. Hutarew G., Hauser-Kronberger C., Strasser F. et al. Immunohistochemistry as a screening tool for *ALK* rearrangement in NSCLC: Evaluation of five different ALK antibody clones and ALK FISH. *Histopathology* 2014;65(3):398–407. DOI: 10.1111/his.12399.
 35. Uguen A., Uguen M., Guibourg B. *ALK* Expression in Melanomas: Looking for a Needle in a Haystack. *Am J Surg Pathol* 2016;40(10):1437. DOI: 10.1097/pas.0000000000000686.
 36. Yeh I., Jorgenson E., Shen L. et al. Targeted genomic profiling of acral melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2019;111(10):1068–77. DOI: 10.1093/jnci/djz005.
 37. Tkach M., Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell* 2016;164(6):1226–32. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.043.
 38. A Phase 2 Study of the ALK Inhibitor Ensartinib for Patients With Melanomas Harboring ALK Alterations or Aberrant ALK Expression. Xcovery Holding Company, LLC. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03420508#studydesc>.

Вклад авторов

К.С. Титов, А.М. Казаков, С.В. Чулкова: разработка дизайна исследования, написание текста статьи;

А.А. Маркин: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста статьи.

Authors contribution

K.S. Titov, A.M. Kazakov, S.V. Chulkova: research design development; writing the text of the manuscript;

A.A. Markin: research design development, review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained, writing the text of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.С. Титов / K.S. Titov: <https://orcid.org/0000-0003-4460-9136>

А.А. Маркин / A.A. Markin: <https://orcid.org/0000-0002-9180-9264>

А.М. Казаков / A.M. Kazakov: <https://orcid.org/0000-0002-9534-2729>

С.В. Чулкова / S.V. Chulkova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 06.07.2021. Принята к публикации: 01.10.2021.

Article submitted: 06.07.2021. Accepted for publication: 01.10.2021.

Адгезионная концепция в биологии рака: местные и центральные механизмы (часть 2)

О.А. Бочарова¹, В.Б. Матвеев¹, Е.В. Бочаров¹, Р.В. Карпова¹, В.Г. Кучеряну²

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

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8

Контакты: Ольга Алексеевна Бочарова imufarm@rambler.ru

Цель настоящего обзора – представление концепции, в соответствии с которой ключевым механизмом опухолевого процесса является нарушение адгезионных взаимодействий с участием местных и центральных механизмов. В первой его части рассматриваются особенности местной адгезионной дисрегуляции, во второй части – центральные процессы. Особенности местной адгезионной дисрегуляции, обеспечивающей основные свойства опухоли (потерю тканевого контроля пролиферации, анаплазию, инвазию, метастазирование, дефицит иммунологического надзора), могут находиться под контролем центральных механизмов с участием дофаминергической системы, которая, используя иммуноадгезионные взаимодействия, способна регулировать активную фазу реакций иммунитета против опухоли, «вмешиваясь» в процесс и прерывая таким образом развитие злокачественного новообразования, инициированное местной мутацией в ткани-мишени. Выдвигаемая концепция о ключевой роли адгезионной дисрегуляции при неоплазии в ткани-мишени и процессах иммунореактивности при участии потери центрального дофамина в качестве адгезиоповреждающего фактора на уровне реакций иммунитета раскрывает в том числе стрессорный механизм этиологии рака. При этом центральный дофамин (продуцируемый в головном мозге) прямо влияет на уровень периферического дофамина (продуцируемого вне головного мозга). Основные запасы периферического дофамина в тромбоцитах и лимфоцитах крови могут служить гарантом противоопухолевой защиты. Будучи продуктом в том числе и лимфоцитов, периферический дофамин играет роль в созревании цитотоксических лимфоцитов, способствуя их миграции в опухолевые узлы, образованию конъюгатов с опухолевыми клетками. Так дофамин участвует в активной фазе реакций иммунитета против опухоли, внося свой вклад в обеспечение адгезионных взаимодействий между эффекторами иммунитета и клетками-мишенями. Последнее также содействует защите организма от опухолевых патологий, которые, безусловно, сокращают жизнь.

Реализация изложенных подходов адгезионной концепции местного и центрального контроля опухолеобразования создает перспективу для повышения эффективности способов диагностики, профилактики и лечения, что может быть шагом к решению проблемы злокачественных новообразований.

Ключевые слова: клеточная адгезия, опухоль, канцерогенез, интегрины, метастазирование, иммунитет, хронический стресс, старение, дофамин

Для цитирования: Бочарова О.А., Матвеев В.Б., Бочаров Е.В. Адгезионная концепция в биологии рака: местные и центральные механизмы (часть 2). Российский биотерапевтический журнал 2021;20(4):42–50. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-42-50.

Adhesion concept in cancer biology: local and central mechanisms (part 2)

Olga A. Bocharova¹, Vsevolod B. Matveev¹, Evgeniy V. Bocharov¹, Regina V. Karpova¹, Valerian G. Kucheryanu²

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Institute of general pathology and pathophysiology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia

Contacts: Olga Alekseevna Bocharova imufarm@rambler.ru

The review presents the concept the key mechanism of the tumor process is a violation of adhesion interactions involving local and central mechanisms. Local features of adhesive dysregulation are demonstrated in the part 1.

The second part describes the central processes. Features of local adhesive dysregulation which provides the main properties of the tumor (loss of tissue control of proliferation, anaplasia, invasion, metastasis, lack of immunological surveillance) can be controlled by central mechanisms involving the dopaminergic system which is able using immunoadhesional interactions to regulate the active phase of immune responses against the tumor interfering the process and thus interrupting the development of a malignant neoplasm initiated by a local mutation in the target tissue. The proposed concept of the adhesion key role dysregulation in the target tissue neoplasia and the processes of immunoreactivity involving the loss of central dopamine as an adhesive-damaging factor at the level of immune responses reveals among other things the stress mechanism of cancer etiology. At the same time, the central dopamine directly affects the level of dopamine in the peripheral body. The main reserves of peripheral dopamine in platelets and blood lymphocytes can serve as a guarantee of antitumor protection. Being the production of lymphocytes peripheral dopamine plays a role in the maturation of cytotoxic lymphocytes promoting their migration to tumor nodes, the formation of conjugates with tumor cells. So, dopamine participates in the active phase of immune responses against the tumor contributing to the support of adhesive interactions between immune effectors and target cells. The latter also helps to protect the body from tumor diseases which obviously shorten life.

The adhesive concept of local and central control of tumor formation creates a certain perspective for improving the effectiveness of diagnostics, prevention and treatment methods which can be a step towards solving the problem of malignant neoplasms.

Key words: cell adhesion, tumor, carcinogenesis, integrins, metastasis, immunity, chronic stress, aging, dopamine

For citation: Bocharova O.A., Matveev V.B., Bocharov E.V. Adhesion concept in cancer biology: local and central mechanisms (part 1). Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(3):42–50. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-42-50.

Введение

В настоящем обзоре представлена концепция, в соответствии с которой ключевым механизмом опухолевого процесса является нарушение адгезионных взаимодействий с участием местных и центральных механизмов. В первой его части проанализированы особенности местной адгезионной дисрегуляции, которые позволяют рассматривать опухолевый процесс как проявление старения отдельных клеток. Во второй части описаны центральные процессы. Особенности местной адгезионной дисрегуляции, обеспечивающей основные свойства опухоли: потерю тканевого контроля пролиферации, анаплазию, инвазию, метастазирование, дефицит иммунологического надзора, — могут находиться под контролем центральных нейрональных механизмов с участием дофаминергической (ДАергической) системы, которая в состоянии содействовать защите организма от опухолевых патологий, безусловно, сокращающих жизнь.

Центральные нейрональные механизмы против старения, стресса и рака

Центральным регулятором (маркером) продолжительности жизни и эндогенным антистрессором-антидепрессантом, как известно, является нейромедиатор дофамин (ДА), содержащийся в дофаминергических нейронах (ДАергических, дофаминовых, ДА-нейронах) головного мозга [1]. Более того, в литературе все чаще появляются данные, что ДА вовлечен в поведение опухоли и развитие ее сосудов, являясь противоопухолевым агентом [2].

Дофамин при старении. ДА-нейроны открыты более 50 лет тому назад. ДА относится к основным нейромедиаторам головного мозга, образуется из аминокислоты тирозина. Известно, что некоторые ДА-нейроны могут жить более 100 лет. Погибшие нейроны в результате нейрогенеза замещаются новыми, однако со временем все же происходит угасание ДАергической системы [3, 4]. Потерю ДА-нейронов в качестве ключевого фактора старения связывают с угасанием когнитивных (познавательных), мотивационных (связанных с жизнелюбием) и моторных (двигательных) функций [5].

Около 80 % ДА-нейронов содержится в nigrostriatной системе среднего мозга — в компактной зоне черной субстанции (*Substantia nigra*), где находятся тела нейронов с отростками в полосатом теле (стриатуме). Содержащийся в ДА-нейронах пигмент нейромеланин придает им темный цвет. Нигростриатная система «руководит» большей частью двигательных процессов. Поскольку повреждения в этой системе вызывают болезнь Паркинсона, она привлекает особое внимание исследователей [6]. Нигростриатная система наиболее восприимчива к потере функции ДА-нейронов при старении. В молодом возрасте у людей обнаруживают около 400 000 ДА-нейронов в черной субстанции. К 60 годам их число снижается до 250 000. Пожилой возраст, в частности, является основным фактором риска развития болезни Паркинсона, при которой число ДА-нейронов колеблется от 60 000 до 120 000 [7].

При старении, как и при стрессе, в процессе повреждения и гибели ДА-нейронов участвуют многие

механизмы. Первые морфологические признаки старения мозга наблюдают в белом веществе уже к 20–40 годам, а к 40–50 годам – и в сером веществе. С возрастом (от 50 до 90 лет) вес мозга снижается на 2–3 % за десятилетие. Потеря ДА-нейронов составляет примерно 10 % за 10 лет. Кульминация потери ДА-нейронов (40–50 %) происходит в возрасте 88 лет (поэтому в этом возрасте умирает основная масса людей). Однако у долгожителей, переживших возраст 100 лет, выявлено меньшее снижение уровня ДА-нейронов. Поэтому ДА-нейроны считают главными маркерами старения [8–10].

Дофамин и стресс. Интерес к функционированию ДАергической системы в последнее время связан с ее вероятным участием в патогенезе депрессивных расстройств, которыми страдает около 20 % населения земного шара. Потеря ДА-нейронов черной субстанции головного мозга была выявлена у пациентов при некоторых видах депрессии. ДА при этом характеризуется как антидепрессант. В частности, получено подтверждение клинической эффективности терапии с использованием стимуляторов ДА при депрессии. Возрастные депрессивные расстройства также можно объяснить с позиций гибели ДА-нейронов [11]. Вместе с тем смерть ДА-нейронов мозга также может быть индуцирована хроническим стрессом. При хроническом стрессе, вызванном, например, разделением матерей и детенышей экспериментальных крыс, активация рецепторов ДА снижала гибель нейронов и подавляла тревожность самок [12, 13]. В то же время определенные механизмы регулируют нейрональную активность, связанную с выживанием и комплексной регуляцией сложного поведения. Так, показано, что материнская забота самок крыс, характеризующаяся усилением «вылизывания» и повышением «ухаживания» детенышей, приводит к подавлению рецепторов гормонов стресса, что активизирует ДА. Это способствует подавлению тревожности у взрослых крыс, показывая значение ДА и для формирования чувства любви, в том числе материнской [14]. В экспериментах на серых полевках *Microtus ochrogaster*, для которых характерны моногамные семьи, было показано, что ДА лежит в основе чувства привязанности к партнеру и супружеской верности у этих грызунов. Вероятно, сходную роль ДА играет и у человека [15].

ДА является важной частью системы «вознаграждения» мозга, поскольку вызывает чувство удовольствия (или удовлетворения), что влияет на процессы мотивации и обучения. ДА естественным образом вырабатывается в больших количествах во время положительного, по субъективному представлению человека, опыта (приема вкусной пищи, приятных телесных ощущений, секса). Исследования показали, что даже счастливые воспоминания могут увеличить

уровень ДА. Поэтому данный нейромедиатор используется мозгом для оценки и мотивации, закрепляя важные для выживания и продолжения рода действия [16].

Дофамин и рак. В центральной нервной системе (ЦНС) ДА вовлечен в привилегированные центральные механизмы. Кроме того, после транспортировки симпатическими нервами он также имеет периферические эффекты во всем организме. ДА проявляет свои функции, связываясь с ДАергическими рецепторами, которые располагаются на клеточных мембранах мозга, сердца, почек, коры надпочечников, кровеносных сосудов, иммунокомпетентных клеток, окончаний симпатических нервов. На периферии ДА синтезируется в желудочно-кишечном тракте. Запасы ДА формируются в тромбоцитах в плотных гранулах, которые являются его главными циркулирующими резервуарами. Вместе с тем ДА, как все чаще показывают данные литературы, вовлечен в поведение опухоли, влияя на пролиферацию ее клеток и ангиогенез [17]. Так, в экспериментах *in vitro*, например, на клетках рака яичников ДА уменьшал способность к инвазии в мембраны специальной культуральной системы и усиливал апоптоз раковых клеток [18]. У мышей после трансплантации саркомы концентрация ДА в костном мозге уменьшилась в 7 раз [19]. На другой мышинной модели инъекции нейротоксина вызвали гибель ДА-нейронов и в результате – истощение ДА. У таких мышей возникали большие по объему подкожная меланома и саркома, чем у тех, которым не вводили нейротоксин. Мыши с истощенным уровнем ДА имели увеличенную плотность и проницаемость опухолевых микрососудов, а также усиление фосфорилирования R2-рецепторов VEGF в опухолевых эндотелиальных клетках [20, 21].

Концентрация ДА также была изучена у онкологических больных. В опухолевой ткани рака прямой кишки у 36 пациентов уровень ДА был в 3–10 раз ниже, чем в здоровой ткани [22]. ДА не выявлялся в ткани рака желудка 22 пациентов, в то время как его присутствие было продемонстрировано в здоровой ткани желудка у 22 пациентов с полипами желудка [23]. Для достижения системного уровня ДА, который мог бы затормозить опухолевый рост, было проведено клиническое исследование. Четыре пациента с метастатической меланомой получали инфузии ДА в максимальной дозе в течение 48–120 ч, при этом уровень ДА в плазме достигал от 1 до 10 μM . Однако исследование было остановлено из-за тяжелых кардиоваскулярных побочных эффектов после проведения только 1 цикла терапии. Тест на пролиферацию биопсийного материала, взятого до и после цикла терапии, показал 10-кратное подавление пролиферации опухолевых клеток [24].

Итак, *in vitro* и *in vivo* показана противоопухолевая активность ДА. Вместе с тем ДА присутствует в опухолях в меньшей концентрации, чем в нормальных тканях. Истощение ДА головного мозга под действием нейротоксина в эксперименте ускоряло развитие опухолей и их сосудов в периферическом организме. Напротив, повышение уровня ДА в головном мозге подавляло рост опухолей и питающих их сосудов в периферическом организме.

Дофаминергическая система и иммуноадгезионные механизмы

Следует особо отметить, что ДА вовлечен в регуляцию иммунной реактивности организма. Имунокомпетентные органы богато иннервированы симпатическими нервами, содержащими большое количество ДА. Различные субпопуляции лимфоцитов продуцируют ДА и все типы ДА-ергических рецепторов [25].

Исследования демонстрируют существенные взаимодействия между ЦНС и иммунной системой. Выявлено, например, что истощение центрального ДА (продуцируемого в головном мозге) при введении в головной мозг нейротоксина приводит к снижению содержания периферического ДА (продуцируемого вне головного мозга), к подавлению размножения лимфоцитов и продукции ими интерферона γ , снижению содержания цитотоксических Т-клеток крови. Внутривенное введение нейротоксина сопровождалось угнетением пролиферации Т-лимфоцитов, их цитотоксической активности, а также усилением роста карциномы Эрлиха и повышением в плазме крови уровня интерлейкинов 1β и 6, способствующих росту опухоли [26].

Следует особо подчеркнуть, что ингибиторы ДА-ергических рецепторов способствуют подавлению цитолитической активности Т-лимфоцитов при нарушении формирования их конъюгатов с клетками опухоли. Таким образом, катехоламин ДА может регулировать киллерную активность лимфоцитов, контролируя адгезионные взаимодействия последних с клетками опухоли [27]. Более выраженная экспрессия ДА-ергических маркеров в $CD8^+$ -популяции лимфоцитов говорит в пользу того, что ДА может играть роль в созревании цитотоксических Т-клеток, способствовать адгезии иммунных эффекторов и клеток опухоли, а также участвовать в активной фазе иммунного ответа, выполняя роль токсина, лизирующего клетки-мишени (исходя из цитотоксического действия ДА *in vitro*) [28].

Тот факт, что ДА способствует адгезионным взаимодействиям в реакциях иммунитета, доказан результатами исследования, подтвердившего наличие в иммунной системе функциональных нейротрансмиттеров, таких как ДА. Ранее ДА рассматривали как один из основных передатчиков сигналов, регулирую-

ющих функции нервной системы, однако оказалось, что ДА играет роль и в иммунном ответе [29, 30].

Таким образом, функционирование иммунной системы обрело сходство с функционированием нервной системы.

Авторы исследования, опубликованного в журнале *Nature*, утверждают, что Т-лимфоциты, продуцируя ДА, способствуют синтезу антител В-лимфоцитами. Эти процессы происходят в герминативных центрах лимфатических тканей, где фолликулярные Т-хелперы (Tfh) помогают В-лимфоцитам реализовать свои функции. Многие Tfh, как оказалось, содержат гранулы, аналогичные тем, что содержатся в пресинаптических окончаниях нейронов. При контакте с В-лимфоцитами Tfh начинают выделять ДА, который способствует миграции молекулы ICOSL (Inducible T cell Costimulator Ligand, костимулирующая молекула, необходимая для полноценного контакта между клетками) из внутриклеточного пространства к мембране, укрепляя связи между клетками в зоне их контакта, называемой иммунным синапсом. Работа основана на изучении 200 образцов тканей миндалин, удаленных у детей, и включала в себя математическое моделирование деятельности иммунной системы в ответ на вакцины. Считается, что открытие поможет в разработке новых подходов к лечению лимфом, аутоиммунных заболеваний и иммунодефицитов. Возможно, что доставка ДА в лимфатические ткани может способствовать более эффективному иммунному ответу [31].

Другие эксперименты показали, что у эмбрионов лягушки с удаленным головным мозгом иммунные клетки не концентрировались в месте повреждения или инфекции, а вели себя беспорядочно, что приводило к быстрому развитию заражения. У эмбрионов с мозгом клетки иммунитета мигрировали к месту повреждения/заражения, вступая в контакт с инфицированными клетками и элиминируя их. В эксперименте с *Escherichia coli* у нормальных эмбрионов выживаемость в результате составила 50 %, тогда как из эмбрионов с удаленным мозгом выжили только 16 %. При этом состав и количество иммунных клеток были одинаковы, но у эмбрионов без головного мозга отсутствовал нейротрансмиттер ДА. Таким образом, можно сделать вывод, что ДА способствует контакту иммунных эффекторов с клетками-мишенями, что является критичным для результата иммунореактивности [32].

Кроме того, даже активность центра удовольствия и награды с ДА-нейронами в вентрально-теgmentальной области (ВТО) головного мозга обеспечивается иммунологическим сопровождением. Чтобы избирательно активизировать центр удовольствия, мышам вводили вирусный вектор. Синтетическими лигандами в него встраивали рецепторы ДА DREADDs.

При введении мышам действующего на эти рецепторы вещества активизировались ДА-нейроны ВТО. При внутрибрюшном введении *Escherichia coli* у мышей через стимуляцию центра удовольствия усиливалась иммунореактивность. В течение суток после стимуляции ДА-нейронов ВТО уровень фагоцитоза бактерий макрофагами и дендритными клетками был в 2,5 раза выше контроля. Повышенную бактерицидную активность подтвердили *in vitro*. Чтобы доказать действие системы «награды» на приобретенный иммунитет, через 24 ч после активизации ДА-нейронов ВТО вводили *Escherichia coli*. В результате через 3 сут в селезенке животных повысилось число лимфоцитов, продуцирующих IgM. В крови концентрация антител, специфичных к *Escherichia coli*, оказалась на 86 % выше контроля. В печени в Т-лимфоцитах-хелперах повысилась выработка интерферона γ . Через неделю значение перечисленных маркеров активированного иммунного ответа вернулось к исходному уровню. Связь ВТО и иммунной системы логична в эволюционном плане, поскольку вызывающие удовольствие события (принятие пищи, секс) часто сопряжены с поступлением в организм патогенных факторов, что активирует иммунитет также при участии ДА [33].

