

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

Российский Биотерапевтический Журнал 2022 • Том 21 • № 2



Russian Journal
of Biotherapy

2

ТОМ 21
2022

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

2 ^{ТОМ 21}
'22

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: biotherapy_rbj@mail.ru
rjournal@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
Корректор Т.Н. Помилуйко

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.
2022. Том 21. № 2. 1–84.
Сдано в печать: 25.07.2022.
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2022

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., профессор кафедры онкологии и рентгенодиагностики Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», президент АНО «Национальный Альянс специалистов по опухолям наружных локализаций» (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 гемопоза 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

2 VOL. 21
'22

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
rjournal@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
Proofreader T.N. Pomiluyko
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: ПИИ № 77-11695

dated 21.01.2002;

ПИИ № ФС77-53039

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. 2022. Volume 21.

No 2. 1–84. Submitted: 25.07.2022.

© PH "ABV-Press", 2022

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 Nizhgorodsky 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, Professor of Department of Oncology and Radiology of the Institute of Medicine, RUDN University, President of the National Alliance of Specialists in Tumors of External Localization (Moscow, Russia)

Ilya V. Ulasov, PhD, DSc, Leading Researcher, Leader of the Experimental Biotherapy and Diagnostics Group of the Institute of Regenerative Medicine, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Yuri Z. Estrin, PhD, DSc, Honorary Doctor of the Russian Academy of Sciences, Fellow of the Australian Academy of Science, Foreign member of the Russian Academy of Sciences, Professor of Department of Materials Science and Engineering, Monash University (Clayton, Australia)

EDITORIAL COUNCIL

Maria A. Baryshnikova, PhD, Head of Laboratory of Experimental Diagnostic and Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Olga A. Bocharova, PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Immunopharmacology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Lev V. Demidov, MD, PhD, DSc, Professor, Head of Surgical Department No 10 of Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Pavel K. Ivanov, PhD, DSc, Head of Laboratory of Medical Biotechnology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Zaira G. Kadagidze, MD, PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of Centralized Clinical-Laboratory Department, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Vyacheslav S. Kosorukov, PhD, Director of Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Irina Yu. Kubasova, PhD, Scientific Registrar, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Nikolay N. Tupitsyn, PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Immunology of Hematopoiesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Irina Zh. Shubina, PhD, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Cell Immunity, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

- Е.А. Погодина, И.Ж. Шубина, А.В. Лобов, П.И. Иванова, Н.Ю. Соколов*
Противоопухолевая иммунотерапия и COVID-19 у онкологических пациентов 10
- И.О. Чикилева, И.Ж. Шубина, М.В. Киселевский*
Современные противовирусные биомедицинские клеточные продукты и перспективы их применения в терапии COVID-19 19

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- А.В. Калугин, Д.В. Новиков, М.Е. Мамаева, А.В. Алясова, Х.М. Ариуа, В.В. Новиков*
Присутствие мРНК раково-тестикулярных генов в опухоли и периферической крови больных раком эндометрия 33
- Ф.К. Бердова, Т.А. Григорьева, И.К. Воротников, Н.Н. Тупицын*
Молекулярные подтипы и иммунная система костного мозга в прогнозе рака молочной железы 40
- Т.Н. Заботина, А.И. Черткова, А.А. Борунова, Е.Н. Захарова, Э.К. Шоуа, И.Б. Шоуа, В.Т. Циклаури, И.А. Задеренко, Э.Г. Кадагидзе*
Влияние пола и возраста больных раком слизистой оболочки полости рта на фенотип системного и локального иммунитета 47
- С.В. Чулкова, Е.Н. Шолохова, И.В. Поддубная, И.С. Стилиди, Н.Н. Тупицын*
HLA-мономорфные детерминанты первичной опухоли у больных раком молочной железы 56
- О.В. Корытов*
Влияние поздних лучевых осложнений на качество жизни и отдаленную выживаемость пациентов, получавших облучение органов малого таза 67
- Е.М. Бакурова, И.В. Василенко, Ю.Д. Турсунова, Н.М. Добаева, Б.Г. Борзенко, В.Н. Ельский*
Особенности активности ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы в солидных опухолях 73

ЮБИЛЕЙ

- К 70-летию Виктора Владимировича НОВИКОВА 82**

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ 83

REVIEWS

- Ekaterina A. Pogodina, Irina Zh. Shubina, Anton V. Lobov, Polina I. Ivanova, Nikolay Yu. Sokolov*
Antitumor immunotherapy and COVID-19 in cancer patients 10
- Irina O. Chikileva, Irina Zh. Shubina, Mikhail V. Kiselevskiy*
Modern antiviral biomedical cell products and their applications for COVID-19 therapy 19

ORIGINAL REPORTS

- Alexander V. Kalugin, Dmitriy V. Novikov, Marina E. Mamaeva, Anna V. Alyasova, Khalil M. Arioua, Viktor V. Novikov*
Cancer-testis genes mRNA presence in tumor lesion and peripheral blood of endometrial cancer patients 33
- Farangiz K. Berdova, Tatiana A. Grigorieva, Igor K. Vorotnikov, Nikolay N. Tupitsyn*
Breast cancer molecular subtypes and bone marrow immune system in patient's prognosis 40
- Tatiana N. Zabolina, Antonina I. Chertkova, Anna A. Borunova, Elena N. Zakharova, Esma K. Shoua, Ilona B. Shoua, Vasily T. Tsiklauri, Igor A. Zaderenko, Zaira G. Kadagidze*
Influence of gender and age of patients with oral mucosa cancer on the phenotype of systemic and local immunity 47
- Svetlana V. Chulkova, Elena N. Sholokhova, Irina V. Poddubnaya, Ivan S. Stylidi, Nikolay N. Tupitsyn*
HLA-monomorphic determinants of the primary tumor in breast cancer patients. 56
- Oleg V. Korytov*
Influence of late radiation complications on long-term survival of patients treated with irradiation of the pelvic organs 67
- Elena M. Bakurova, Inna V. Vasilenko, Yulia D. Tursunova, Natalya M. Dobaeva, Berta G. Borzenko, Viktor N. Yelsky*
The features of enzymes activity to nucleoside and antioxidant systems in solid tumors 73

JUBILEE

- To the 70th anniversary of Viktor Vladimirovich NOVIKOV. 82**

INFORMATION FOR AUTHORS 83

Противоопухолевая иммунотерапия и COVID-19 у онкологических пациентов

Е.А. Погодина¹, И.Ж. Шубина², А.В. Лобов¹, П.И. Иванова¹, Н.Ю. Соколов³

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

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

³ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 5

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

Взаимодействие врожденного и адаптивного иммунитета необходимо для реализации иммунного ответа на SARS-CoV-2. Врожденный иммунитет служит первой линией защиты организма быстрым и неспецифическим образом. Адаптивная иммунная реакция протекает медленнее, формируя специфический ответ на антигены. И врожденный, и адаптивный иммунный ответ имеют большое значение в патогенезе COVID-19. Изменение иммунного статуса, ведущее к нарушению иммунных реакций, ассоциируется с более тяжелым течением инфекционных заболеваний, в том числе COVID-19. У онкологических пациентов часто наблюдается иммуносупрессия как в результате переносимого заболевания, так и в результате проводимого лечения, и вследствие этого они подвержены большому риску тяжелого течения COVID-19.

В настоящем обзоре рассматриваются публикации, связанные с изучением иммунного ответа на коронавирусную инфекцию у онкологических пациентов, в частности получающих противоопухолевую иммунотерапию.

Обсуждаются различные ретроспективные и проспективные исследования по оценке влияния инфекции SARS-CoV-2 на эффективность лечения и статус онкологических пациентов. Обнаружено, что в большей степени негативное влияние инфекции сказывается на пациентах, получающих химиотерапию, пациентах с гематобластозами, раком легких, метастатическими злокачественными новообразованиями и поздней стадией онкологического заболевания. Определенным фактором риска признан пожилой возраст – старше 65 лет.

На основе результатов изучения механизма действия иммунотерапии ингибиторами контрольных точек и иммунного ответа при коронавирусной инфекции предполагалось, что ингибиторы контрольных точек могут индуцировать иммунокомпетентность у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2. Существующие противоречивые данные пока не позволяют с уверенностью утверждать, что применение ингибиторов контрольных точек у онкологических больных вызывает повышенную заболеваемость инфекцией SARS-CoV-2 или повышенную смертность от COVID-19.