Помимо этого, ДА способствует созреванию лимфоцитов. Более выраженная экспрессия ДА-ергических маркеров в CD8⁺-популяции лимфоцитов говорит в пользу того, что ДА может играть роль в созревании цитотоксических Т-клеток и участвовать в активной фазе иммунного ответа, способствуя адгезионным взаимодействиям эффекторов и мишеней. Однако, если пересечь гипофизарную ножку (центральный проводник сигналов) или удалить тимус (периферическая реализация влияния ДА), то периферический ДА перестает зависеть от центрального [34].

Можно сделать вывод, что ДА центральный, влияя на ДА периферический, может ингибировать рост опухоли, вмешиваясь в механизмы адгезионной дисрегуляции на уровне реакций иммунитета. При этом ДА играет роль в созревании цитотоксических Т-лимфоцитов, вероятно, контролирует их контакты с опухолевыми клетками и гибель последних, участвуя в активной фазе реакций иммунитета против опухолей, являясь, кроме того, агентом, вызывающим напрямую лизис опухолевой клетки, что может быть критическим событием эффективной иммунореактивности (рис. 1, 2).

Итак, при определенном содержании ДА в ЦНС поддерживается соответствующий уровень двигательной активности скелета, тонуса внутренних органов и сосудов, а также когнитивных возможностей головного мозга. Вместе с тем сохраняются мотивационная, эмоциональная функция, хорошее настроение, жизнелюбие, способность развивать гибкое поведение в ответ на изменения окружающей обстановки с комплексной регуляцией сложного поведения.

Иными словами, чем дольше поддерживается соответствующий уровень жизнеспособных ДА-нейронов, тем менее активны механизмы старения и более продолжителен жизненный процесс.

При этом центральный ДА прямо влияет на уровень ДА в периферическом организме. Основные запасы периферического ДА в тромбоцитах и лимфоцитах крови могут служить гарантом противоопухолевой защиты. Будучи продуктом в том числе лимфоцитов, периферический ДА играет роль в созревании цитотоксических лимфоцитов, способствует их миграции в опухолевые массы, образованию конъюгатов с опухолевыми клетками, в то же время является для них агентом, который подавляет деление опухолевых клеток и развитие питающих их сосудов. Таким образом, ДА участвует в активной фазе реакций иммунитета против опухоли, внося свой вклад в обеспечение адгезионных взаимодействий между эффекторами иммунитета и клетками-мишенями. Последнее также содействует защите организма от опухолевых патологий, которые, безусловно, сокращают жизнь. Все это только подтверждает мнение, что ДА-нейроны участвуют в «интриге», ограничивающей долголетие. В результате центральные механизмы, которые поддерживают интеллектуальную, мотивационную и двигательную активность, усиливают именно иммуноадгезионные механизмы, защищающие организм от дефектных клеток (опухолевых или инфицированных), которые могут негативно влиять на продолжительность жизни. При старении, как и при хроническом стрессе, происходит потеря ДА-нейронов головного мозга, что влечет за собой подавление и периферического ДА со всеми вытекающими последствиями.

Заключение

Таким образом, особенности местной адгезионной дисрегуляции, обеспечивающей основные свойства опухоли (потерю тканевого контроля пролиферации, анаплазию, инвазию, метастазирование, дефицит иммунологического надзора), могут находиться под контролем центральных механизмов с участием ДА-ергической системы, которая способна, используя иммуноадгезионные взаимодействия, регулировать активную фазу реакций иммунитета против опухоли («вмешиваясь» в патологический процесс и прерывая таким образом развитие злокачественного новообразования, инициированное местной мутацией в ткани-мишени).

Вместе с тем выдвигаемая концепция о ключевой роли адгезионной дисрегуляции при неоплазии в ткани-мишени и процессах иммунореактивности при участии потери центрального ДА в качестве адгезиоповреждающего фактора на уровне реакций иммунитета раскрывает в том числе стрессорный механизм этиологии рака. Следовательно, важным

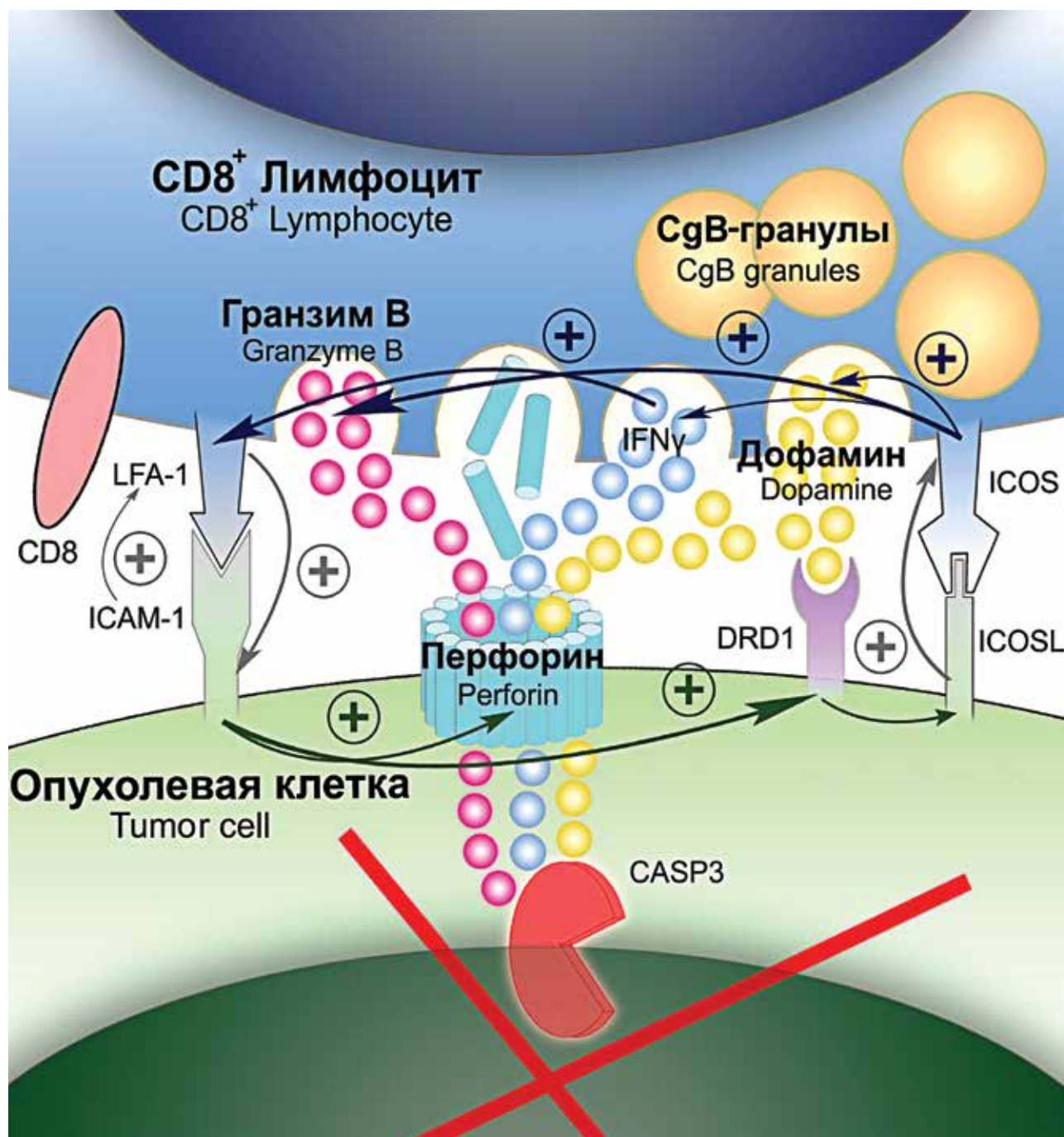


Рис. 1. Графическая модель контактных взаимодействий цитотоксического лимфоцита и опухолевой клетки. Высокий уровень дофамина, запасаемого в гранулах СgВ (Chromogranin B) [31], способствует экспрессии на мембранах CD8⁺-цитотоксических лимфоцитов β²-лейкоцитарных интегринов, например LFA-1, которые, в свою очередь, индуцируют экспрессию своих адгезионных контррецепторов ICAM-1 на опухолевых клетках, обеспечивая их контакт с лимфоцитами. ICAM-1 активируют DRD1-рецепторы дофамина на клетках опухоли и стимулируют повышение поверхностной экспрессии ICOSL (Inducible T cell Costimulator Ligand), который, в свою очередь, связывается с ICOS на цитотоксических лимфоцитах, стабилизируя контакты. При этом происходит индукция высвобождения из СgВ-гранул дофамина и переход его в опухолевую клетку через трансмембранные каналы перфорина вместе с интерфероном γ [35–38], гранзимами и др., способствуя лизису клеток-мишеней

Fig. 1. Contact interactions graphical model of cytotoxic lymphocyte and tumor cell. The high level of dopamine stored in CgB (Chromogranin B) granules [31] promotes the expression of β² leukocyte integrins (for example LFA-1) on CD8⁺ cytotoxic lymphocyte membranes, which in turn induce the expression of their adhesive ligands ICAM-1 on tumor cells ensuring their contact with lymphocytes. ICAM-1 activates DRD1 dopamine receptors on tumor cells and stimulates an increase in the surface expression of ICOSL (Inducible T cell Costimulator Ligand) which in turn binds to ICOS on cytotoxic lymphocytes, stabilizing contacts. In this case the release of dopamine granules from the CgB is induced. So, dopamine passes into the tumor cell through the transmembrane channels of perforin together with IFNγ [35–38], granzymes, etc., contributing to the lysis of target cell

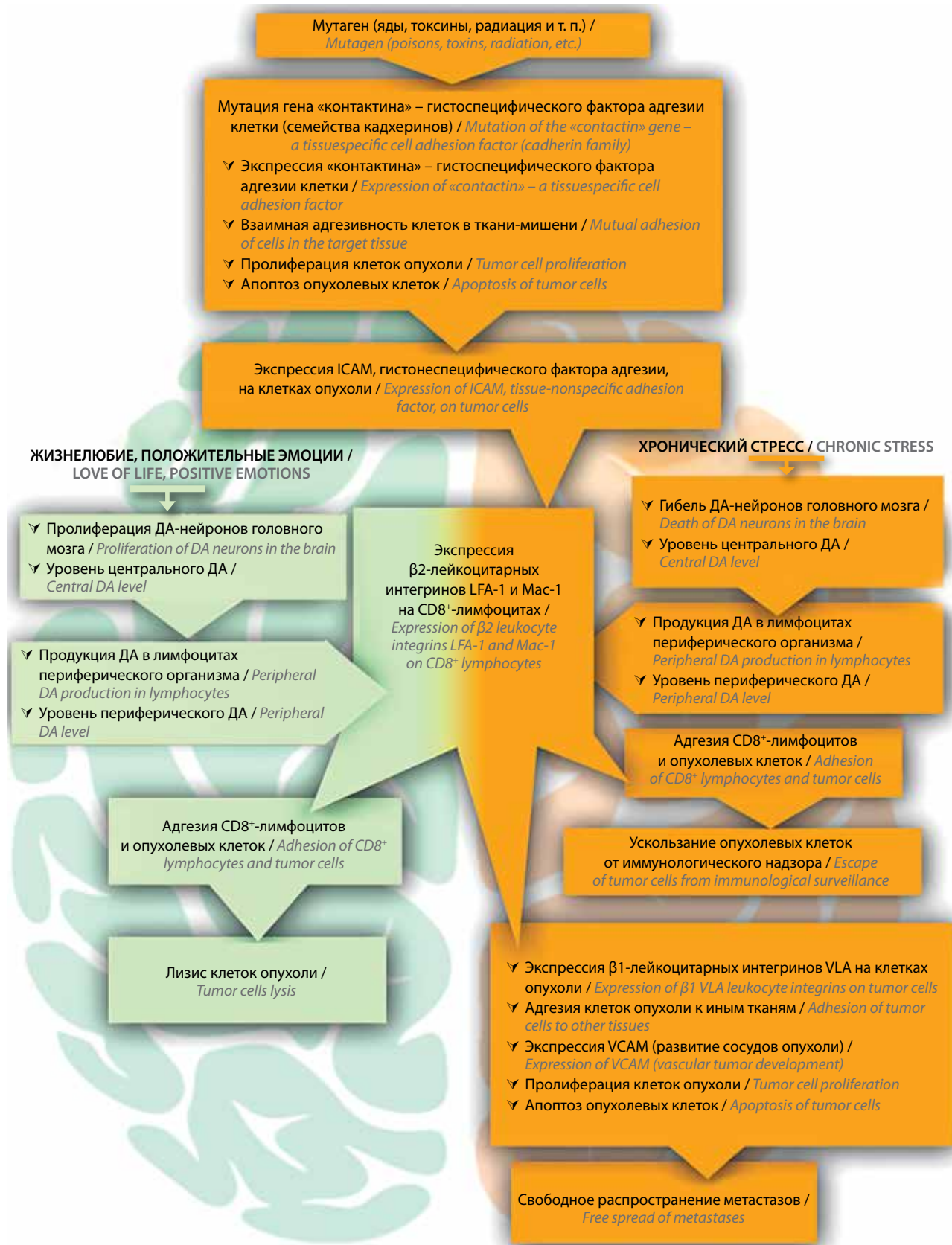


Рис. 2. Схема адгезионной концепции в биологии рака. Местные и центральные механизмы. ДА – дофамин; ДА-нейроны – дофаминергические нейроны
 Fig. 2. Diagram of the adhesion concept in cancer biology. Local and central mechanisms. DA – dopamine; DA neurons – dopaminergic neurons

выводом наших рассуждений может быть ответ на ранее поставленный вопрос о деталях механизма, приводящего к развитию злокачественного новообразования в результате хронического стресса.

И наконец, существенным, если не главным выводом является то, что реализация изложенных под-

ходов адгезионной концепции местного и центрального контроля роста опухолей создает перспективу для повышения эффективности диагностики, профилактики и лечения. Все это может стать еще одним шагом к решению проблемы злокачественных новообразований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бочарова О.А., Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г. и др. Дофаминергическая система: стресс, депрессия, рак (часть 1). Российский биотерапевтический журнал 2019;18(3):6–14. [Bocharova O.A., Bocharov E.V., Kucheryanu V.G. et al. Dopaminergic system: stress, depression, cancer (part 1). *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2019;18(3):6–14. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-6-14.
2. Бочарова О.А., Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г. и др. Дофаминергическая система: стресс, депрессия, рак (часть 2). Российский биотерапевтический журнал 2019;18(4):25–33. [Bocharova O.A., Bocharov E.V., Kucheryanu V.G. Dopaminergic system: stress, depression, cancer (part 2). *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2019;18(4):25–33. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-25-33.
3. Rollo C.D. Dopamine and aging: intersecting facets. *Neurochem Res* 2009;34(4):601–29. DOI: 10.1007/s11064-008-9858-7.
4. Iversen S.D., Iversen L.L. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci* 2007;30(5):188–93. DOI: 10.1016/j.tins.2007.03.002.
5. Bjorklund A., Dunnet S.B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 2007;30(5):194–202. DOI: 10.1016/j.tins.2007.03.006.
6. Rangel-Barajas C., Coronel I., Floran B. Dopamine receptors and neurodegeneration. *Aging Dis* 2015;6(5):349–68. DOI: 10.14336/AD.2015.0330.
7. Gibb W.R., Lees A.J. Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991;54(5):388–96.
8. Reeves S., Bench C., Howard R. Ageing and the nigrostriatal dopaminergic system. *Int J Geriatr Psychiatry* 2002;17(4):359–70. DOI: 10.1002/gps.606.
9. Bäckman L., Nyberg L., Lindenberger U. et al. The correlative triad among ageing, dopamine, and cognition: Current status and future prospects. *Neurosci Biobehav Rev* 2006;30(6):791–807. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2006.06.005.
10. Kubis N., Faucheux B.A., Ransmayr G. Preservation of midbrain catecholaminergic neurons in very old human subjects. *Brain* 2000;123(Pt 2):366–73. DOI: 10.1093/brain/123.2.366.
11. Porcelli S., Drago A., Fabbri C., Serretti A. Mechanisms of antidepressant action: an integrated dopaminergic perspective. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;35(7):1532–43. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2011.03.005.
12. Kim D.H., Li H., Yoo K.Y. Effects of fluoxetine on ischemic cells and expressions in BDNF and some antioxidants in the gerbil hippocampal CA1 region induced by transient ischemia. *Exp Neurol* 2007;204(2):748–58. DOI: 10.1016/j.expneurol.2007.01.008.
13. Lucassen P.J., Fuchs E., Czech B. Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biol Psychiatry* 2004;55(8):789–96. DOI: 10.1016/j.biopsych.2003.12.014.
14. Weaver I.C., Champagne F.A., Brown S.E. Reversal of maternal programming of stress responses in adult of spring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. *J Neurosci* 2005;25(47):11045–54. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3652-05.2005.
15. Aragona B.J., Liu Y., Yu Y.J. et al. Nucleus accumbens dopamine differentially mediates the formation and maintenance of monogamous pair bonds. *Nature Neurosci* 2006;9(1):133–9. DOI: 10.1038/nn1613.
16. Pittenger C., Duman R.S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 2008;33(1):88–109. DOI: 10.1038/sj.npp.1301574.
17. Chakraborty D., Sarkar C., Basu B. Catecholamines regulate tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2009;69(9):3727–30. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4289.
18. Moreno-Smith M., Lu C., Shahzad M.M. Dopamine blocks stress-mediated ovarian carcinoma growth. *Clin Cancer Res* 2011;17(11):3649–59. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2441.
19. Chakraborty D., Chowdhury U.R., Sarkar C. Dopamine regulates endothelial progenitor cell mobilization from mouse bone marrow in tumor vascularization. *J Clin Invest* 2008;118(4):1380–9. DOI: 10.1172/JCI33125.
20. Basu S., Sarkar C., Chakraborty D. et al. Ablation of peripheral dopaminergic nerves stimulates malignant tumor growth by inducing vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer Res* 2004;64(16):5551–5. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1600.
21. Sarkar C., Chakraborty D., Mitra R.B. Dopamine *in vivo* inhibits VEGF-induced phosphorylation of VEGFR-2, MAPK, and focal adhesion kinase in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(4):1554–60. DOI: 10.1152/ajpheart.00272.2004.
22. Basu S., Dasgupta P.S. Decreased dopamine receptor expression and its second-messenger AMP in malignant human colon tissue. *Dig Dis Sci* 1999;44(5):916–21.
23. Chakraborty D., Sarkar C., Mitra R.B. Depleted dopamine in gastric cancer tissues: dopamine treatment retards growth of gastric cancer by inhibiting angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2004;10(13):4349–56. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0059.
24. Wick M.M. The chemotherapy of malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 1983;80(1):61–2. DOI: 10.1038/jid.1983.16.
25. Sarkar C., Basu B., Chakraborty D. et al. The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain Behav Immun* 2010;24(4):525–8. DOI: 10.1016/j.bbi.2009.10.015.
26. Pacheco-López G., Niemi M.B., Kou W. Central catecholamin depletion inhibits peripheral lymphocyte responsiveness in spleen and blood. *J Neurochem* 2003;86(4):1024–31. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.01914.x.
27. Won S.J., Chuang Y.C., Huang W.T. Suppression of natural killer cell activity in mouse spleen lymphocytes by several dopamine receptor antagonists. *Experientia* 1995;51(4):343–8. DOI: 10.1007/BF01928892.