Требуется интенсификация экспериментальных и клинических исследований, чтобы определить роль противоопухолевой иммунотерапии в развитии COVID-19 у онкологических пациентов.

Ключевые слова: иммунитет, COVID-19, онкология, ингибиторы контрольных точек, противоопухолевая иммунотерапия

Для цитирования: Погодина Е.А., Шубина И.Ж., Лобов А.В. и др. Противоопухолевая иммунотерапия и COVID-19 у онкологических пациентов. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(2):10–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-10-18

Antitumor immunotherapy and COVID-19 in cancer patients

Ekaterina A. Pogodina¹, Irina Zh. Shubina², Anton V. Lobov¹, Polina I. Ivanova¹, Nikolay Yu. Sokolov³

¹Exacte Labs LLC; Bld. 20, 2 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;

³S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Department of Healthcare; 5 2nd Botkinsky Proezd, Moscow 125284, Russia

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

The interaction of the innate and adaptive immunity is necessary for the immune response to SARS-CoV-2. The innate immunity serves as the body's first line of defense in a rapid and non-specific manner. The adaptive immune reaction proceeds more slowly, forming a specific response to antigens. Both innate and adaptive immune responses are very important in the pathogenesis of COVID-19. Alterations in the immune status leading to impaired immune responses are associated with more serious infectious diseases, including COVID-19. Patients with cancer are often immunosuppressed, both as a result of their disease and the specific treatment. As a result, they are at a more serious risk of acquiring COVID-19.

The aim of the paper is to review the literature concerning the immune response to the coronavirus disease in cancer patients, particularly, those who received antitumor immunotherapy.

The review considers various retrospective and prospective studies evaluating the impact of SARS-CoV-2 infection on the effectiveness of treatment and the status of patients with cancer. The researchers have found that the negative impact of the infection affects patients receiving chemotherapy, patients with hematological malignancies, lung cancer, metastatic malignant neoplasms and cancer patients with advanced cancer. The age over 65 years is recognized as a certain risk factor.

Moreover, on the basis of the data on the mechanism of action of the immunotherapy with checkpoint inhibitors and the immune response to coronavirus infection, it was assumed that immune checkpoint inhibitors can induce immunocompetence in patients infected with SARS-CoV-2. However, the existing data cannot completely support the statement that the use of immune checkpoint inhibitors in cancer patients with COVID-19 causes increased mortality or morbidity with SARS-CoV-2 infection.

Extensive experimental and clinical studies are required to determine the role of cancer immunotherapy in COVID-19 patients with cancer.

Keywords: immunity, COVID-19, cancer, immune checkpoint inhibitors, antitumor immunotherapy

For citation: Pogodina E.A., Shubina I.Zh., Lobov A.V. et al. Antitumor immunotherapy and COVID-19 in cancer patients. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2022;21(2):10–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-10-18

Введение

Накопленные к настоящему времени знания о наиболее серьезных коронавирусных инфекциях человека, а именно SARS-CoV, CoV-2 и MERS-CoV, указывают на критическое влияние полифункциональных ответов CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток, усиленных, вероятно, ранней продукцией иммуноглобулина (IgM и IgA, а затем IgG).

Хотя представляется очевидным, что реакция Т-лимфоцитов может обеспечить эффективную и длительную защиту от SARS-CoV-2, роль гуморальных реакций все еще остается неясной. Парадоксально, но смертность, связанная с COVID-19, в основном является результатом нарушения регуляции иммунного ответа на вирус, а не повреждения органов из-за самой репликации вируса [1].

Адекватное взаимодействие двух звеньев иммунной системы – врожденного и адаптивного иммунитета – необходимо для реализации иммунного ответа на проникновение патогена в организм человека. Врожденный иммунитет служит первой линией защиты организма быстрым и неспецифичным образом. Наряду с врожденными иммунными реакциями иммунный ответ также сопровождается активацией клеток адаптивного звена, которые передают антигенспецифические сигналы Т-клеткам, которые, в свою очередь, дифференцируются в эффекторные Т-клетки с про- или противовоспалительной продукцией цитокинов, и В-клеткам, которые дифферен-

цируются в плазматические клетки со специфической продукцией антител (рис. 1).