28. Magnini F., Sabbatini M., Capacchietti M. T-cell subpopulations express a different pattern of dopaminergic markers in intra- and extra-thymic compartments. *J Biol Regul Homeost Agents* 2013;27(2):463–75.
29. Альперина Е.Л., Бочаров Е.В., Бочарова О.А. и др. Актуальные проблемы нейроиммунопатологии: руководство. Под ред. Г.Н. Крыжановского, С.В. Магаевой, С.Г. Морозова. М.: Гениус-Медиа, 2012. С. 131–147. [Al'perina E.L., Bocharov E.V., Bocharova O.A. et al. Actual problems of neuroimmunopathology: a guid. Ed. by: G.N. Kryzhanovsky, S.V. Magaeva, S.G. Morozov. Moscow: Genius-media, 2012. Pp. 131–147 (In Russ.)].
30. Bocharov E.V., Kucheryanu V.G., Kryzhanovskii G.N. et al. Effect of phytoadaptogene complex on MFTP-induced parkinsonian syndrome in mice. *Bull Exp Biol Med* 2006;141(5):560–3. DOI: 10.1007/s10517-006-0220-2.
31. Papa I., Saliba D., Ponzoni M. et al. TFH-derived dopamine accelerates productive synapses in germinal centres. *Nature* 2017;547(7663):318–23. DOI: 10.1038/nature23013.
32. Herrera-Rincon C., Paré J.-F., Martyniuk C.J. et al. An *in vivo* brain-bacteria interface: the developing brain as a key regulator of innate immunity. *NPJ Regenerative Medicine* 2020;5(2):1–18. DOI: 10.1038/s41536-020-0087-2.
33. Schiller M., Ben-Shaanan T.L., Rolls A. Neuronal regulation of immunity: why, how and where? *Nat Rev Immunol* 2021;21(1):20–36. DOI: 10.1038/s41577-020-0387-1.
34. Девойно Л.В., Идова Г.В., Альперина Е.Л. Нейромедиаторные системы мозга в модуляции иммунной реакции (дофамин, серотонин, ГАМК). *Нейроиммунология* 2005;3(1):11–8. [Devoino L.V., Idova G.V., Alperina E.L. Neurotransmitter systems of the brain in modulating the immune response (dopamine, serotonin, GABA). *Neyroimmunologiya = Neuroimmunology* 2005;3(1):11–8 (In Russ.)].
35. Beatty P.L., Cascio S., Lutz E. Tumor immunology: basic and clinical advances. *Cancer Res* 2011;71(13):4338–43. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0717.
36. Van der Horst P.H., Wang Y., Vandenput I. et al. Progesterone inhibits epithelial-to-mesenchymal transition in endometrial cancer. *PLoS One* 2012;7(1):e30840. DOI: 10.1371/journal.pone.0030840.
37. Wu R.C., Liu S., Chacon J.A. Detection and characterization of a novel subset of CD8⁺CD57⁺ T cells in metastatic melanoma with an incompletely differentiated phenotype. *Clin Cancer Res* 2012;18(9):2465–77. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2034.
38. Zhang G., Xu Y., Zhou H. The Infiltration of ICOS⁺ Cells in Nasopharyngeal Carcinoma is Beneficial for Improved Prognosis. *Pathol Oncol Res* 2020;26(1):365–70. DOI: 10.1007/s12253-018-0509-2.

Благодарность. Авторы выражают благодарность академику Р.М. Хайтову, профессору В.М. Бухману и доктору медицинских наук В.И. Новикову за критическое прочтение рукописи и ценные замечания.

Acknowledgement. The authors express their gratitude to Academician P.M. Khaitov, Professor V.M. Bukhman and MD, PhD V.I. Novikov for their critical reading of the manuscript and valuable comments.

Вклад авторов

О.А. Бочарова: разработка дизайна обзора, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

В.Б. Матвеев, В.Г. Кучеряну: разработка дизайна обзора, обзор публикаций по теме статьи;

Е.В. Бочаров: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

Р.В. Карпова: обзор публикаций по теме статьи, редактирование рукописи.

Authors contributions

O.A. Bocharova: developing the review design, reviewing of publications of the article's theme, writing the text of the article;

V.B. Matveev, V.G. Kucheryanu: developing the review design, reviewing of publications of the article's theme;

E.V. Bocharov: reviewing of publications of the article's theme, writing the text of the article;

R.V. Karpova: reviewing of publications of the article's theme, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.А. Бочарова / O.A. Bocharova: <https://orcid.org/0000-0002-6365-2888>

В.Б. Матвеев / V.B. Matveev: <https://orcid.org/0000-0001-7748-9527>

Е.В. Бочаров / E.V. Bocharov: <https://orcid.org/0000-0003-2342-9881>

Р.В. Карпова / R.V. Karpova: <https://orcid.org/0000-0003-4893-1472>

В.Г. Кучеряну / V.G. Kucheryanu: <https://orcid.org/0000-0002-5071-3581>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 26.05.2021. Принята к публикации: 01.10.2021.

Article submitted: 26.05.2021. Accepted for publication: 01.10.2021.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-4-51-58>

Влияние Poly(I:C) и меланомы B16-F10 на иммунофенотип клеток селезенки мышей

А.В. Пономарев, А.А. Рудакова, З.А. Соколова, М.А. Барышникова, В.С. Косоруков

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

Контакты: Александр Васильевич Пономарев kl8546@yandex.ru

Введение. Известно, что агонист TLR-3 Poly(I:C), используемый в качестве адъюванта в ряде моделей противоопухолевых вакцин, вызывает торможение роста меланомы B16, однако недостаточно полно изучены иммунологические аспекты, вовлеченные в этот процесс.

Цель исследования – оценка изменений иммунофенотипа клеток селезенки мышей C57BL/6, вызванных опухолевой нагрузкой и/или Poly(I:C), для лучшего понимания процессов, происходящих при торможении роста меланомы B16-F10 под воздействием Poly(I:C).

Материалы и методы. С помощью проточной цитометрии исследовали иммунофенотип спленоцитов мышей C57BL/6: 1-я группа – контроль (интактные животные), 2-я группа – мыши с подкожно перевитой меланомой B16-F10, 3-я группа – мыши без опухоли, получавшие Poly(I:C), и 4-я группа – мыши с подкожно перевитой меланомой B16-F10, получавшие Poly(I:C).

Результаты. Медианы значений таких параметров, как иммунорегуляторный индекс CD4/CD8, количество CD69⁺ Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺, количество В- и NK-клеток для группы мышей с меланомой, получавших Poly(I:C), находятся между значениями указанных параметров в контрольной группе и в группе мышей с B16-F10. При сравнении показателей количество В- и NK-клеток, количество CD69⁺ Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺, их медианы в группе мышей с меланомой, получавших Poly(I:C), оказались ближе к контролю, чем к значениям, полученным в группе B16-F10 и в группе здоровых мышей, получивших Poly(I:C). В то же время нами обнаружено, что общее количество CD3⁺-клеток, количество наивных Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ выше в группе мышей с меланомой, получавших Poly(I:C), по сравнению со всеми остальными группами.

Заключение. Выявлены параметры иммунофенотипа клеток селезенки мышей (CD4/CD8, количество CD69⁺ Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺, количество В- и NK-клеток), на которые влияют опухолевая нагрузка и/или введение адъюванта Poly(I:C). Изменения иммунофенотипа спленоцитов мышей связаны с наличием опухоли и ее размерами. Также обнаружено, что на иммунофенотип спленоцитов оказывает влияние многократное введение Poly(I:C) во время роста опухоли.

Ключевые слова: Poly(I:C), иммунофенотипирование, клетки селезенки, меланома B16-F10

Для цитирования: Пономарев А.В., Рудакова А.А., Соколова З.А. и др. Влияние Poly(I:C) и меланомы B16-F10 на иммунофенотип клеток селезенки мышей. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(4):51–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-51-58.

Effect of Poly(I:C) and melanoma B16-F10 on the immunophenotype of murine spleen cells

Aleksandr V. Ponomarev, Anna A. Rudakova, Zinaida A. Sokolova, Maria A. Baryshnikova, Vyacheslav S. Kosorukov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Contacts: Aleksandr Vasilyevich Ponomarev kl8546@yandex.ru

Introduction. It is known that the agonist of TLR-3 Poly(I:C), used as an adjuvant in a number of models of antitumor vaccines, causes inhibition of melanoma B16 growth, but the immunological aspects involved in this process have not been fully studied.

The aim of the study was to evaluate changes of the immunophenotype of the spleen cells of C57BL/6 mice caused by the tumor load and/or Poly(I:C), which is necessary for better understanding of the processes occurring during Poly(I:C) inhibition of melanoma B16-F10.

Materials and methods. The immunophenotype of splenocytes of C57BL/6 mice was studied by flow cytometry as follows: the group 1 was a control (intact animals), the group 2 was mice with subcutaneously transplanted melanoma B16-F10, the group 3 was mice without a tumor treated with Poly(I:C) and the group 4 – mice with subcutaneously transplanted melanoma B16-F10 treated with Poly(I:C).

Results. Median values of parameters such as the CD4/CD8 immunoregulatory index, the percentage of CD69⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells, the number of B and NK cells for the group of mice with melanoma treated with Poly(I:C) were between the values in the control group and in the group of mice with B16-F10. When comparing the results, the number of B and NK cells, the percentage of CD69⁺ on CD4⁺ and CD8⁺ T cells, their median in the group of mice with melanoma treated with Poly(I:C) was closer to the control than to the values obtained in the B16-F10 group and in the group of healthy mice receiving Poly(I:C). At the same time, we found that the total number of CD3⁺ cells, the number of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells was higher in the group of mice with melanoma treated with Poly(I:C) compared to all other groups.

Conclusion. The analysis revealed the changes of the immunophenotype of murine spleen cells (CD4/CD8, the percentage of CD69⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells, the number of B and NK cells), which were affected by the tumor load and/or the administration of Poly adjuvant (I:C). Changes in the immunophenotype of murine splenocytes were associated with the tumor load and its size. It was also found that the splenocyte immunophenotype was affected by the repeated administration of Poly(I:C) during the tumor growth.

Key words: Poly(I:C), immunophenotyping, spleen cells, melanoma B16-F10

For citation: Ponomarev A.V., Rudakova A.A., Sokolova Z.A. et al. Effect of Poly(I:C) and melanoma B16-F10 on the immunophenotype of murine spleen cells. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(4):51–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-51-58.

Введение

Применение терапевтических противоопухолевых вакцин — один из перспективных подходов к лечению злокачественных новообразований, который использует иммунную систему для распознавания и уничтожения опухолевых клеток. Важными компонентами, обеспечивающими эффективность противоопухолевых вакцин, являются адъюванты, которые усиливают иммуногенность вакцинных антигенов за счет стимуляции врожденного иммунного ответа, что приводит к развитию адаптивного иммунного ответа против опухоли. Одним из таких адъювантов является Poly(I:C) — полирибоинозин-полирибонитидиловая кислота (polyriboinosinic-polyribocytidylic acid), синтетический имитатор полимеров вирусной двуцепочечной РНК.

В литературе достаточно подробно описан феномен торможения роста меланомы мышей B16 под воздействием Poly(I:C) [1, 2]. Данное явление было отмечено и в нашем исследовании противоопухолевой эффективности модели противомеланомной неантигенной вакцины [3]. Известно, что на опухолевых клетках меланомы B16 слабо экспрессируется молекула МНС класса I [4], поэтому вклад Т-клеток в замедление роста опухоли под влиянием Poly(I:C) не очень существенный [1]. В то же время значителен вклад NK-клеток. Это связано как с цитотоксической активностью NK-клеток [1], так и с выработкой NK-клетками интерферона γ , который оказался способен напрямую ингибировать пролиферацию клеток меланомы B16 [2]. Чтобы лучше понимать иммунные процессы, происходящие при феномене торможения роста меланомы B16 под воздействием Poly(I:C), мы

изучили изменения иммунофенотипа клеток селезенки мышей.

Цель исследования — оценка изменений иммунофенотипа селезенки мышей C57BL/6, вызванных опухолевой нагрузкой и/или Poly(I:C), для лучшего понимания процессов, происходящих при торможении роста меланомы B16-F10 под воздействием Poly(I:C).

В работе оценивали такие иммунологические параметры, как количество CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток и отношение CD4/CD8 (иммунорегуляторный индекс) [5]. Также оценивали состояние дифференцировки CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток, которое определяется экспрессией CD44 и CD62L. Наивные CD8⁺-Т-клетки (Tn) имеют фенотип CD44⁺CD62L⁺. После инфицирования или иммунизации на антиген-активированных CD8⁺-Т-клетках повышается экспрессия CD44 и теряется CD62L, такие клетки становятся эффекторными Т-клетками (Teff). После разрешения инфекции популяция клеток CD8-Teff сокращается и начинают формироваться популяции клеток памяти. CD8⁺-Т-клетки часто определяют как Т-клетки центральной памяти (Tcm) CD44⁺CD62L⁺ и Т-клетки эффекторной памяти (Tem) CD44⁺CD62L⁺. Для CD4⁺-Т-клеток состояние дифференцировки определяется схожим образом, но с помощью проточной цитометрии отчетливо выделяются только 2 популяции — это Tn и Tem [6]. CD69 — ранний маркер активации лимфоцитов из-за его быстрого появления на поверхности плазматической мембраны после стимуляции [7]. В литературе отмечено, что CD69 связан с ингибированием противоопухолевого иммунного надзора [8]. Возможно, вклад в этот процесс

также вносит экспрессия CD69 на CD4⁺-Т-клетках, обладающих регуляторными функциями [9]. NKp46 (CD335) принадлежит к семейству рецепторов естественной цитотоксичности. Его экспрессия ограничена NK-клетками и субпопуляцией NKT-клеток. NKp46 считается одним из маркеров NK-клеток мыши [10]. CD19 — член суперсемейства иммуноглобулинов. Он экспрессируется на предшественниках и зрелых В-клетках, является маркером В-клеток у мышей. Плазматические клетки не экспрессируют CD19. CD3 является маркером Т-клеток [6].

Материалы и методы

В исследовании использовали мышей-самцов C57BL/6 одного возраста массой 20–22 г, полученных из экспериментально-биологической лаборатории (вивария) ФГБУ «Национальный исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Животных разделили на 4 группы:

- 1-я группа (контроль) — интактные мыши ($n = 6$);
- 2-я группа — мыши с подкожно перевитой меланомой B16-F10 ($n = 5$);
- 3-я группа — мыши без опухоли, которые получали Poly(I:C) (Sigma) подкожно в дозе 50 мкг в 300 мкл физиологического раствора 6-кратно с интервалом 3 сут ($n = 5$);
- 4-я группа — мыши с подкожно перевитой меланомой B16-F10, которые получали Poly(I:C) (Sigma) подкожно в дозе 50 мкг в 300 мкл физиологического раствора 6-кратно с интервалом 3 сут; 1-е введение Poly (I:C) было на 1-е сутки после перевивки опухоли ($n = 6$).

Мышам во 2-й и 4-й группах перевивали меланому B16-F10 подкожно по 75 тыс. клеток/мышь.

Через 19 дней после начала эксперимента мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации и забирали у них селезенку. Спленоциты осторожно выделяли из стромы органа с помощью отдельного стерильного стеклянного гомогенизатора, клеточную суспензию фильтровали через 8 слоев марли и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 7 мин в фосфатно-солевом буфере, после чего еще раз фильтровали через стерильный одноразовый фильтр для очистки клеточной суспензии (Filcons, BD Biosciences) и подсчитывали количество клеток в камере Горяева. В полученной клеточной суспензии проводили гипотонический лизис эритроцитов, окрашивали клетки красителем жизнеспособности Fixable Viability Stain 510 (FVS510) (BD Biosciences) в соответствии с рекомендациями производителя, затем клетки отмывали и окрашивали антителами (табл. 1), инкубировали 30 мин в темноте, после чего отмывали в фосфатно-солевом буфере. Подсчет проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II с использованием программного обеспечения FACSDiva™

(Becton Dickinson). Погибшие клетки исключали из анализа по окрашиванию FVS510. Процент исследуемых клеток высчитывали от всех живых CD45⁺-клеток селезенки. Стратегия гейтирования представлена на рис. 1, 2.

Таблица 1. Антитела, применяемые в работе

Table 1. Antibodies used in the work

Название Name	Краситель Dye	Клон Clone	Производитель Manufacturer
NKp46 (CD335)	eFluor450	29A1.4	eBioscience
CD62L	eFluor450	MEL-14	eBioscience
CD45	PerCP-Cy5.5	30-F11	Biolegend
CD4	PE-Cy7	GK1.5	Biolegend
CD44	APC-Cy7	IM7	Biolegend
CD8	PE	53-6.7	Biolegend
CD8	FITC	53-6.7	Biolegend
CD69	PE	H1.2F3	Biolegend
CD19	FITC	6D5	Biolegend
CD3	PE	17A2	Biolegend
CD3	APC	17A2	Biolegend

Статистическая обработка полученных данных была выполнена с помощью программы Statistica 2.0 с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В табл. 2 представлены результаты иммунофенотипирования спленоцитов мышей C57BL/6.

При сравнении иммунофенотипа спленоцитов мышей 1-й (контрольной) группы и 2-й группы (с опухолью) обнаружен ряд отличий. Количество CD4⁺-Т-клеток значимо снижено во 2-й группе, при этом также понижен иммунорегуляторный индекс, что встречается при хронической антигенной стимуляции [5], но различие не является статистически значимым. Нами отмечено значимое повышение субпопуляции CD69-положительных CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток во 2-й группе по сравнению с контролем. В литературе имеются данные о повышении количества CD69-положительных CD4⁺-Т-клеток у мышей с опухолью B16 и отмечается, что это связано с иммуносупрессией [9]. Во 2-й группе нами отмечено значимое снижение количества наивных CD44⁺-CD62L⁺ Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ по сравнению с контролем, что также может свидетельствовать о хронической антигенной стимуляции. Кроме того,

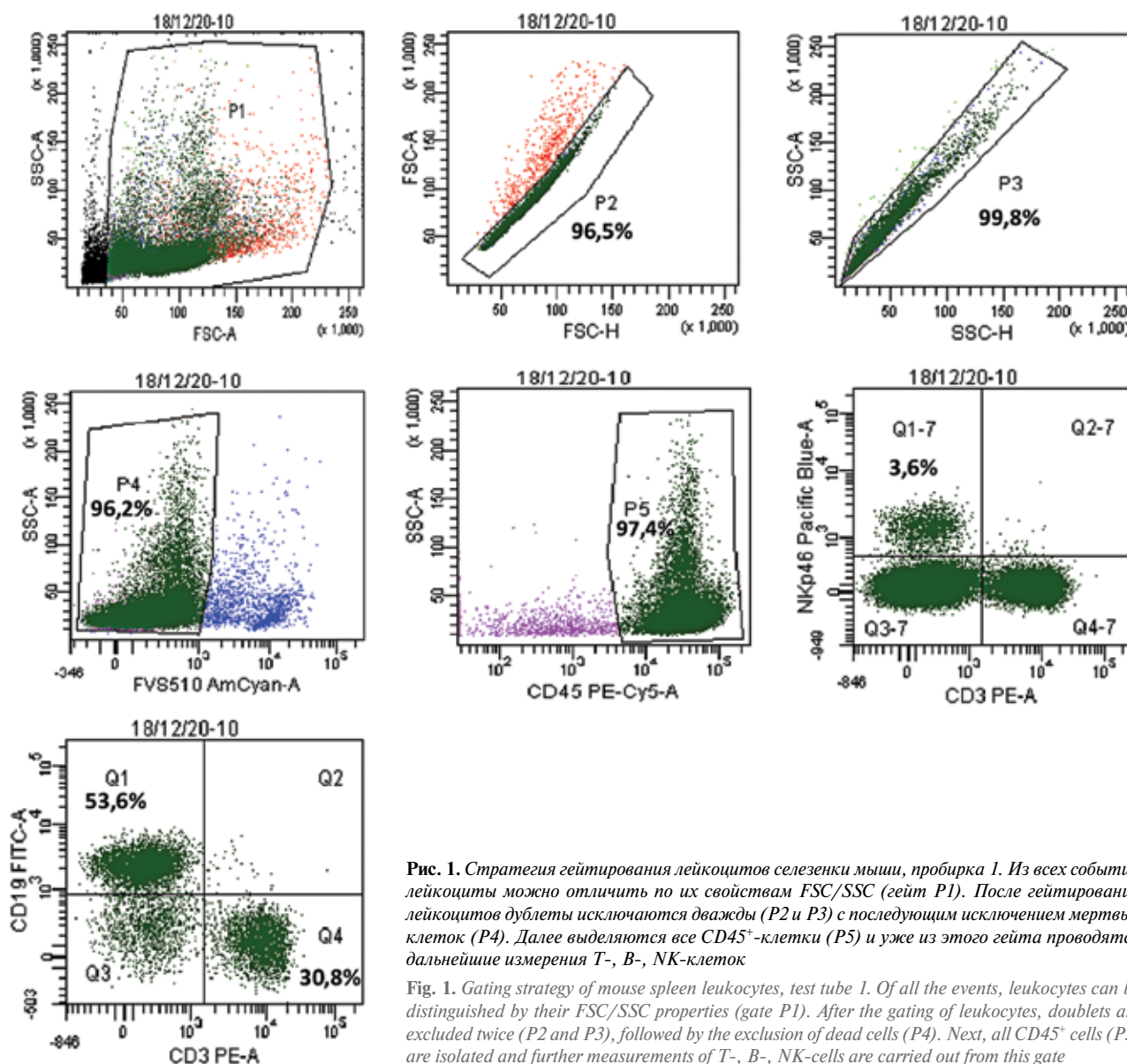


Рис. 1. Стратегия гейтирования лейкоцитов селезенки мыши, пробирка 1. Из всех событий лейкоциты можно отличить по их свойствам FSC/SSC (гейт P1). После гейтирования лейкоцитов дублиеты исключаются дважды (P2 и P3) с последующим исключением мертвых клеток (P4). Далее выделяются все CD45⁺-клетки (P5) и уже из этого гейта проводятся дальнейшие измерения T⁺, B⁺, NK-клеток

Fig. 1. Gating strategy of mouse spleen leukocytes, test tube 1. Of all the events, leukocytes can be distinguished by their FSC/SSC properties (gate P1). After the gating of leukocytes, doublets are excluded twice (P2 and P3), followed by the exclusion of dead cells (P4). Next, all CD45⁺ cells (P5) are isolated and further measurements of T⁺, B⁺, NK-cells are carried out from this gate

в группе с опухолью мы видим значимое повышение количества CD19⁺-В-клеток по сравнению с контролем. По данным литературы, не было отмечено значимой разницы для CD19⁺-В-клеток в селезенке здоровых мышей и с меланомой B16 [11]. Возможно, это расхождение связано с отличиями в количестве перевиваемых опухолевых клеток. В работе [11] отмечено значимое снижение CD3⁺-клеток в селезенке мышей с опухолью. Нами также отмечено снижение количества CD3⁺-клеток в группе с опухолью по сравнению с контролем, но данное снижение не было статистически значимым. По данным литературы, количество NK-клеток в селезенке мышей после введения меланомы B16 меняется с течением времени. S. Paul и соавт. обнаружили увеличение субпопуляции NK-клеток в селезенке на 5-й день после введения

B16 по сравнению с селезенкой интактной мыши и возвращение к исходным уровням, как и в селезенке интактной мыши, на 13-й день [12]. Нами обнаружено статистически значимое снижение количества NK-клеток в селезенке мышей с выраженной опухолью. G. Isvoranu и соавт. также отметили существенное снижение количества NK-клеток в селезенке мышей с меланомой B16 [13].

При сравнении иммунофенотипа спленоцитов мышей контрольной группы и группы без опухоли, получавшей Poly(I:C) (3-я группа), показано отсутствие значимых различий для количества CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток и показателя CD4/CD8, при этом отмечается незначительное снижение иммунорегуляторного индекса после введения препарата (см. табл. 2). Нами отмечено статистически значимое

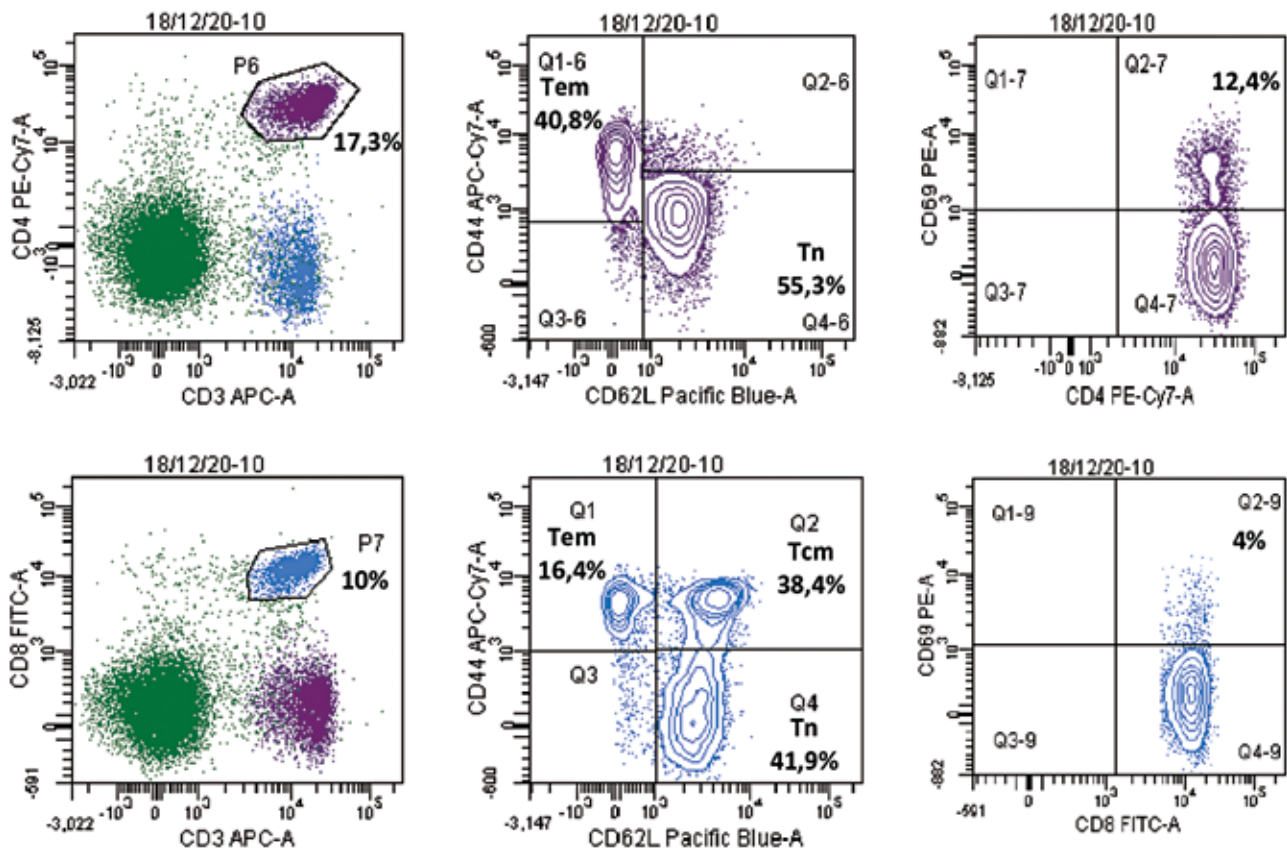


Рис. 2. Стратегия гейтирования лейкоцитов селезенки мыши, пробирка 2. Выделение $CD45^+$ -клеток и исключение мертвых клеток с дублетами, как описано на рис. 1. Далее выделяются $CD4^+$ -Т-клетки (P6) и среди них определяются $CD69^+$ -клетки, а также Tn и Tem. Среди $CD8^+$ -Т-клеток (P7) определяются $CD69^+$ -клетки, а также Tn, Tcm, Tem

Fig. 2. Gating strategy of mouse spleen leukocytes, test tube 2. The isolation of $CD45^+$ cells and the exclusion of dead cells with doublets is similar to Fig. 1. Next, $CD4^+$ T cells (P6) are isolated and $CD69^+$ cells, as well as Tn and Tem are determined among them. $CD69^+$ cells, as well as Tn, Tcm, and Tem are identified among $CD8^+$ T cells (P7)

повышение количества $CD69$ -положительных $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-клеток в 3-й группе по сравнению с контролем. Из литературы известно о способности Poly(I:C) индуцировать экспрессию $CD69$ на поверхности $CD4^+$ -Т-клеток [14]. Нами отмечено значимое повышение количества клеток $CD4^+$ -Tem и $CD8^+$ -Tcm в 3-й группе по сравнению с контролем. В литературе есть данные, что введение мышам Poly(I:C) через 12 ч приводит к снижению количества Т-клеток памяти в селезенке [15], но показано, что через сутки или более Poly(I:C) стимулирует пролиферацию $CD44^+$ $CD8^+$ -Т-клеток памяти [16]. Также есть данные, что через несколько дней процент $CD8^+$ -Т-клеток памяти в крови мышей начинает превышать значения нормы [17]. Нами не отмечено статистически значимых различий для параметров $CD19$ и $CD3$. При этом отмечено значимое снижение количества НК-клеток после воздействия Poly(I:C) по сравнению с контролем. Можно отметить, что количество НК-клеток в 3-й группе (Poly(I:C)) оказалось ниже, чем во всех остальных группах.

На основании сравнения изменений иммуннофенотипа между контрольной группой и 2-й или 3-й группами (для некоторых из них найдены подтверждения и обоснования в литературе) мы проанализировали результаты, полученные в 4-й группе, в которой мышам перевивали меланому и вводили Poly(I:C). Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что медианы таких параметров, как $CD4/CD8$, количество $CD69$ -положительных Т-клеток $CD4^+$ и $CD8^+$, $CD19$, NKp46, для 4-й группы находятся между значениями медиан группы контроля и 2-й группы (B16-F10). Это может свидетельствовать о торможении роста опухоли под воздействием адьюванта Poly(I:C). В 4-й группе к окончанию эксперимента у 3 мышей не выросли опухоли, а у остальных имели объем не более $0,5 \text{ см}^3$, тогда как у мышей во 2-й группе опухоли достигали объема 1 см^3 (рис. 3). Вероятно, опухоль меньших размеров оказывает более слабое влияние на иммунологические параметры.

Если сравнить показатели $CD4/CD8$, количество $CD69$ -положительных Т-клеток $CD4^+$ и $CD8^+$,

Таблица 2. Субпопуляции исследуемых клеток, медиана (min–max), %

Table 2. Subpopulations of the investigated cells, median (min–max), %

Антигены Antigens	1-я группа (контроль) Group 1 (control)	2-я группа (B16-F10) Group 2 (B16-F10)	3-я группа (Poly(I:C)) Group 3 (Poly(I:C))	4-я группа (B16-F10 + Poly(I:C)) Group 4 (B16-F10 + Poly(I:C))
CD4	18,9 (17–21,8)	14,9* (11,8–18,8)	16,8 (11,8–19,2)	19,7**, *** (17,1–21,1)
CD8	10,1 (8,7–11,4)	9,2 (8,1–11,6)	9,3 (9–12)	12,25*, **, *** (9,8–13,2)
CD4/CD8	1,89 (1,73–2,11)	1,51 (1,28–2,04)	1,78 (0,98–2,06)	1,67* (1,43–1,84)
CD69 на CD4 CD69 on CD4	12,1 (10,7–14,9)	16,2* (14,2–23,2)	17,3* (15–19,9)	13,9**, *** (10,5–15,7)
CD69 на CD8 CD69 on CD8	4,5 (4–5,3)	6,2* (5,3–7,5)	6,6* (5,6–11,5)	5,15*** (4,3–6,8)
Tn от CD4 Tn from CD4	55 (50,9–55,8)	49,3* (38,3–54,1)	51,8 (46,4–53,6)	61,35*, **, *** (57,5–65,4)
Tem от CD4 Tem from CD4	34,9 (34,2–38,8)	37,6 (35,9–51,5)	39,6* (38–43,9)	28,6*, **, *** (25,7–32,7)
Tn от CD8 Tn from CD8	41,55 (36,5–43,5)	35* (27,8–40)	39,6 (33,8–42,6)	44,05*, **, *** (42,2–53,4)
Tem от CD8 Tem from CD8	16,45 (14,6–22)	20,7 (13,1–25,1)	16 (15–18,5)	10,85*, **, *** (9,2–14,2)
Tcm от CD8 Tcm from CD8	38,1 (35,1–40,2)	41,5 (35–47,5)	40,3* (37,9–48,2)	39,7 (33,3–41,8)
CD19	51,5 (49,5–53,9)	55,7* (54,7–57,7)	54,4 (49,4–56,5)	52,3** (44,3–56,1)
CD3	32,75 (29,9–38,3)	30 (26,6–32,7)	30,2 (28,4–34,2)	36,2**, *** (31,2–38,8)
NK (NKp46)	3,35 (2,9–4,4)	2,8* (2,8–3,2)	2,7* (2,2–2,9)	2,95* (1,9–3,2)

*Различия показателей по сравнению с 1-й группой (контроль) статистически значимы ($p < 0,05$); **различия показателей по сравнению со 2-й группой (B16-F10) статистически значимы ($p < 0,05$); ***различия показателей по сравнению с 3-й группой (Poly(I:C)) статистически значимы ($p < 0,05$).

*Differences in indicators compared to the group 1 (control) are statistically significant ($p < 0.05$); **differences in indicators compared to the group 2 (B16-F10) are statistically significant ($p < 0.05$); ***differences in indicators compared to the group 3 (Poly(I:C)) are statistically significant ($p < 0.05$).

процент Tn от CD4⁺ и CD8⁺, то можно отметить, что в 3-й группе (Poly(I:C)) они выше, чем во 2-й группе (B16-F10). В связи с этим можно предположить, что Poly(I:C) оказывал более сильное влияние на активационный маркер CD69 по сравнению с воздействием, оказываемым опухолью. Но при этом не было такой антигенной стимуляции, как в случае опухоли, и процент Tn остался более высоким, чем в группе с опухолью.

Для 4-й группы (B16 + Poly(I:C)) вычисленное значение иммунорегуляторного индекса CD4/CD8 находится между более высоким значением – в 3-й группе (Poly(I:C)) и более низким значением – во 2-й группе (B16-F10) (см. табл. 2). Это может свидетельствовать о том, что меньший размер опухоли вызывает более слабую антигенную нагрузку и иммунорегуляторный индекс не понижается до значений 2-й группы за счет

влияния Poly(I:C). В 4-й группе количество CD19⁺-В-клеток и CD69-положительных Т-клеток ниже, чем в 3-й группе и во 2-й группе, но выше, чем в контрольной группе. То есть данные значения ближе к нормальному, чем в группе с опухолью и в группе с Poly(I:C). Количество NK-клеток в 4-й группе также оказалось ближе к контролю, чем в группе с опухолью и в группе с Poly(I:C). Такое приближение указанных выше параметров в 4-й группе к значениям в контрольной группе можно попытаться объяснить тем, что иммуноактивирующее влияние Poly(I:C) ослабевает под воздействием опухоли, за счет чего, например, становится меньше CD69-положительных Т-клеток. Но так как опухольевая нагрузка слабее, то и показатели становятся ближе к нормальным. В то же время нами обнаружено, что в 4-й группе общее количество CD3⁺-клеток и ко-

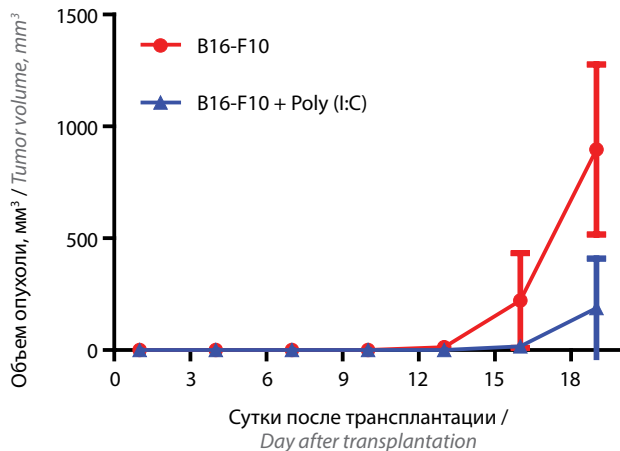


Рис. 3. Рост меланомы у мышей во 2-й группе (B16-F10 без препарата) и 4-й группе (B16-F10 с Poly (I:C))

Fig. 3. Melanoma growth in mice in group 2 (B16-F10 without the drug) and group 4 (B16-F10 with Poly (I:C))

личество Tn CD4⁺ и CD8⁺ оказалось выше, чем в остальных группах. Этот результат является достаточно необычным. Можно предположить, что повышение количества Tn под действием Poly(I:C) может дать преимущество в борьбе иммунитета против Т-зависимых опухолей, иммунный надзор за которыми в большей степени осуществляется Т-клетками. Меланома B16, как известно, является НК-зависимой опухолью [1]. Например, имеются данные, что Poly(I:C) способствовал усилению местного Т-клеточного ответа на мышинной модели опухоли 4T1-Luc [18].

Заключение

При изучении влияния опухолевой нагрузки клетками меланомы B16-F10, а также 6-кратного введения адъюванта Poly(I:C) в сочетании с опухолевой нагрузкой и без нее на иммунофенотип спленоцитов мышей выявлен ряд отличий, которые оказались статистически значимы, и часть из которых также подтверждается данными литературы. В группе мышей с меланомой B16-F10, получавших Poly(I:C), обнаружен ряд параметров, медиана которых оказалась в промежутке между значениями для групп контроля и B16-F10, не получавшей Poly(I:C). Можно предположить, что опухоль меньших размеров оказывает более слабое влияние на эти иммунологические параметры. В группе мышей с меланомой B16-F10, получавших Poly(I:C), кроме того, обнаружен ряд параметров, медиана которых оказалась ближе к контролю, чем к значениям во 2-й группе (B16-F10) и в группе здоровых мышей, получавших Poly(I:C). Вероятно, иммуноактивирующее влияние Poly(I:C) ослабевает под воздействием опухоли, но так как опухолевая нагрузка меньше в 4-й группе, то и показатели становятся ближе к нормальным. Обнаружен необычный результат – общее количество CD3⁺-клеток и количество наивных Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ в группе с меланомой B16-F10, получавших Poly(I:C), выше по сравнению с остальными тремя группами, что может дать преимущество в борьбе иммунитета против Т-зависимых опухолей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Akazawa T., Ebihara T., Okuno M. et al. Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor 3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(1):252–7. DOI: 10.1073/pnas.0605978104.
- Shime H., Kojima A., Maruyama A. et al. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic: polycytidylic acid treatment in mouse tumor models. *J Innate Immun* 2014;6(3):293–305. DOI: 10.1159/000355126.
- Барышникова М.А., Рудакова А.А., Соколова З.С. и др. Оценка противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов для модели противомеланомной вакцины. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(4):76–81. [Baryshnikova M.A., Rudakova A.A., Sokolova Z.A. et al. Evaluation of the antitumor efficacy of synthetic neoantigen peptides for the melanoma vaccine model. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2019;18(4):76–81. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-76-81.
- Seliger B., Wollscheid U., Momburg F. et al. Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells. *Cancer Res* 2001;61(3):1095–9. PMID: 11221838.
- Myrick C., DiGuisto R., DeWolfe J. et al. Linkage analysis of variations in CD4:CD8 T cell subsets between C57BL/6 and DBA/2. *Genes Immun* 2002;3(3):144–50. DOI: 10.1038/sj.gene.6363819.
- Cossarizza A., Chang H-D., Radbruch A. et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol* 2019;49(10):1457–1973. DOI: 10.1002/eji.201970107.
- Cibrián D., Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol* 2017; 47(6): 946–53. DOI: 10.1002/eji.201646837.
- Esplugues E., Sancho D., Vèga-Ramos J. et al. Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69. *J Exp Med* 2003;197(9):1093–106. DOI: 10.1084/jem.20021337.
- Han Y., Guo Q., Zhang M. et al. CD69⁺ CD4⁺ CD25⁺ T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* 2009;182(1):111–20. DOI: 10.4049/jimmunol.182.1.111.
- Walzer T., Bléry M., Chaix J. et al. Identification, activation, and selective *in vivo* ablation of mouse NK cells via

- NKp46. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104(9):3384–9. DOI: 10.1073/pnas.0609692104.
11. Kamran N., Li Y., Sierra M. et al. Melanoma induced immunosuppression is mediated by hematopoietic dysregulation. Oncoimmunology 2017;7(3):e1408750. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1408750.
 12. Paul S., Kulkarni N., Shilpi, Lal G. Intratumoral natural killer cells show reduced effector and cytolytic properties and control the differentiation of effector Th1 cells. Oncoimmunology 2016;5(12):e1235106. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1235106.
 13. Isvoranu G., Surcel M., Huica R. et al. Natural killer cell monitoring in cutaneous melanoma – new dynamic biomarker. Oncol Lett 2019;17(5):4197–206. DOI: 10.3892/ol.2019.10069.
 14. Radulovic K., Manta C., Rossini V. et al. CD69 regulates type I IFN-induced tolerogenic signals to mucosal CD4 T cells that attenuate their colitogenic potential. J Immunol 2012;188(4):2001–13. DOI: 10.4049/jimmunol.1100765.
 15. Bahl K., Huebner A., Davis R., Welsh R. Analysis of apoptosis of memory T cells and dendritic cells during the early stages of viral infection or exposure to toll-like receptor agonists. J Virol 2010;84(10):4866–77. DOI: 10.1128/JVI.02571-09.
 16. Tough D., Borrow P., Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon *in vivo*. Science 1996;272(5270):1947–50. DOI: 10.1126/science.272.5270.1947.
 17. Koschella M., Voehringer D., Pircher H. CD40 ligation *in vivo* induces bystander proliferation of memory phenotype CD8 T cells. J Immunol 2004;172(8):4804–11. DOI: 10.4049/jimmunol.172.8.4804.
 18. Forghani P., Waller E. Poly(I:C) modulates the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells in a murine model of breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2015;153(1):21–30. DOI: 10.1007/s10549-015-3508-y.

Вклад авторов

A.B. Пономарев, М.А. Барышникова: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи, редактирование рукописи;

A.A. Рудакова: предоставление материалов исследования, сбор и обработка данных, редактирование рукописи;

Z.A. Соколова: предоставление материалов исследования, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи;

B.C. Косоруков: концепция и дизайн, редактирование рукописи.