Врожденный иммунный ответ формируется быстро – в течение нескольких часов после заражения. Он замедляет репликацию и распространение вируса и одновременно запускает адаптивный иммунный ответ. Адаптивная иммунная реакция протекает медленнее из-за необходимости отбора и пролиферации вирусспецифических клеток из больших пулов наивных В- и Т-клеток, специфичных к различным молекулярным структурам и последовательностям. Для формирования соответствующего адаптивного ответа с образованием достаточного количества клеток для борьбы с вирусной инфекцией требуется примерно 6–10 дней после праймирования вирусным антигеном.

Адаптивный иммунный ответ имеет большое значение в патогенезе COVID-19 [2]. Обычно при контакте с SARS-CoV-2 того периода времени, в течение которого реализуется реакция врожденного иммунитета, достаточно, чтобы привести к бессимптомной инфекции (приблизительно в 40 % случаев инфекция SARS-CoV-2 протекает бессимптомно) или клинически «легкому» заболеванию (легкое течение заболевания – это клиническое определение COVID-19, означающее, что госпитализация не требуется), поскольку ответ Т-клеток и продукция антител возникают относительно быстро и это позволяет успешно контролировать инфекцию (рис. 2). Наличие Т-клеток

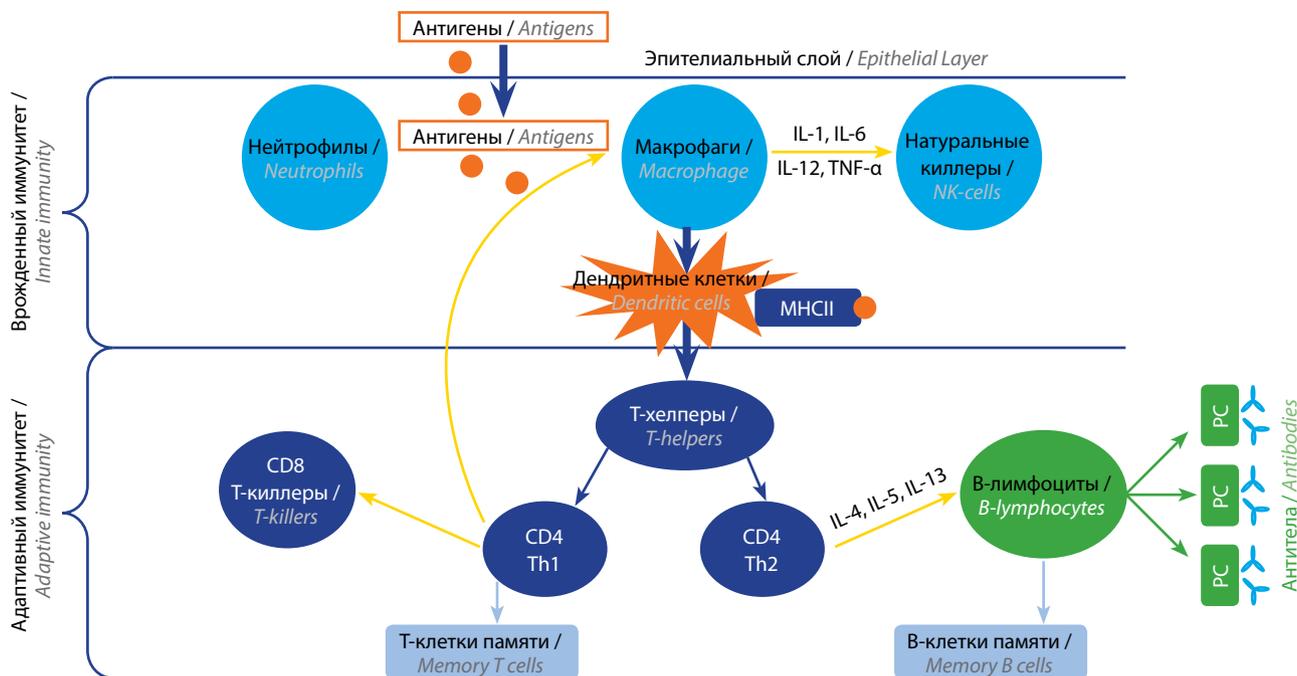


Рис. 1. Основные компоненты врожденного и адаптивного иммунитета при иммунном ответе на вирусную инфекцию. Компоненты врожденного иммунитета неспецифическим образом реагируют на антигены. Компоненты адаптивного иммунитета: вирусспецифические $CD4^+$ -, $CD8^+$ -Т-клетки и антитела (продуцируемые В-клетками). Т- и В-клетки памяти дают возможность сохранить информацию для ускоренного специфического иммунного ответа при повторном контакте с антигеном