Author's contributions:

A.V. Ponomarev, M.A. Baryshnikova: concept and design, data analysis and interpretation, article writing the text of the manuscript, editing of the article;

A.A. Rudakova: provision of study materials, data collection and processing, editing of the article;

Z.A. Sokolova: provision of study materials, data collection and processing, data analysis and interpretation, editing of the article;

V.S. Kosorukov: concept and design, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

A.B. Пономарев / A.V. Ponomarev: <https://orcid.org/0000-0001-9517-8183>

A.A. Рудакова / A.A. Rudakova: <https://orcid.org/0000-0001-7266-7689>

Z.A. Соколова / Z.A. Sokolova: <https://orcid.org/0000-0003-4755-5313>

M.A. Барышникова / M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

B.C. Косоруков / V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения России в рамках исследования № АААА-А20-120022090056-5.

Financing. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of the research No AAA-A20-120022090056-5.

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.

Statement of the welfare of animals. The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Research and Other Scientific Purposes.

Статья поступила: 05.08.2021. Принята к публикации: 01.10.2021.

Article received: 05.08.2021. Accepted for publication: 01.10.2021.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-4-59-65>

Протективная активность смесей пневмококковых антигенов при инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3

Д.С. Воробьев^{1,2}, М.М. Токарская¹, С.А. Барановская¹, Е.А. Стефутушкина^{1,2}, О.М. Афанасьева¹, Е.А. Асташкина¹, О.В. Жигунова¹, Ю.В. Волох¹, А.Ю. Леонова¹, Е.С. Петухова¹, И.Б. Семенова¹, Д.Н. Нечаев², Е.О. Кравцова², Н.Н. Овечко¹, Н.Е. Ястребова¹, И.М. Грубер¹, Н.А. Михайлова¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5а;

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Денис Сергеевич Воробьев vorobievdennis@yandex.ru

Введение. Пневмококковые заболевания сохраняют актуальность для всего мира. С одной стороны, это обусловлено высокой распространенностью пневмококка, а с другой – ростом антибиотикорезистентных штаммов и постоянной сменой клинически значимых серотипов возбудителя.

Цель исследования – изучение протективной активности смеси пневмококковых антигенов.

Материалы и методы. Для выполнения работы использовали препараты капсульного полисахарида (КПС) пневмококка серотипа 3; белоксодержащую фракцию (БСФ), полученную из водного экстракта клеток *Streptococcus pneumoniae* серотипа 6В; рекомбинантный пневмолизин (rPly). Мышей иммунизировали внутривентриально двукратно с интервалом 14 дней смесями бактериальных антигенов: КПС + БСФ; КПС + rPly; БСФ + rPly. Для оценки протективной активности исследуемых препаратов животных после двукратной иммунизации заражали внутривентриально *S. pneumoniae* серотипа 3. Для изучения влияния смесей бактериальных препаратов на инфекционный процесс в легких иммунизированных мышей интраназально заражали штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3. Гуморальный иммунный ответ изучали с помощью определения IgG-антител методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Результаты. Смесь КПС + rPly защищала мышей от внутривентриального заражения пневмококком серотипа 3 независимо от заражающей дозы. Иммунизация смесями КПС + БСФ или КПС + rPly влияла на достоверное уменьшение количества высеваемых бактериальных клеток из легких в течение всего периода наблюдения (72 ч) по сравнению с контролем. Введение животным смесей бактериальных антигенов КПС + БСФ, КПС + rPly или БСФ + rPly приводило к достоверному повышению уровня антител ко всем антигенам, однако наиболее высокие уровни IgG-антител определяли к БСФ и rPly.

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить, что разные антигенные препараты в смесях влияют на различные механизмы активации иммунитета.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, капсульный полисахарид, белоксодержащая фракция, рекомбинантный пневмолизин, смеси антигенных препаратов

Для цитирования: Воробьев Д.С., Токарская М.М., Барановская С.А. и др. Протективная активность смесей пневмококковых антигенов при инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(4):59–65. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-59-65.

Protective activity of mixtures of pneumococcal antigens in infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3

Denis S. Vorobyev^{1,2}, Marina M. Tokarskaya¹, Sofia A. Baranovskaya¹, Elena A. Stefutushkina^{1,2}, Olga M. Afanasyeva¹, Elena A. Astashkina¹, Olga V. Zhigunova¹, Yuri V. Volokh¹, Anna Yu. Leonova¹, Ekaterina S. Petukhova¹, Inna B. Semenova¹, Dmitriy N. Nechaev², Elena O. Kravtsova², Nikolay N. Ovechko¹, Natalia E. Yastrebova¹, Irina M. Gruber¹, Natalia A. Mikhailova¹

¹I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; 5a Maly Kazenny per., 105064 Moscow, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Bld. 2, 8 Trubetskaya St., 119991 Moscow, Russia

Contacts: Denis Sergeevich Vorobyev vorobievdenis@yandex.ru

Introduction. Pneumococcal diseases remain relevant for the whole world. On the one hand, this is due to the high prevalence of pneumococcus and the other hand, the growth of antibiotic-resistant strains and the constant change of clinically significant serotypes of the pathogen.

The aim of the research was to study of the protective activity of a mixture of pneumococcal antigens.

Material and methods. We used preparations of a capsular polysaccharide (CPS) obtained from *Streptococcus pneumoniae* serotype 3; protein-containing fraction (PCF) obtained from an aqueous extract of cells of *S. pneumoniae* serotype 6B; recombinant pneumolysin (rPly). Mice were immunized intraperitoneally twice with an interval of 14 days with mixtures of bacterial antigens: CPS + PCF; CPS + rPly; PCF + rPly. To assess the protective activity of the studied drugs after double immunization animals were infected intraperitoneally with *S. pneumoniae* serotype 3. To study the effect of mixtures of bacterial preparations on the infectious process in the lungs immunized mice were infected with *S. pneumoniae* serotype 3. The humoral immune response was studied with IgG using the method of ELISA.

Results. The CPS + rPly mixture protected mice from intraperitoneal infection with *S. pneumoniae* serotype 3 regardless of the infecting dose. Immunization with CPS + PCF or CPS + rPly mixtures influenced a significant decrease the number of seeded bacterial cells from lungs during the entire observation period (72 h) compared to the control. Administration of mixtures of bacterial antigens of CPS + PCF, CPS + rPly or PCF + rPly to animals led to a significant increase of the level of antibodies to all antigens, however, the highest levels of IgG were determined to PCF and rPly.

Conclusion. The results obtained suggest that different antigenic drugs in mixtures affect different mechanisms of immunity activation.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, capsular polysaccharide, protein-containing fraction, recombinant pneumolysin, mixtures of antigenic drugs

For citation: Vorobyev D.S., Tokarskaya M.M., Baranovskaya S.A. et al. Protective activity of mixtures of pneumococcal antigens in infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(4):59–65. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-59-65.

Введение

Пневмококковые заболевания сохраняют актуальность для всего мира. *Streptococcus pneumoniae* является одним из ключевых бактериальных патогенов, вызывающих средний отит, внебольничную пневмонию, сепсис и менингит [1]. Необходимость разработки пневмококковых препаратов обусловлена постоянной сменой клинически значимых серотипов *S. pneumoniae*, а также ростом числа антибиотикорезистентных штаммов возбудителя [2–4]. В настоящее время в нашей стране используются зарубежные полисахаридные и конъюгированные пневмококковые вакцины [5]. С одной стороны, есть положительный опыт применения данных вакцин в Европе и Северной Америке [6], с другой стороны, реальная польза пневмококковых вакцин в Российской Федерации не так ясна, так как нет постоянного эпидемиологического мониторинга за пневмококковой инфекцией. Конъюгированные вакцины расширяют показания для их использования: дети младше 5 лет и пожилые люди старше 65 лет [7]. Однако сама технология конъюгирования является трудоемкой [8], что, на наш взгляд, значительно удорожает и усложняет производство таких вакцин. Все вышеперечисленное ограничивает возможности современных пневмококковых вакцин и делает востребованной разработку более доступных, но не менее эффективных пневмо-

кокковых вакцин. Многообещающей является разработка вакцин, состоящих из смеси протективных антигенов пневмококка: капсульного полисахарида и белков микроба. Ранее нами была изучена и показана перспективность применения нативных белоксодержащих антигенов пневмококка при заражении гомологичными и гетерологичными штаммами [9–13].

Цель исследования – изучение протективной активности смеси пневмококковых антигенов.

Материалы и методы

Мыши линии BALB/c, самцы массой 14–16 г, были получены из питомника ООО «СМК СТЕЗАР» (г. Владимир). Животных содержали в условиях вивария ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова). Все эксперименты на мышах проводили в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33217-2014).

Штаммы, использованные в работе: штамм № 10196 *S. pneumoniae* серотипа 3 (штамм депонирован под номером 316 в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России); штамм № 296 *S. pneumoniae* серотипа 6B.

Капсульный полисахарид (КПС) получали из *S. pneumoniae* серотипа 3, выращенного в полусинтетической

питательной среде. Этапы выделения включали: ультрафильтрацию и концентрирование, обработку ферментами, фенольную депротеинизацию и диализ. Белоксодержащую фракцию (БСФ) (30–100 кДа) получали при помощи фильтров Amicon Ultra из водного экстракта инактивированных ацетоном клеток *S. pneumoniae* серотипа 6В [13]. Рекомбинантный пневмолизин (rPly) предоставлен сотрудниками ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, для его получения было использовано оборудование центра коллективного пользования ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Для иммунизации мышей использовали смеси вышеуказанных препаратов в соответствующих дозах/мышь. Смесь 1: КПС (5 мкг) + БСФ (50 мкг); смесь 2: КПС (5 мкг) + rPly (25 мкг); смесь 3: БСФ (50 мкг) + rPly (25 мкг). Животных иммунизировали внутрибрюшинно двукратно с интервалом 14 дней. Разовую иммунизирующую дозу вводили в физиологическом растворе в объеме 0,5 мл. В качестве контрольной группы использовали intactных мышей, которым вводили физиологический раствор. Через 2 нед после последней иммунизации собирали индивидуальные мышиные сыворотки (в группе $n = 5$).

Для оценки гуморального иммунного ответа использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа. С целью получения иммуносорбентов лунки отдельных полистирольных пластин (Greiner, Германия) сорбировали каждым из препаратов: КПС, БСФ и rPly. Препараты растворяли в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,2–7,4 до концентрации 2 мкг/мл. Используя полученные иммуносорбенты, сыворотки животных анализировали согласно описанной методике [14]. Результаты выражали в условных единицах (J), рассчитанных по формуле:

$$J = \frac{ОП_{AC}}{ОП_{K-} + 0,25} \times 100,$$

где ОП_{AC} — оптическая плотность в лунке с анализируемой сывороткой, ОП_{K-} — оптическая плотность в лунке с отрицательной контрольной сывороткой. В качестве отрицательного контроля (K⁻) использовали сыворотки неиммунизированных мышей.

Для исследования протективной активности смесей препаратов иммунизированных мышей заражали внутрибрюшинно штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3 тремя дозами в диапазоне от 10³ до 10⁵ микробных клеток (м. кл.)/0,5 мл физиологического раствора через 14 дней после 2-й иммунизации. Все заражающие дозы были абсолютно летальными для мышей.

Для изучения влияния смесей препаратов на развитие инфекционного процесса иммунизированных

мышей интраназально заражали штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3 в дозе 10⁷ м. кл. в 10 мкл физиологического раствора. Контрольной группе вводили физиологический раствор. Количество животных для оценки высеваемости бактерий из легких равнялось 5 в каждой временной точке для каждой группы. Вскрытие животных проводили через 4, 24, 48 и 72 ч. Стерильно отобранные легкие мышей гомогенизировали, полученную взвесь титровали и мерно высевали на чашки Петри с кровяным агаром. Через 18–20 ч культивирования в термостате при температуре 37 °C и 5 % CO₂ производили подсчет выросших колоний бактерий, после чего пересчитывали число бактерий на мышь [15].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel, Statistica 10 и Biostat. Различия в выживаемости мышей в течение заданного срока рассчитывали при сравнении 2 кривых выживаемости согласно методу, описанному С.А. Гланцем [16].

Результаты

При изучении протективной активности смесей препаратов КПС + БСФ, КПС + rPly, БСФ + rPly было выявлено, что от заражения вирулентным штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3 мышей защищает только смесь КПС + rPly (достоверные различия по сравнению с контролем, $p < 0,001$; рис. 1). Интересен тот факт, что защита формировалась независимо от заражающей дозы пневмококка (испытывали 3 заражающие дозы в диапазоне от 10³ до 10⁵ м. кл.; на рис. 1 представлены результаты только для средней заражающей дозы). В то же время смеси КПС + БСФ или БСФ + rPly не защищали животных от пневмококковой инфекции при использовании любой заражающей дозы.

Исследование иммунного ответа у иммунизированных мышей выявило значительное повышение уровня специфических антител к rPly и БСФ при незначительном повышении уровня антител к КПС (рис. 2). При использовании смеси КПС + БСФ отмечали повышение уровня антител к БСФ в 1,65 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). При использовании смеси КПС + rPly наблюдали повышение в 13 раз уровня антител к rPly (но не к КПС) по сравнению с сывороткой контрольной группы мышей ($p < 0,001$). Иммунизация животных смесью БСФ + rPly вызывала повышение уровня антител как к rPly — в 10 раз, так и к БСФ — в 7,5 раза по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

Для оценки влияния смесей антигенных препаратов на развитие инфекционного процесса использовали также модель интраназального заражения мышей после двукратной иммунизации с последующим определением количества бактерий, высеваемых из

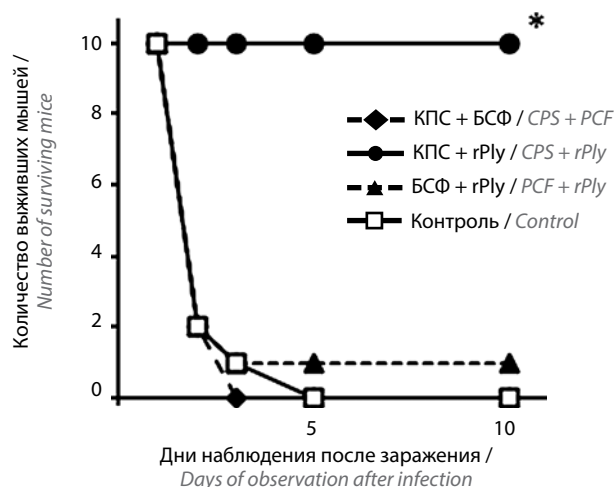


Рис. 1. Выживаемость мышей при внутрибрюшинном заражении *S. pneumoniae* серотипа 3 в дозе 10^4 микробных клеток/0,5 мл физиологического раствора на мышшь; *достоверность различий между опытом и контролем ($p < 0,001$) при сравнении кривых выживаемости по С.А. Глацу. Здесь и на рис. 2, 3: КПС – капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 3; БСФ – белоксодержащая фракция из водного экстракта клеток *S. pneumoniae* серотипа 6В; rPly – рекомбинантный пневмоллизин

Fig. 1. Survival of mice with intraperitoneal infection with *S. pneumoniae* serotype 3 in a dose 10^4 microbial cells/0,5 ml physical solution per mouse; *the reliability of the difference between the experiment and the control ($p < 0.001$) when comparing the survival curves according to S.A. Glants. Here and on fig. 2, 3: CPS – capsular polysaccharide obtained from *S. pneumoniae* serotype 3; PCF – protein-containing fraction obtained from an aqueous extract of cells of *S. pneumoniae* serotype 6В; rPly – recombinant pneumolysin

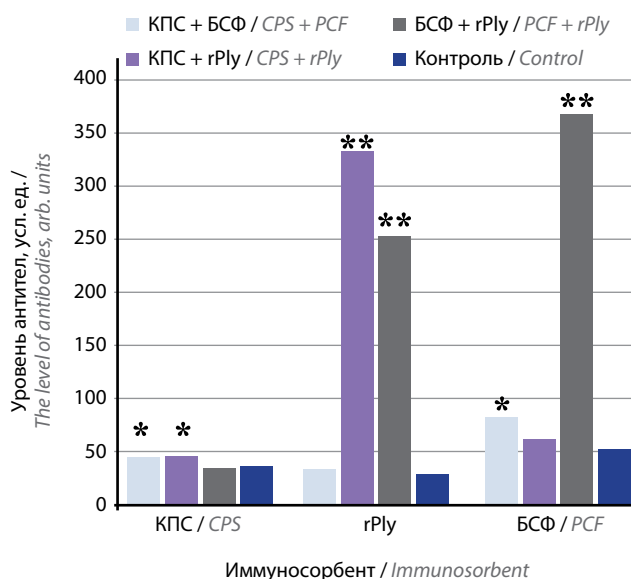


Рис. 2. Уровень IgG-антител к антигенам пневмококковых смесей в сыворотках мышей; *достоверность различий между опытом и контролем ($p < 0,05$); **достоверность различий между опытом и контролем ($p < 0,001$)

Fig. 2. The level of IgG antibodies to antigens of pneumococcal mixtures in the sera of mice; *reliability of the difference between experience and control ($p < 0.05$); **reliability of the difference between experience and control ($p < 0.001$)

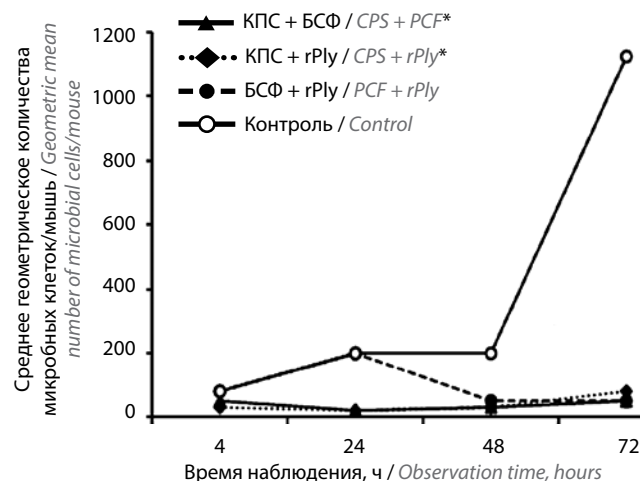


Рис. 3. Зависимость количества бактерий в легких мышей от времени наблюдения при интраназальном заражении *S. pneumoniae* серотипа 3; *достоверность различий между опытом и контролем в течение 72 ч ($p < 0,05$)

Fig. 3. Dependence of the number of bacteria in the lungs of mice on the observation time during intranasal infection with *S. pneumoniae* serotype 3; *reliability of the difference between experiment and control within 72 hours ($p < 0.05$)

легких, в зависимости от времени наблюдения. При использовании данной модели отмечали следующие результаты (рис. 3). Через 4 ч после заражения между группами мышей, получавших смеси препаратов, и контрольными животными достоверных различий не было выявлено. Через 24 ч после заражения наблюдали одинаковое небольшое увеличение количества бактерий в легких – до 2×10^2 (20 : 2000) в группе контроля и группе мышей, иммунизированных смесью БСФ + rPly, в то время как в опытных группах, иммунизированных смесью КПС + БСФ или КПС + rPly (20 : 20), отмечали снижение количества микробов, высеянных из легочной ткани. Через 48 ч наблюдения количество бактерий в легких в группе контроля не менялось, в то время как в группе животных, получавших БСФ + rPly, отмечали небольшое снижение числа микробов в легких по сравнению с предыдущей временной точкой. Через 72 ч наблюдения регистрировали значительное увеличение количества бактерий в легких мышей контрольной группы – до $1,1 \times 10^3$ (20 : 20000), в то время как во всех остальных опытных группах отмечали в 10 раз меньшее количество микробов, высеянных из легких. Однако достоверные различия с контролем были выявлены только в группах КПС + БСФ и КПС + rPly ($p < 0,05$).

Обсуждение

При анализе представленных данных обращает на себя внимание результат, полученный при использовании смеси антигенных препаратов КПС и rPly. Анализ протективной активности смеси КПС + rPly показал 100 % выживаемость мышей

при внутрибрюшинном заражении по сравнению с контрольной и другими опытными группами (КПС + БСФ, БСФ + rPly), в которых защита не формировалась, что может быть связано с недостаточной дозой антигенов в смесях. Ранее нами было показано, что трехкратная иммунизация мышей rPly защищает 67 % животных от внутрибрюшинного заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 по сравнению с контролем [17], однако убедительных экспериментальных данных по протективной активности КПС серотипа 3 нет, как, впрочем, нет опубликованных разработчиками полисахаридных и конъюгированных пневмококковых вакцин данных по иммуногенности отдельных КПС. Таким образом, препараты в смеси КПС + rPly, вероятно, действуют синергично по отношению друг к другу, влияя на формирование более выраженной защиты.

Стоит отметить, что при анализе уровня сывороточных антител в сыворотках животных наблюдали достоверное повышение IgG-антител в большинстве опытных групп по сравнению с контролем. Однако более высокие уровни антител определяли к БСФ и рекомбинантному белку, в то время как к КПС отмечали незначительное повышение уровня антител [18]. Примечательно, что при использовании антигенных смесей КПС + rPly и БСФ + rPly уровни антител к rPly или к БСФ увеличивались примерно в 1 интервале, в то время как при применении смеси КПС + БСФ уровень антител к БСФ повышался незначительно. Обнаружение более высокого уровня антител к rPly при иммунизации смесями КПС + rPly или БСФ + rPly, вероятно, связано с тем, что происходит индукция синтеза антител к рекомбинантному белку независимо от 2-го компонента смеси (КПС или БСФ) и, возможно, обусловлено оптимальным взаимодействием rPly как с КПС, так и с БСФ. В дальнейшей работе мы планируем использовать для иммунизации смесь антигенов, состоящую из 2 белков (БСФ и rPly) и КПС, что, предположительно, позволит усилить гуморальный иммунный ответ и протективную активность.

Развитие инфекционного процесса, контролируемого по высевам бактерий из легких, достоверно отличалось только в группах мышей, иммунизированных смесью КПС + БСФ или КПС + rPly, по сравнению с контролем. Однако, независимо от применяемых смесей бактериальных антигенов, происходило уменьшение количества высеваемых микробов из легких к концу периода наблюдения (72 ч) во всех опытных группах животных по сравнению с контрольной группой, в которой отмечали значительное увеличение числа высеваемых бактериальных клеток к окончанию эксперимента, что, на наш взгляд, свидетельствует о протективной активности используемых смесей. По-видимому, увеличение сроков наблюдения за высевам микробов из легких позволит подтвердить эффективность бактериальных смесей в защите от пневмококковой инфекции.

Заключение

Полученные результаты позволяют предположить, что разные антигенные препараты в смесях влияют на различные механизмы активации иммунитета и вместе с тем дополняют друг друга. Так, например, защита мышей, иммунизированных смесью КПС + rPly, от внутрибрюшинного заражения пневмококком согласуется с высоким уровнем антител к rPly в сыворотках животных. Однако на развитие инфекционного процесса и формирование защиты, вероятно, влияет не только гуморальное звено иммунитета, но и клеточное, что частично подтверждается опытом по высевам бактерий из легких мышей при интраназальном заражении пневмококком. Только смеси бактериальных антигенов пневмококка, содержащие и КПС, и белок (КПС + БСФ и КПС + rPly), препятствовали развитию инфекционного процесса в легких в течение 72 ч наблюдения. Последующее изучение механизмов клеточного иммунитета в модели высева бактерий из легких позволит оценить защитную роль клеточных факторов в элиминации внеклеточных патогенов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kim L., McGee L., Tomczyk S., Beall B. Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and postconjugate vaccine eras: a United States perspective. Clin Microbiol Rev 2016;29(3):525–52. DOI: 10.1128/CMR.00058-15.
- Brooks L.R.K., Mias G.I. *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: aging, diagnostics, and prevention. Front Immunol 2018;9:1366. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01366.
- Nishimoto A.T., Rosch J.W., Tuomanen E.I. Pneumolysin: pathogenesis and therapeutic target. Front Microbiol 2020;11:1543. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01543.
- Weiser J.N., Ferreira D.M., Paton J.C. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. Nat Rev Microbiol 2018;16(6):355–67. DOI: 10.1038/s41579-018-0001-8.
- Masomian M., Ahmad Z., Gew L.T., Poh C.L. Development of next generation *Streptococcus pneumoniae* vaccines conferring broad protection. Vaccines (Basel.) 2020;8(1):132. DOI: 10.3390/vaccines8010132.
- Cillo niz C., Amaro R., Torres A. Pneumococcal vaccination. Curr

- Opin Infect Dis 2016;29(2):187–96. DOI: 10.1097/qco.0000000000000246.
7. Briles D.E., Paton J.C., Mukerji R. et al. Pneumococcal Vaccines. Microbiol Spectr 2019;7(6). DOI: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0028-2018.
 8. Ginsburg A.S., Alderson M.R. New conjugate vaccines for the prevention pneumococcal disease in developing countries. Drugs Today 2011;47(3):207–14. DOI: 10.1358/dot.2011.47.3.1556471.
 9. Ванеева Н.П., Воробьев Д.С., Грищенко Н.В. и др. Изучение перекрестной активности антигенных препаратов *Streptococcus pneumoniae*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2012;5:36–42. [Vaneeva N.P., Vorobyev D.S., Grischenko N.V. et al. Study of cross-activity *Streptococcus pneumoniae* antigen preparations. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2012;5:36–42. (In Russ.)].
 10. Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Волох Ю.В. и др. Изучение протективной активности белоксодержащего комплекса антигенов *Streptococcus pneumoniae* в гомологичной системе. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2013;1:21–6. [Vorobyev D.S., Semenova I.B., Volokh Yu.V. et al. Study of protective activity of *Streptococcus pneumoniae* protein-containing antigen complex in homologous system. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2013;1:21–6. (In Russ.)].
 11. Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Волох Ю.В. и др. Изучение протективной активности белоксодержащих антигенов *Streptococcus pneumoniae* в гетерологичной системе. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2015;6:51–5. [Vorobyev D.S., Semenova I.B., Volokh Yu.V. et al. Study of protective activity of protein-containing antigens of *Streptococcus pneumoniae* in a heterologous system. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2015;6:51–5 (In Russ.)].
 12. Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Волох Ю.В. и др. Свойства нативных белоксодержащих антигенов *Streptococcus pneumoniae*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2019;1:22–8. [Vorobyev D.S., Semenova I.B., Volokh Yu.V. et al. Properties of native protein-containing antigens of *Streptococcus pneumoniae*. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2019;1:22–8. (In Russ.)]. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-1-22-28.
 13. Кукина О.М., Грубер И.М., Ахматова Н.К. и др. Исследование иммунобиологических свойств поверхностных белоксодержащих антигенов *Streptococcus pneumoniae* серотипа 6В. Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2020;19(3):21–7. [Kukina O.M., Gruber I.M., Akhmatova N.K. et al. Study of the immunobiological properties of surface protein-containing antigens of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. Epidemiologiya i vaksino-profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention 2020;19(3):21–27. (In Russ.)]. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-3-21-27.
 14. Ванеева Н.П., Ястребова Н.Е. Специфический иммунный ответ к отдельным капсульным полисахаридам *Streptococcus pneumoniae* у здоровых доноров крови и лиц, иммунизированных пневмококковыми вакцинами. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2015;5:20–6. [Vaneeva N.P., Yastrebova N.E. Specific immune response to certain capsule polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* in healthy blood donors and individuals immunized with pneumococcal vaccines. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2015;5:20–6. (In Russ.)].
 15. Hoover J.L., Lewandowski T.F., Mininger C.L. et al. A robust pneumonia model in immunocompetent rodents to evaluate antibacterial efficacy against *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* or *A. baumannii*. J Visualized Experiments 2017;119:e55068. DOI: 10.3791/55068.
 16. Гланц С.А. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. С. 386–394. [Glantz S.A. Biomedical statistics. Moscow: Praktika, 1998. Pp. 386–394. (In Russ.)].
 17. Петухова Е.С., Воробьев Д.С., Сидоров А.В. и др. Иммунизация рекомбинантным пневмолизином вызывает выработку антител и защищает мышью в модели системной инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2019;168(10):471–3. [Petukhova E.S., Vorobyev D.S., Sidorov A.V. et al. Immunization with recombinant pneumolysin induces the production of antibodies and protects mice in a model of systemic infection caused by *Streptococcus pneumoniae*. Bulletin experimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2019;168(10):471–3. (In Russ.)].
 18. Ястребова Н.Е., Токарская М.М., Барановская С.А. и др. Иммунобиологическая активность препарата Пневмовик против экспериментальной пневмококковой инфекции. Биофармацевтический журнал 2020;12(5):45–9. [Yastrebova N.E., Tokarskaya M.M., Baranovskaya S.A. et al. Immunobiological activity of the drug Pneumovic against experimental pneumococcal infection. Biofarmatsevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals 2020;12(5):45–9. (In Russ.)].

Вклад авторов

Д.С. Воробьев: иммунизация и заражение животных, получение индивидуальных сывороток мышей, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 М.М. Токарская, С.А. Барановская, О.М. Афанасьева: иммунизация и заражение животных, определение количества бактерий, высеваемых из легких мышей;
 Е.А. Стефутушкина, Е.А. Асташкина, О.В. Жигунова: определение количества бактерий, высеваемых из легких мышей;
 Ю.В. Волох: иммунизация и заражение животных;
 А.Ю. Леонова, Е.С. Петухова: обзор публикаций по теме статьи;
 И.Б. Семенова: обзор публикаций по теме статьи, редактирование статьи;
 Д.Н. Нечаев, Е.О. Кравцова: получение данных для анализа, статистический анализ;
 Н.Н. Овечко: постановка иммуноферментного анализа;
 Н.Е. Ястребова, И.М. Грубер, Н.А. Михайлова: анализ полученных данных, редактирование статьи.

Authors contribution

D.S. Vorobyev: immunization and infection of animals, obtaining individual sera of mice, analysis of the data obtained, writing the text of the manuscript;
M.M. Tokarskaya, S.A. Baranovskaya, O.M. Afanasyeva: immunization and infection of animals, determination of the number of bacteria inoculated from the lungs of mice;
E.A. Stefutushkina, E.A. Astashkina, O.V. Zhigunova: determination of the number of bacteria inoculated from the lungs of mice;
Yu.V. Volokh: immunization and infection of animals;
A.Yu. Leonova, E.S. Petukhova: review of publications on the topic of the article;
I.B. Semenova: review of publications on the topic of the article, editing of the article;
D.N. Nechaev, E.O. Kravtsova: obtaining data for analysis, statistical analysis;
N.N. Ovechko: setting of enzyme immunoassay;
N.E. Yastrebova, I.M. Gruber, N.A. Mikhailova: analysis of the data obtained, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.С. Воробьев / D.S. Vorobyev: <https://orcid.org/0000-0002-1926-8803>
М.М. Токарская / M.M. Tokarskaya: <https://orcid.org/0000-0002-5175-5433>
С.А. Барановская / S.A. Baranovskaya: <https://orcid.org/0000-0003-1769-3811>
Е.А. Стефутушкина / E.A. Stefutushkina: <https://orcid.org/0000-0002-3209-617X>
О.М. Афанасьева / O.M. Afanasyeva: <https://orcid.org/0000-0003-0875-4141>
Е.А. Асташкина / E.A. Astashkina: <https://orcid.org/0000-0001-6234-0156>
О.В. Жигунова / O.V. Zhigunova: <https://orcid.org/0000-0002-3958-6219>
Ю.В. Волох / Yu.V. Volokh: <https://orcid.org/0000-0002-5161-4964>
А.Ю. Леонова / A.Yu. Leonova: <https://orcid.org/0000-0002-2889-2405>
Е.С. Петухова / E.S. Petukhova: <https://orcid.org/0000-0003-0796-5764>
И.Б. Семенова / I.B. Semenova: <https://orcid.org/0000-0002-6630-4838>
Д.Н. Нечаев / D.N. Nechaev: <https://orcid.org/0000-0002-7592-3809>
Е.О. Кравцова / E.O. Kravtsova: <https://orcid.org/0000-0002-9100-0422>
Н.Н. Овечко / N.N. Ovechko: <https://orcid.org/0000-0001-8550-1290>
Н.Е. Ястребова / N.E. Yastrebova: <https://orcid.org/0000-0002-6911-1345>
И.М. Грубер / I.M. Gruber: <https://orcid.org/0000-0002-1922-4640>
Н.А. Михайлова / N.A. Mikhailova: <https://orcid.org/0000-0002-8532-4690>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

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.

Statement of the welfare of animals. The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Research and Other Scientific Purposes.

Статья поступила: 06.10.2021. Принята к публикации: 29.10.2021.

Article submitted: 06.10.2021. Accepted for publication: 29.10.2021.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-4-66-74>

Как получить патент на изобретение. Рекомендации по оформлению материалов заявки

О.И. Тарасова, А.А. Рыжова, М.И. Савинова, В.Д. Бородин

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ольга Ивановна Тарасова patent3@ronc.ru

Наличие патентов на изобретения является важным показателем инновационной деятельности научно-исследовательской организации, одним из критериев эффективности ее работы, создает правовую основу для внедрения новшеств в практику и дальнейшего коммерческого использования. Не всякий изобретатель может четко сформулировать суть своего изобретения и правильно его описать в соответствии с требованиями действующего законодательства.

Цель настоящей работы – помочь начинающему изобретателю грамотно составить описание и формулу изобретения, представить необходимые для подачи заявки на патент сведения.

В работе представлены рекомендации авторам по оформлению заявки на патент на изобретение в соответствии с патентным законодательством Российской Федерации; рассмотрены условия патентоспособности, объекты изобретения, сроки действия патента; освещены условия создания служебных изобретений; подробно раскрыты требования к структуре описания, формуле и реферату изобретения согласно «Правилам составления, подачи и рассмотрения документов, являющихся основанием для совершения юридически значимых действий по государственной регистрации изобретений, и их формы» и «Требованиям к документам заявки на выдачу патента на изобретение», утвержденным Приказом Министерства экономического развития Российской Федерации от 25 мая 2016 г. № 316. Сделан акцент на изобретения в области медицины. Для иллюстрации приведен пример описания, формулы и реферата.

Согласно патентному законодательству Российской Федерации, охрана предоставляется техническому решению, которое является новым, неочевидным для специалиста в данной области и полностью раскрыто в описании изобретения в объеме, достаточном для его воспроизводства, а реализация заявленного назначения подтверждена материалами заявки. Формула изобретения должна быть полностью основана на описании.

Ключевые слова: результаты интеллектуальной деятельности, изобретение, патент

Для цитирования: Тарасова О.И., Рыжова А.А., Савинова М.И., Бородин В.Д. Как получить патент на изобретение. Рекомендации по оформлению материалов заявки. Российский биотерапевтический журнал 2021; 20(4):66–74. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-66-74.

How to get a patent for invention. Recommendations for drawing up application materials

Olga I. Tarasova, Anna A. Ryzhova, Marina I. Savinova, Vitaliy D. Borodin

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

Contacts: Olga Ivanovna Tarasova patent3@ronc.ru

Availability of patents for inventions is a significant indicator of innovative activity in scientific research organization, one of efficiency criterion of its work, creates legal basis for integration innovations into practice and future commercial use. Not every inventor can formulate the point of his invention and describe it correctly according to demands of current legislation.

Objective is to help a beginning inventor to form description and formula of invention correctly, to provide information, necessary for giving patent's application.

Recommendations for drawing up a claim according to the patent law of Russia are present in the article with an accent on inventions in the medical area. Conditions of patentability, objects of invention, patent validity periods have been considered. Conditions of creation companies' inventions have also been highlighted. In the article the demands to a content of applications, structure of description, formula and an abstract of invention have been

disclosed in details in compliance with “The Rules of drawing up, applying and considerations of papers (documents), which are the basis for performing legally significant actions in accordance with State registration of inventions” and “Demands to documents of an application of patent of invention”, approved by the Order Minister of Economic Development of Russian Federation, dated on 25.05.2016 No. 316. The example of description of invention in the medical area is given in order to illustrate an invention prototype.

According to patent legislation of Russian Federation, a protection is provided to technical decision, which is new, not evident for a specialist in a given filed and is fully revealed in description of an invention in an amount, that is enough for its reproduction, and realization of a stated purpose is confirmed by materials of application. Formula of application must be totally based on a description.

Key words: results of intellectual activity, invention, patent

For citation: Tarasova O.I., Ryzhova A.A., Savinova M.I., Borodin V.D. How to get a patent for invention. Recommendations for drawing up application materials. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(4):66–74. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-66-74.

Введение

Наличие патентов на изобретения является важным показателем инновационной деятельности научно-исследовательской организации, одним из критериев эффективности ее работы, создает правовую основу для внедрения новшеств в практику и дальнейшего коммерческого использования [1].

Не всякий изобретатель может четко сформулировать суть своего изобретения и правильно его описать в соответствии с требованиями действующего законодательства Российской Федерации [2].

Цель настоящей работы — помочь начинающему изобретателю грамотно составить описание и формулу изобретения, представить необходимые для подачи заявки на патент сведения.

Условия патентоспособности, объекты изобретения, сроки действия патента

Согласно статье 1350 Гражданского кодекса Российской Федерации (ГК РФ) [3], изобретение — это техническое решение в любой области, относящееся:

- к продукту: устройству, веществу, в частности химическому соединению, нуклеиновой кислоте, белку, полипептиду или пептиду, штамму микроорганизма, культуре клеток растений или животных, генетической конструкции, фармацевтической композиции, лекарственному средству;
- способу — процессу осуществления действий над материальным объектом с помощью материальных средств;
- применению продукта или способа по определенному назначению.

Объектами изобретений в медицине могут, в частности, являться изделия медицинской техники; лекарственные и диагностические средства и способы их получения; способы лечения, профилактики, диагностики, прогнозирования заболеваний; штаммы, линии клеток, консорциумы, подкожные ксенографты, антитела, способы их получения и применения; последовательности нуклеотидов или аминокислот;

а также применение уже известных средств и способов по новому назначению.

Изобретениями **не являются**: открытия; научные теории и математические методы; решения, касающиеся только внешнего вида изделий; правила и методы игр, интеллектуальной или хозяйственной деятельности; программы для электронно-вычислительных машин (ЭВМ), базы данных; топологии интегральных микросхем.

Программы для ЭВМ и базы данных охраняются в соответствии с нормами авторского права и могут быть зарегистрированы в Государственном реестре программ для ЭВМ или Реестре баз данных (статьи 1261, 1262 ГК РФ) [3].

Условия патентоспособности изобретения:

- новизна;
- изобретательский уровень;
- промышленная применимость.

Изобретение является новым, если оно не известно из уровня техники на дату подачи заявки (даты приоритета).

Изобретение имеет изобретательский уровень, если для специалиста оно явным образом не следует из уровня техники.

Уровень техники включает любые сведения, ставшие известными в мире до даты приоритета.

Хотелось бы обратить особое внимание на то, что раскрытие информации об изобретении **самим автором** в публикациях также включается в уровень техники и препятствуют выдаче патента, если с момента публикации до подачи заявки прошло **более 6 мес.**

Изобретение является промышленно применимым, если оно может быть использовано в промышленности, здравоохранении или других отраслях экономики или социальной сферы.

Патент на изобретение является охранным документом, удостоверяющим исключительное право его обладателя использовать свое изобретение в течение установленного законодательством срока — **20 лет.**

В случае, если патент выдан на лекарственное средство, правообладатель может продлить его действие еще на **5 лет**.

Исключительное право на изобретение действует с даты подачи в федеральный орган исполнительной власти по интеллектуальной собственности (Роспатент) заявки на выдачу патента (статья 1363 ГК РФ) [3].

Служебные изобретения

Значительная часть охраняемых в Российской Федерации результатов интеллектуальной деятельности (РИД), в том числе изобретений, являются служебными. По данным Роспатента, около 80 % всех патентуемых РИД заявляются как служебные [4].

Изобретение, созданное работником в связи с выполнением своих трудовых обязанностей или конкретного задания работодателя, признается **служебным**, и исключительное право на него и право на получение патента принадлежат **работодателю**. Работнику, творческим трудом которого создано соответствующее новшество, принадлежит право авторства на служебное изобретение (статья 1370 ГК РФ) [3].

Все расходы по патентованию служебных изобретений несет работодатель.

Закон устанавливает принадлежность права на служебные объекты работодателю. При этом предусмотрена возможность возвращения права на получение патента работнику при невыполнении работодателем условия о реализации своего права на получение патента в течение **4 мес** со дня письменного уведомления его работником о создании РИД.

В уведомлении о создании потенциально охраноспособного объекта должны содержаться следующие сведения:

- название полученного работником технического решения;
- изложение его сущности;
- указание на потенциальную возможность получения его охраны [5].

Состав заявки на выдачу патента на изобретение

В соответствии со статьей 1375 ГК РФ заявка на выдачу патента должна содержать:

- заявление о выдаче патента с указанием автора(ов) изобретения и заявителя, а также места жительства или места нахождения каждого из них;
- описание изобретения, раскрывающее его сущность;
- формулу изобретения, ясно выражающую его сущность и полностью основанную на описании;
- чертежи и иные материалы, если они необходимы для понимания сущности изобретения;
- реферат.

Заявка на выдачу патента должна относиться к 1 изобретению или к группе изобретений, если они связаны между собой настолько, что образуют единый изобретательский замысел.

Структура описания изобретения, предъявляемые требования

Требования к документам заявки подробно изложены в «Правилах составления, подачи и рассмотрения документов, являющихся основанием для совершения юридически значимых действий по государственной регистрации изобретений, и их формы» [6] и «Требованиях к документам заявки на выдачу патента на изобретение» (далее – Требования) [7], утвержденных Приказом Министерства экономического развития Российской Федерации от 25 мая 2016 г. № 316.

Согласно разделу III Требований, описание изобретения должно содержать индексы Международной патентной классификации (МПК), название изобретения и следующие разделы:

- область техники, к которой относится изобретение;
- уровень техники;
- раскрытие сущности изобретения;
- краткое описание чертежей или другого иллюстративного материала (если они содержатся в заявке);
- осуществление изобретения;
- перечень последовательностей (если последовательности нуклеотидов и/или аминокислот использованы для характеристики изобретения);

Название должно указывать на назначение изобретения, соответствовать его сущности, быть ясным, точным и лаконичным.

В разделе описания «Уровень техники» приводятся сведения об известных автору аналогах изобретения с выделением из них аналога, наиболее близкого к заявляемому изобретению – **прототипа**. Раскрываются их **недостатки**, препятствующие решению технической проблемы, на которую направлено изобретение. В качестве аналогов указываются средства, имеющие назначение, совпадающее с назначением изобретения и ставшие известными до даты приоритета из общедоступных сведений. При описании каждого из аналогов непосредственно в тексте приводятся библиографические данные источника информации, в котором он раскрыт.

В настоящее время патентным законодательством особые требования предъявляются к полноте раскрытия сущности изобретения, в частности, в п. 36 Требований говорится, что в разделе описания «Раскрытие сущности изобретения» приводятся сведения, раскрывающие технический результат и сущность изобретения с полнотой, достаточной для его осуществления специалистом в данной области.

Сущность изобретения выражается в совокупности **существенных признаков**, достаточной для решения указанной автором технической проблемы и получения обеспечиваемого изобретением технического результата.

Признаки относятся к **существенным**, если они влияют на возможность решения указанной задачи изобретения.

Не следует заменять раскрытие признака изобретения отсылкой к источнику информации, в котором он раскрыт.

Технический результат представляет собой явление, свойство, а также технический эффект, который является следствием этого явления или свойства, объективно проявляющиеся при осуществлении изобретения. В описании следует указать на причинно-следственную связь между техническим эффектом и существенными признаками изобретения.

Технический результат в медицине может выражаться, например, в улучшении качества жизни, увеличении продолжительности жизни, снижении частоты осложнений, улучшении кровоснабжения органа, локализации действия лекарственного препарата, снижении его токсичности, уменьшении побочных явлений; снижении рецидивов заболевания, снижении лучевой нагрузки, сокращении продолжительности стационарного лечения, повышении эффективности лечения, улучшении точности и достоверности диагностики и т. д.

В разделе описания изобретения «Краткое описание чертежей», если чертежи или другой иллюстративный материал (фотографии, рисунки, графики, таблицы и т. д.) присутствуют в заявке, приводится перечень фигур чертежей или другого иллюстративного материала с краткими пояснениями того, что изображено на каждом из них.

Если объект изобретения — устройство, то наличие фигур чертежей в материалах заявки является обязательным. 17 января 2021 г. вступил в силу Федеральный закон от 20 июля 2020 г. № 217-ФЗ [8], предусматривающий возможность приложения к заявке трехмерной модели устройства в электронном формате, что позволит оптимизировать экспертизу и сократить ее сроки за счет визуального представления заявленного технического решения.

В разделе «Осуществление изобретения» (п. 45 Требований) приводятся сведения, раскрывающие, как может быть осуществлено изобретение, с подтверждением возможности достижения указанного технического результата и детальным описанием **примеров** осуществления изобретения со ссылками на иллюстративные материалы, если они представлены.

Если существенный признак изобретения выражен общим понятием, охватывающим разные частные формы его реализации, должны быть представ-

лены сведения о частных формах реализации этого существенного признака и приведено достаточное количество примеров осуществления изобретения.

Если количественный существенный признак изобретения выражен в виде интервала значений, должны быть приведены примеры осуществления изобретения, подтверждающие получение технического результата во всем этом интервале (не менее 3 примеров).

В данном разделе описания изобретения приводятся объективные данные, например полученные в результате проведения эксперимента, испытаний, клинические примеры, теоретические обоснования, основанные на научных знаниях.

Приводимый объем информации должен быть таким, чтобы другой специалист соответствующей квалификации (в том числе, что очень важно, эксперт) был способен представить процедуру исследования и убедиться в правильности постановки и проведения эксперимента, обработки полученных данных.

Необходимо пошаговое описание всех произведенных действий, использованных инструментальных средств: сведения о марке приборов и их основные технические данные. Если в эксперименте используются образцы, необходимо указать источник этих образцов, представить процесс подготовки образцов к эксперименту.

Как правило, упомянутые сведения отражаются в протоколе испытаний. Следует, однако, иметь в виду, что все необходимые сведения протокола испытаний могут иметь слишком большой объем для приведения их в описании изобретения. В этом случае сам протокол может быть приложен к документам заявки или представлен по запросу эксперта [9].

В описании **способа лечения, диагностики** необходимо привести хотя бы один клинический пример.

Если изобретение относится к **лекарственному средству** для профилактики или лечения заболеваний, приводятся достоверные сведения, свидетельствующие о влиянии средства на этиопатогенез заболевания или на состояние организма. Если заявляется лекарственное средство для диагностики определенного заболевания или состояния, приводятся сведения о связи с ними диагностического фактора. Также могут быть приведены сведения, подтверждающие эффективность средства для лечения или профилактики указанного заболевания, полученные, в частности, в эксперименте на адекватных моделях.

Для изобретения, относящегося к **лекарственному препарату**, приводятся сведения о его лекарственной форме.

Если изобретение относится к **группе химических соединений** с установленной структурой, описываемых общей структурной формулой, приводятся примеры получения конкретных соединений группы,

а если группа включает соединения с разными по химической природе радикалами — примеры, достаточные для подтверждения возможности получения соединений с этими разными радикалами.

Если соединения являются **биологически активными**, приводятся показатели активности этих соединений, в случае необходимости — избирательности действия и другие показатели (п. 47 Требований).

Для подтверждения возможности осуществления изобретения, относящегося к **штамму микроорганизма, линии клеток, консорциумам штаммов** приводится описание способа их получения и предоставляются **сведения о депонировании**.

Депонирование для целей патентной процедуры считается осуществленным, если штамм, линия клеток или консорциум помещены в международный орган по депонированию, предусмотренный Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры, или в российскую коллекцию, уполномоченную осуществлять депонирование для этой цели (п. 48 Требований). Такой коллекцией является Национальный биоресурсный центр Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетики.

Сведения о депонировании указываются в описании изобретения, соответствующая справка о депонировании прикладывается к материалам заявки.

Исключение, касающееся необходимости предоставления сведений о депонировании, установлено лишь в отношении штаммов, полученных с помощью генно-инженерных методик, т. е. рекомбинантных штаммов, которые могут быть осуществлены на основании сведений, приведенных в описании [10].

Если изобретение касается **биотехнологических объектов**, то необходимо представить перечень последовательностей нуклеотидов и/или аминокислот в соответствии со стандартом Всемирной организации интеллектуальной собственности, размещенным на официальном сайте Роспатента. Перечень последовательностей нуклеотидов и/или аминокислот представляется в печатной форме и на машиночитаемом носителе (ст. 11 Требований).

Формула изобретения предназначена для определения объема правовой охраны изобретения и должна быть полностью основана на описании, т. е. определяемый формулой объем правовой охраны должен быть подтвержден описанием изобретения. Формула изобретения считается полностью основанной

на описании, если для характеристики включенных в нее признаков использованы понятия, содержащиеся в описании изобретения.

Формула изобретения может быть однозвенной или многозвенной и включать, соответственно, один или несколько пунктов. Она должна ясно выражать сущность изобретения, т. е. содержать совокупность существенных признаков, достаточную для решения указанной заявителем технической проблемы.

Пункт формулы состоит из ограничительной части, включающей признаки изобретения, совпадающие с признаками прототипа, и отличительной части, включающей признаки, которые отличают изобретение от прототипа. Ограничительная часть формулы излагается после слов «включающий», «содержащий» или «состоящий из», затем вводится выражение «отличающийся тем, что», после которого излагается отличительная часть (п. 53 Требований).

Формула составляется без разделения на ограничительную и отличительную части, если она характеризует:

- штамм микроорганизма, линию клеток;
- индивидуальное химическое соединение;
- применение продукта или способа по новому назначению;
- изобретение, не имеющее аналогов (п. 54 Требований).

Реферат служит для информирования об изобретении и представляет собой сокращенное изложение описания, включающее название изобретения, область техники, к которой оно относится, сущность изобретения с указанием решаемой проблемы и получаемого технического результата.

Рекомендуемый объем текста реферата — до 1000 печатных знаков (п. 62 Требований).

Далее приводится пример составления описания, формулы и реферата изобретения в области медицины (см. ниже).

Заключение

Таким образом, согласно патентному законодательству Российской Федерации, охрана предоставляется техническому решению, которое является новым, неочевидным для специалиста в данной области и полностью раскрыто в описании изобретения в объеме, достаточном для его воспроизводства, а реализация заявленного назначения подтверждена материалами заявки [11]. Формула изобретения должна быть полностью основана на описании.

МПК А61К 31/553
А61К 31/167
А61К 31/542
А61Р 29/00

Способ мультимодального безопиоидного послеоперационного обезболивания у больных с опухолями головы и шеи

Изобретение относится к медицине, а именно к анестезиологии и онкологии, и касается способа обезболивания в послеоперационном периоде у онкологических больных.

Высокая травматичность оперативных вмешательств при опухолях в области головы и шеи обусловлена богатой иннервацией и васкуляризацией тканей, близостью рефлексогенных зон, расширенными и комбинированными объемами оперативных вмешательств. Нарушения проходимости дыхательных путей вследствие опухолевого роста, хирургические манипуляции в области верхних дыхательных путей и послеоперационный отек близлежащих тканей сопровождаются выраженными нарушениями дыхания, что обуславливает особые требования к безопасности анальгетиков для послеоперационного обезболивания.

Известен классический способ мультимодального послеоперационного обезболивания, включающий сочетание опиоидных анальгетиков, нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) и регионарных блокад (Kehlet H. Labat Lecture 2005. Surgical stress and postoperative outcome – from here to where? Reg. Anesth. Pain Med. 2006. V. 31. P. 47–52).

Недостатками способа являются побочные эффекты опиоидных препаратов – депрессия дыхания, тошнота, рвота, представляющие особый риск для больных с опухолевым поражением головы и шеи (Осипова Н.А., Новиков Г.А., Прохоров Б.М. Хронический болевой синдром в онкологии. М.: Медицина, 1998).

Прототипом заявляемого изобретения является способ мультимодального безопиоидного обезболивания с использованием нефопама и НПВП в послеоперационном периоде (Delage N., Maaliki H., Beloeil H. Median effective dose (ED50) of nefopam and ketoprofen in postoperative patients. Anesthesiology. 2005. V. 102. P. 1211–1216).

Способ заключается в назначении 1 % раствора нефопама по 20 мг внутримышечно 3 раза в сутки и 5 % раствора кетопрофена по 100 мг внутримышечно 2 раза в сутки в течение 2–3 суток после операции.

Недостатком способа является неполный обезболивающий эффект при высокотравматичных операциях в области головы и шеи. Побочные реакции – тахикардия, тошнота, рвота, потливость (Баландин В.В., Горобец Е.С. Послеоперационное обезболивание нефопамом и НПВП у больных, оперированных по поводу опухолей области головы и шеи. Анестезиология и реаниматология. 2014. № 1. С. 40–43).

Задачей заявляемого изобретения является создание нового, более эффективного способа мультимодального безопиоидного послеоперационного обезболивания у больных с опухолями головы и шеи, позволяющего улучшить качество обезболивания и снизить частоту побочных реакций.

Поставленная задача решается применением трехкомпонентной смеси, содержащей 2 % раствор лидокаина в объеме 150 мл в сочетании с 1 % раствором нефопама в объеме 12 мл и с 1 % раствором теноксикама в объеме 4 мл в 134 мл 0,9 % физиологического раствора. Смесь вводят внутривенно с помощью одноразовой инфузионной помпы со скоростью 6–8 мл/ч в течение от 48 до 72 ч после операции.

Техническим результатом, полученным при осуществлении заявляемого способа, является улучшение качества послеоперационного обезболивания и снижение частоты побочных реакций.

Способ осуществляют следующим образом: за 30 мин до окончания операции в 300 мл одноразовую инфузионную помпу набирают трехкомпонентную смесь, состоящую из 2 % раствора лидокаина в объеме 150 мл в сочетании с 1 % раствором нефопама в объеме 12 мл и с 1 % раствором теноксикама в объеме 4 мл в 134 мл 0,9 % физиологического раствора, осуществляют инфузию внутривенно со скоростью 6–8 мл/ч через периферический или подключичный катетер. Длительность инфузии составляет от 48 до 72 ч после операции.

Для оценки эффективности послеоперационного обезболивания была использована десятибалльная визуально-аналоговая шкала (ВАШ), где 0 баллов – отсутствие боли, 10 баллов – нестерпимая боль. Оценку проводили на следующих этапах исследования: в палате пробуждения и в хирургическом отделении в день операции; далее в хирургическом отделении в течение 2 суток после операции.

Изобретение иллюстрируется примерами 1 и 2.

Выявлено достоверное снижение интенсивности боли у больных, обезболивание которым проводили по заявляемому способу, по сравнению с прототипом.

У больных, которым обезболивание проводили по заявляемому способу, в день операции в палате пробуждения и в хирургическом отделении интенсивность боли не превышала $1,06 \pm 1$ и $2,03 \pm 0,6$ балла соответственно. При этом у больных, обезболивание которым проводили по прототипу, интенсивность боли составила $2,0 \pm 0,5$ и $3,6 \pm 0,5$ балла соответственно.

У больных, которым обезболивание проводили по заявляемому способу, на первые и вторые послеоперационные сутки интенсивность боли составила $1,8 \pm 0,7$ и $1,13 \pm 0,5$ балла соответственно. В то время как у больных, обезболивание которым проводили по прототипу, интенсивность боли составила $2,3 \pm 0,6$ и $1,4 \pm 0,3$ балла.

Пример 1. Больной Ш., 72 лет, масса тела – 59 кг. Диагноз: рак слизистой оболочки дна полости рта, метастазы в лимфатические узлы шеи слева. 03.02.2014 г. выполнена операция в объеме сегментарной резекции нижней челюсти слева, фасциально-фулярного иссечения клетчатки шеи, резекции дна полости рта с замещением дефекта большой грудной мышцей. Длительность операции составила 5 ч.

Обезболивание начато по заявляемому способу за 30 мин до окончания операции. Скорость инфузии трехкомпонентной смеси составила 6 мл/ч при длительности обезболивания 48 ч. Эффективность обезболивания по ВАШ оценена на первые сутки в 2 балла, на вторые сутки – в 1 балл, что соответствовало низкой интенсивности боли. Побочных реакций во время обезболивания не выявлено.

Пример 2. Больной Д., 47 лет, масса тела – 66 кг. Диагноз: рак языка, метастазы в лимфатические узлы с двух сторон. 21.05.2014 г. выполнена операция в объеме резекции языка, дна полости рта, краевой резекции нижней челюсти, фасциально-фулярного иссечения клетчатки шеи с двух сторон с замещением дефекта микрососудистым бедренным трансплантатом. Длительность операции составила 11 ч.

Обезболивание начато по заявляемому способу за 30 мин до окончания операции. Скорость инфузии трехкомпонентной смеси составила 8 мл/ч при длительности обезболивания 72 ч. Эффективность обезболивания по ВАШ оценена в первые и вторые сутки после операции в 1 балл. Побочных эффектов во время обезболивания не выявлено.

Обезболивание по заявляемому способу проведено у 41 больного. У всех больных отмечали высокую эффективность обезболивания и снижение частоты побочных реакций в 2 раза по сравнению с прототипом. Побочные реакции в виде тахикардии и потливости выявлены всего у 2 (4,8 %) больных.

Формула изобретения

Способ мультимодального безопиоидного послеоперационного обезболивания у больных с опухолями головы и шеи, включающий применение 1 % раствора нефопама в течение 48–72 ч после операции, отличающийся тем, что раствор нефопама вводят в составе трехкомпонентной смеси, состоящей из 2 % раствора лидокаина в объеме 150 мл в сочетании с 1 % раствором теноксикама в объеме 4 мл в 134 мл 0,9 % физиологического раствора, внутривенно с помощью одноразовой инфузионной помпы со скоростью 6–8 мл/ч.

Способ мультимодального безопиоидного послеоперационного обезболивания у больных с опухолями головы и шеи

Реферат

Изобретение относится к медицине и может быть использовано для мультимодального безопиоидного послеоперационного обезболивания у больных с опухолями головы и шеи. Для этого применяют 1 % раствор нефопама в течение 48–72 ч после операции. При этом раствор нефопама вводят в составе трехкомпонентной смеси, состоящей из 2 % раствора лидокаина в объеме 150 мл в сочетании с 1 % раствором теноксикама в объеме 4 мл в 134 мл 0,9 % физиологического раствора, внутривенно с помощью одноразовой инфузионной помпы со скоростью 6–8 мл/ч. Заявленное изобретение позволяет снизить интенсивность боли и частоту побочных реакций у пациентов. 2 пр.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Тарасова О.И., Рыжова А.А., Кубасова И.Ю. и др. Защита объектов интеллектуальной собственности в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2017 году. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(3):89. [Tarasova O.I., Ryzhova A.A., Kubasova I.Y. et al. Protection of intellectual property in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology in 2017. Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(3):89. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-89.
2. Киселев А.В., Гордина Г.А., Кубасова И.Ю. и др. Рекомендации по оформлению заявок на результаты интеллектуальной деятельности. Российский биотерапевтический журнал 2010;9(1):35–8. [Kiselev A.V., Gordina G.A., Kubasova I.Y. et al. Recommendations for Drawing Up a Claim for the Results of Intellectual Activity Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2010;9(1):35–8. (In Russ.)].
3. Гражданский кодекс Российской Федерации. Часть 4. Федеральный закон от 18.12.2006 № 230-ФЗ с изменениями, внесенными Федеральным законом от 30.12.2015 № 431-ФЗ. Собрание законодательства Российской Федерации 2016;1:51. [Civil Code of the Russian Federation. Part 4. Federal Law of December 18, 2006 No. 230-FZ as amended by Federal Law No. 431-FZ of December 30, 2015. Sbornie Zakonodatelstva Rossiyskoy Federatsii = Collected Legislation of the Russian Federation 2016;1:51. (In Russ.)].
4. Мухамедшин И.С. Правовое регулирование служебных результатов интеллектуальной деятельности. Патенты и лицензии. Интеллектуальные права 2016;11:23–8. [Muhamedshin I.S. Legal Regulation of the Service Results of Intellectual Activity. Patenty i Litsenzii. Intellektualnie prava = Patents and Licenses. Intellectual Rights 2016;11:23–8. (In Russ.)].
5. Грант С. Права на объекты, созданные по договорам, прямо не предусматривающим их создание. Интеллектуальная собственность. Промышленная собственность 2021;1:45–52. [Grant S. Exclusive rights for objects, created under agreements that do not directly envisage creating these objects. Intellektualnaya Sobstvennost. Promyshlennaya Sobstvennost = Intellectual Property. Industrial Property 2021;1:45–52. (In Russ.)].
6. Правила составления, подачи и рассмотрения документов, являющихся основанием для совершения юридически значимых действий по государственной регистрации изобретений, и их формы. Патенты и лицензии. Интеллектуальные права 2016;10:31–64. Или по адресу: <http://new.fips.ru/documents>. [Rules for the preparation, submission and consideration of documents that are the basis for the performance of legally significant actions for the state registration of inventions, and their forms. Patenty i Litsenzii. Intellektualnie prava = Patents and Licenses. Intellectual Rights 2016;10:31–64. Or at: <http://new.fips.ru/documents>. (In Russ.)].
7. Требования к документам заявки на выдачу патента на изобретение. Приказ Минэкономразвития России от 25.05.16 № 316. Патенты и лицензии. Интеллектуальные права 2016;10:64–86. Или по адресу: <http://new.fips.ru/documents>. [Requirements for the documents of the application for the grant of a patent for an invention. Order of the Ministry of Economic Development of Russia dated May 25, 2016 No. 316. Patenty i Litsenzii. Intellektualnie prava = Patents and Licenses. Intellectual Rights 2016;10:64–86. Or at: <http://new.fips.ru/documents>. (In Russ.)].
8. Федеральный закон Российской Федерации от 20 июня 2020 г. № 217-ФЗ «О внесении изменений в часть четвертую Гражданского кодекса Российской Федерации». Патенты и лицензии. Интеллектуальные права 2020;8:73. [Federal Law of the Russian Federation of June 20, 2020 No. 217-FZ “On Amendments to Part Four of the Civil Code of the Russian Federation”. Patenty i Litsenzii. Intellektualnie prava = Patents and Licenses. Intellectual Rights 2020;8:73. (In Russ.)].
9. Правоприменительная практика, новые подходы к рассмотрению заявок и выдаче патентов на изобретения – вопросы и ответы. Доступно по: <https://fips.ru/about/vptb-otdelenie-vserossiyskaya-patentno-tehnicheskaya-biblioteka/tematicheskie-vstrechi/pravoprimenitelnaya-praktika-novye-podkhody-k-rassmotreniyu-zayavok-i-vydache-patentov-na-izobreteniya.php>. [Law enforcement practice, new approaches to the consideration of applications and the grant of patents for inventions – questions and answers. Available at: <https://fips.ru/about/vptb-otdelenie-vserossiyskaya-patentno-tehnicheskaya-biblioteka/tematicheskie-vstrechi/pravoprimenitelnaya-praktika-novye-podkhody-k-rassmotreniyu-zayavok-i-vydache-patentov-na-izobreteniya.php>. (In Russ.)].
10. Грант С. Депонирование штаммов микроорганизмов для целей патентной процедуры. Интеллектуальная собственность. Промышленная собственность 2018;7:33–40. [Grant S. Deposit of Strains of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure. Intellektualnaya Sobstvennost. Promyshlennaya Sobstvennost = Intellectual Property. Industrial Property 2018;7:33–40. (In Russ.)].
11. Залесов А.В. Особенности применения российской патентной системы в области фармацевтики. Патенты и лицензии. Интеллектуальные права 2018;9:2–11. [Zalesov A.V. Features of the Application of the Russian Patent System in the Field of Pharmaceuticals. Patenty i Litsenzii. Intellektualnie prava = Patents and Licenses. Intellectual Rights 2018;9:2–11. (In Russ.)].

Вклад авторов

О.И. Тарасова: написание текста статьи, редактирование статьи;
А.А. Рыжова, М.И. Савинова, В.Д. Бородин: сбор, анализ информации по теме статьи.

Authors contributions

O.I. Tarasova: writing the text of the article, editing of the article;
A.A. Ryzhova, M.I. Savinova, V.D. Borodin: collection and analysis of information.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.И. Тарасова / O.I. Tarasova: <https://orcid.org/0000-0001-5160-9332>

А.А. Рыжова / A.A. Ryzhova: <https://orcid.org/0000-0002-2013-0078>

М.И. Савинова / M.I. Savinova: <https://orcid.org/0000-0003-4947-8366>

В.Д. Бородин / V.D. Borodin: <https://orcid.org/0000-0003-3334-4734>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 07.09.2021. Принята к публикации: 22.10.2021.

Article submitted: 07.09.2021. Accepted for publication: 22.10.2021.

При направлении статьи в редакцию журнала «Российский биотерапевтический журнал» авторам необходимо руководствоваться следующими правилами, составленными с учетом «Единых требований к рукописям, предоставляемым в биомедицинские журналы» (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals), разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов (International Committee of Medical Journal Editors).

Редакция просит авторов в подготовке рукописей руководствоваться изложенными ниже правилами. Рукописи, оформленные без соблюдения данных правил, редакцией рассматриваться не будут.

1. Общие правила

Статья в обязательном порядке должна сопровождаться официальным направлением учреждения, в котором выполнена данная работа, с подписью руководителя, заверенной печатью учреждения. При первичном направлении рукописи в редакцию в копии электронного письма должны быть указаны все авторы данной статьи. Обратную связь с редакцией будет поддерживать ответственный автор, обозначенный в статье (см. пункт 2).

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

Присланные статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат» и принимаются в случае удовлетворительного результата (определяемого для каждой из статей в индивидуальном порядке по соотношению оригинальных фрагментов текста, заимствованных фрагментов и наличия оформленных ссылок).

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- 1) название статьи прописными буквами (шрифт **жирный**);
- 2) инициалы и фамилии всех авторов (шрифт **обычный**);
- 3) место работы каждого из авторов, адрес учреждения с указанием индекса (шрифт *курсив*);
- 4) ORCID авторов;
- 5) адрес электронной почты ответственного за связь автора (шрифт *курсив*).

Данные, указанные в пунктах 1–3, должны быть представлены на русском и английском языках.

Пример:

ПУБЛИКАЦИЯ СТАТЬИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

И.И. Иванов¹, П.П. Петров²

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

²ФГБУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11

Контакты: Иван Иванович Иванов *chem_analysis@ronc.ru*

THE PUBLICATION OF THE ARTICLE IN «ROSSIYSKY BIOTHERAPEVTICHESKY ZHURNAL»

I.I. Ivanov¹, P.P. Petrov²

¹N.N. Blokhin NMRCO; 24 Kashyrskoe Sh., Moscow, 115478, Russia;

²FSBSI "G.F. Gauze Research Institute of search for new antibiotics"; 11 Bolshaya Pirogovskaya St, Moscow, 119435, Russia

Последняя страница должна содержать:

- 1) Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
 - фамилия, имя, отчество полностью;
 - занимаемая должность;
 - ученая степень, ученое звание;
 - контактный телефон;
 - рабочий адрес с указанием индекса;
 - адрес электронной почты.

2) Скан подписей всех авторов статьи.

3. Оформление текста

Статьи принимаются в формате doc, docx, rtf.

Шрифт – Times New Roman, размер 12, междустрочный интервал 1.5. Все страницы должны быть пронумерованы.

Текст статьи начинается со второй страницы.

4. Обзор статей (включая список литературы, таблицы и подписи к рисункам)

Обзор литературы – не более 15 страниц,

оригинальная статья – не более 12 страниц,

краткие сообщения – не более 4 страниц.

Большой объем статьи допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции.

5. Резюме и ключевые слова

Ко всем видам статей на второй странице должно быть приложено резюме на русском и английском языках. Слова «резюме» и «abstract» не указываются. Резюме должно кратко повторять структуру статьи, независимо от ее тематики. Для оригинальных статей резюме обязательно должно содержать следующие разделы:

- введение;
- материалы и методы;
- заключение (выводы).
- цель;
- результаты;

Объем резюме – 200–250 слов. Резюме не должно содержать ссылки на литературные источники и иллюстративный материал.

На этой же странице помещаются **ключевые слова** на русском и английском языке в количестве 3–10.

6. Структура статей

Оригинальная статья и краткое сообщение экспериментального или клинического характера должны содержать следующие разделы:

- введение;
- материалы и методы;
- заключение (выводы);
- при наличии финансирования исследования указать его источник (грант и т. д.);
- благодарности (раздел не является обязательным).
- цель;
- результаты и обсуждение;
- конфликт интересов;

Обзоры литературы, статьи теоретического и концептуального характера должны включать следующие разделы:

- введение;
- разделы по отдельным обсуждаемым вопросам;
- заключение (выводы).

Введение. Краткий обзор состояния вопроса со ссылками на наиболее значимые публикации, при этом необходимо проведения исследования.

Цель. 1–3 предложения о том, какую проблему или гипотезу решает автор и с какой целью.

Материалы и методы. Подробное изложение методик исследования, аппаратуры, критериев отбора участников, их число и характеристики, способы и принципы распределения на группы, дизайн исследования, методы статистического анализа. Описанные методы исследования должны гарантировать возможность воспроизведения результатов. При перечислении использованной аппаратуры и препаратов в скобках указываются производитель и страна; при перечислении используемых в ходе работы лекарственных препаратов и химических веществ – их международное непатентованное (общепринятое) название, дозы, пути введения.

В конце статьи о проведенном исследовании указать, решением какого этического комитета оно одобрено, номер и дату протокола исследования, а также факт подписания испытуемыми информированного согласия.

Результаты. Должны быть представлены в логической последовательности, отражать данные описанного выше исследования с указаниями на графики, таблицы и рисунки. Допускается сопоставление полученных результатов с данными других исследователей. Возможно включение обоснованных рекомендаций для клинической практики и применения полученных данных в предстоящих исследованиях. Следует избегать повторения сведений из раздела «Введение». Результаты представляются четко, в виде коротких описаний.

Заключение. Должно быть кратким и лаконичным. Подведение итога проделанной работы и гипотеза авторов о значении полученных данных – в рамках патогенеза, лечения, диагностики; перспективы использования полученных данных.

7. Иллюстративный материал

Иллюстративным материалом являются фотографии, рисунки, схемы, графики, диаграммы, таблицы. В тексте должны быть указаны ссылки на таблицы и рисунки, например: (табл. 1), (рис. 1) или на рис. 1 представлены..., которые должны быть размещены в соответствующих по смыслу абзацах и последовательно пронумерованы. Рисунки и таблицы нумеруются отдельно.

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Схемы, графики, диаграммы, таблицы могут быть собраны в общие файлы по типу иллюстративного материала с началом каждого с новой страницы. Например: все таблицы собраны в отдельный от статьи файл, где каждая новая таблица начинается с новой страницы. Если в этой же статье есть диаграммы, то они будут составлять следующий файл, где будут собраны исключительно диаграммы, и каждая из них будет размещена на отдельном листе документа. Файлы иллюстративного материала должны позволять воспроизвести высокое качество изображения в электронной и печатной версии журнала. Если иллюстративный материал ранее был опубликован в других изданиях, автор обязан предоставить в редакцию разрешение правообладателя на публикацию данного изображения в другом журнале, в противном случае это будет считаться плагиатом и к публикации принято не будет. Количество иллюстраций должно соответствовать объему предоставляемой информации, избыточность иллюстраций может привести к возвращению авторам статьи для доработки на предмет сокращения. Данные таблиц не должны повторять данные рисунков и текста и наоборот.

Фотографии представляются в формате TIFF, JPG с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм). Глаза пациентов или здоровых испытуемых на фотографиях должны быть закрыты черным прямоугольником, в случае его отсутствия автор должен предоставить в редакцию письменное разрешение пациента на публикацию.

Рисунки, графики, схемы, диаграммы представляются в формате EPS Adobe Illustrator 7.0–10.0 или Office Excel. При невозможности представления в данном формате необходимо связаться с редакцией.

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подписочными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т. д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подписочной подписи. Подписи к рисункам даются на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле.

Названия рисунков должны быть переведены на английский язык.

Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице. Необходимо указывать применявшийся для анализа статистический метод и соответствующее значение достоверности (р). В случае размера таблиц больше, чем на лист А4, они представляются в виде отдельного файла doc, docx, rtf.

Названия таблиц должны быть переведены на английский язык.

Все **формулы** должны быть тщательно выверены автором, набраны или встроены в формат текстового редактора. В формулах необходимо различать строчные и прописные, латинские и греческие, подстрочные и надстрочные буквы. Используемые автором сокращения должны быть разъяснены под формулой.

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ). Если исследование проводилось на приборах, дающих показатели в других единицах, необходимо перевести их в систему СИ с указанием коэффициента пересчета или компьютерной программы в разделе «Материалы и методы».

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, рак предстательной железы (РПЖ)). Список использованных сокращений приводится после списка литературы. Не следует параллельно использовать термин и его сокращение.

Название генов пишется курсивом, название белков – обычным шрифтом.

9. Список литературы

Не менее 50 процентов источников из списка литературы должны быть опубликованы за последние 5 лет, в том числе в журналах, индексируемых в базах данных *Web of Science, Scopus, Science Index*.

Все источники должны быть пронумерованы, нумерация осуществляется строго по мере цитирования в тексте статьи, но не в алфавитном порядке. Все ссылки на источники литературы в тексте статьи печатаются арабскими цифрами в квадратных скобках (например: [5], [7, 8], [7–9]). Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательно не более 25 источников, в обзорах литературы — не более 60.

Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они упомянуты. Ссылки на неопубликованные работы, учебники, учебные пособия, нормативные и архивные материалы, статистические сборники, ГОСы, распоряжения, анонимные источники, публикации в СМИ, монографии, авторефераты и диссертации и т.д. не допускаются.

В цитируемой литературе нужно указывать источники с DOI (Digital Object Identifier, подробнее на сайте www.crossref.org) при наличии и PMID (PubMed identifier, подробнее на сайте <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Ссылки на источники литературы должны быть оформлены следующим образом: для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» в английском тексте). Авторы цитируемых источников должны быть указаны в том же порядке, что и в первоисточнике.

Для каждого русскоязычного источника должен приводиться перевод на английский язык (можно проверить на сайте elibrary.ru). При отсутствии перевода основных сведений в первоисточнике необходима транслитерация ссылки на английский язык (рекомендуем обращаться на сайт translit.net (стандарт транслитерации — BSI)).

Статья в журнале

Фамилия И.О. авторов. Название статьи. Название журнала год; том (номер выпуска): страницы (повторяющиеся цифры страниц не указывать, например: 185–7).

Примеры:

Strigley J.R., Delahunt B., Eble J.N. et al. The International society of urological pathology (ISUP) Vancouver classification of renal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2013;37 (10):1469–89. DOI: 10.1097/PAS.0b013e318299fd1.

Михайленко Д.С., Алексеев Б.Я., Ефремов Г.Д., Каприн А.Д. Генетические особенности несветлоклеточного рака почки. *Онкоурология* 2016;12(3):14–21. DOI: 10.17650/1726-9776-2016-12-3-14-21. [Mikhaylenko D.S., Alekseev B.Y., Efremov G.D., Kaprin A.D. Genetic characteristics of the non-clear cell renal cancer. *Cancer Urology* 2016;12 (3):14–21. (In Russ.).]

Монографии, сборники тезисов

Фамилия И.О. авторов. Полное название книги. Место издания: название издательства; год издания; номера страниц или общее количество страниц.

Примеры:

Матвеев Б.П., Бухаркин Б.В., Калинин С.А. Лечение гормонорезистентного рака предстательной железы. В кн.: Материалы конференции «Онкологическая урология: от научных исследований к клинической практике (современные возможности лечения опухолей предстательной железы, мочевого пузыря и почки)». М., 2004. С. 28–31. [Matveev B.P., Buharkin B.V., Kalinin S.A. Treatment of the hormone resistant prostate cancer. In the book: Materials of the conference «Oncologic urology: from scientific studies to clinical practice (modern opportunities for the treatment of prostate, bladder and kidney tumors). Moscow, 2004. P. 28–31. (In Russ.).]

Каприн А.Д., Нестеров П.В., Костин А.А. и др. Особенности хирургического этапа лечения пациентов, страдающих раком мочевого пузыря с синдромом нижних мочевых путей. Материалы I конгресса Рос. общества онкоурологов: тез. докл. М., 2006. С. 87–88. [Kaprin A.D., Nesterov P.V., Kostin A.A. et al. Peculiarities of the surgical stage of the treatment of patients with bladder cancer with the syndrome of lower urinary tracts. Materials of the I congress of the Russian Oncourologists Society: report abstract. Moscow, 2006. P. 87–88. (In Russ.).]

Патенты

Фамилия И.О. изобретателя, заявителя, патентовладельца. Название изобретения. Обозначение вида документа, название страны, номер, дата публикации (регистрационный номер заявки, дата подачи).

Пример:

Колс Ян. Применение Мидостаурина для лечения желудочно-кишечных стромальных опухолей. Патент США №5093330 от 03.03.1992 г. [Kols Jan (BE) Administration of Midostaurin for treating gastrointestinal stromal tumours. RU2 410 098C2. (In Russ.).]

При ссылке на **данные, полученные из Интернета**, указывают электронный адрес цитируемого источника.

10. Этические вопросы

• Авторство

Право называться автором имеют лица, которые:

- 1) внесли значительный вклад в концепцию и дизайн исследования или в анализ и интерпретацию данных;
- 2) активно участвовали в подготовке текста статьи или внесении принципиальных изменений;
- 3) участвовали в окончательном утверждении версии, которая сдается в печать;
- 4) готовы принять на себя ответственность за содержание статьи.

Исключительно обеспечение финансирования или подбор материала для статьи не оправдывает включения в состав авторской группы. Общее руководство исследовательским коллективом также не признается достаточным для авторства.

Редакторы вправе запросить информацию о вкладе каждого из авторов в написание статьи и опубликовать ее.

Возможные варианты участия авторов: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных (включая статистический), обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи и др.

Пример:

А.М. Иванов: разработка дизайна исследования;

В.С. Петров, Г.П. Сидоров: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

М.М. Иванова: написание текста рукописи;

О.Д. Сидорова: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных.

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, не оказавшие помощь в проведении исследования по сбору, анализу и интерпретации данных, предоставлению материалов и инструментов, должны быть перечислены с их согласия в разделе «Благодарности».

• Конфликт интересов

В конце статьи необходимо указать наличие конфликта интересов для всех авторов. Конфликт интересов подразумевает наличие каких-либо связей и/или личной заинтересованности, которые потенциально могут повлиять на результаты, интерпретацию полученных данных, объективное их восприятие, в частности финансовые отношения и сотрудничество с какими-либо организациями (например, получение гонораров, образовательных грантов, участие в экспертных советах, членство, трудовые отношения, консультационная работа, владение магазином в частной собственности или другие интересы) или нефинансовая заинтересованность (например, личные или профессиональные взаимоотношения, знакомства и пр.), касающиеся рассматриваемых в статье вопросов и/или материалов.

В случае отсутствия конфликта интересов в конце статьи следует констатировать следующее:

Для статьи 1 автора/2 и более авторов

Конфликт интересов. Автор/авторы заявляет/заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author/authors declares/declare no conflict of interest.

• Источник финансирования

Информация о наличии или отсутствии финансирования указывается для всех статей. Пример оформления для статьи с авторским исследованием:

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке <...>.

Статьи, в которых содержится информация, не касающаяся непосредственно исследования, оформляются следующим образом:

Финансирование. Работа выполнена при поддержке <...>.

• Информированное согласие пациентов

Данный раздел необходим при публикации статей с авторскими исследованиями и описаниями клинических случаев. Авторы должны предоставить в редакцию письменное информированное согласие больного на распространение информации и сообщить об этом в статье:

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

• Соблюдение прав животных при проведении исследования

Пример оформления раздела:

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.

При несоответствии рукописи перечисленным требованиям, в рассмотрении статьи авторам будет отказано.

Общие положения

• Оплата публикации

Все статьи принимаются к печати бесплатно.

• Авторские права

Авторы, публикующие статьи в данном журнале, соглашаются на следующее:

Авторы сохраняют за собой авторские права и предоставляют журналу право первой публикации работы, которая по истечении 6 месяцев после публикации автоматически лицензируется на условиях Creative Commons Attribution License, которая позволяет другим распространять данную работу с обязательным сохранением ссылок на авторов оригинальной работы и оригинальную публикацию в этом журнале.

Авторы имеют право размещать свою работу в сети Интернет (например, в институтском хранилище или на персональном сайте) до и во время процесса рассмотрения ее данным журналом, так как это может привести к продуктивному обсуждению и большему количеству ссылок на данную работу (См. The Effect of Open Access).

• Приватность

Имена и адреса электронной почты, введенные на сайте этого журнала, будут использованы исключительно для целей, обозначенных этим журналом, и не будут использованы для каких-либо других целей или предоставлены другим лицам и организациям.

Рассмотрение статьи на предмет публикации занимает не менее 8 недель.

Все поступающие статьи рецензируются. Рецензия является анонимной. Корреспонденция с рецензентом ведётся через ответственного секретаря. После окончательного решения о принятии или отклонении работы все авторы получают электронное информационное письмо с уведомлением о прочтении.

Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.

При обнаружении автором ошибок в статье до момента публикации или в случае, когда редактор сообщает автору, что получил сведения от третьей стороны о существенных ошибках в статье, автор обязан взаимодействовать с редактором журнала с целью скорейшего изъятия статьи из вёрстки и ее исправления.

Если ошибки обнаружены после выхода номера журнала, автор также обязан взаимодействовать с редактором и следовать его инструкциям по решению данного вопроса в индивидуальном порядке.

Авторы могут присылать свои материалы по электронной почте на адреса:

biotherapy_rbj@mail.ru или **rbjournal@onc.ru**

Также статью можно подать через редакционную систему на сайте журнала.

11. Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Рукопись может быть возвращена авторам, если она им не соответствует.

1. Эта статья ранее не была опубликована, а также не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале (или дано объяснение этого в Комментариях для редактора).
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате документа OpenOffice, Microsoft Word, RTF или WordPerfect.
3. Приведены полные интернет-адреса (URL) для ссылок там, где это возможно.
4. Текст набран с полупрозрачным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 12 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание (за исключением интернет-адресов).
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям, описанным в Руководстве для авторов, расположенном на странице «О журнале».
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то выполнены требования документа Обеспечение слепого рецензирования.