Fig. 1. Major components of the innate and adaptive immune response to the viral infection. The innate immunity responds to antigens in a non-specific way. The adaptive immunity includes virus-specific $CD4^+$ T cells, $CD8^+$ T cells and antibodies (produced by B cells). Besides, T- and B-memory cells make it possible to store information for a rapid specific immune response upon repeated contact with the antigen

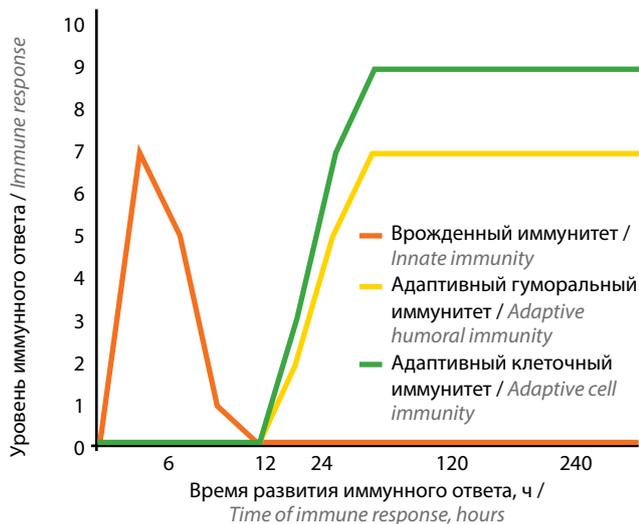


Рис. 2. Схема временной составляющей иммунного ответа при вирусной инфекции. При обычном течении инфекции COVID-19 врожденный иммунитет на некоторое время задерживает развитие заболевания и этой отсрочки достаточно для активации адаптивного иммунного ответа — клеточного и гуморального. Благодаря этому механизму инфекция часто протекает бессимптомно либо в легкой форме, т. е. не требующей госпитализации

Fig. 2. Schematic presentation of the time periods for the immune response to the viral infection. During common course of COVID-19, the innate immunity may postpone the development of the disease for some time, and this delay is enough to activate the adaptive cellular and humoral immune response. Due to this mechanism, the infection often proceeds asymptotically or in a mild form, i. e. does not require hospitalization

и антител связано с успешным разрешением случаев легкого течения COVID-19 [3].

Таким образом, вирусспецифические $CD4^+$ -Т-клетки, $CD8^+$ -Т-клетки и антитела (продуцируемые В-клетками) составляют 3 основных компонента острого адаптивного иммунитета к вирусной инфекции.

Изменение иммунного статуса, ведущее к нарушению иммунных реакций, ассоциируется с более тяжелым течением инфекционных заболеваний, в том числе COVID-19. У онкологических пациентов часто наблюдается иммуносупрессия в результате проводимого лечения, вследствие этого они подвержены большему риску тяжелого течения COVID-19 и связанной с этим заболеванием смерти, а также развития серьезных осложнений в результате вирусной инфекции. Кроме того, само по себе основное заболевание может вызывать иммунодефицитное состояние у онкологических пациентов. Во многих исследованиях было показано, что COVID-19 увеличивает риск развития осложнений и общий риск смерти у пациентов с различными видами злокачественных заболеваний [4–8]. Например, в исследовании M. Dai и соавт. обнаружено, что онкологические пациенты в 3 раза более подвержены риску неблагоприятного исхода в связи с COVID-19 по сравнению с населением в целом, поскольку их иммунная система может быть ослаблена злокачественным новообразованием

(ЗНО) и влиянием проводимой терапии [6]. Были проанализированы данные 105 онкологических и 536 сопоставимых по возрасту неонкологических пациентов с COVID-19. У пациентов с ЗНО наблюдались относительно высокий уровень смертности, высокий уровень госпитализации в отделение интенсивной терапии, высокая вероятность применения инвазивной искусственной вентиляции легких и высокий риск возникновения критических симптомов, связанных с COVID-19, в сравнении с неонкологическими пациентами [6].

У пациентов с гематологическими заболеваниями, включая лейкоз, лимфому и миелому, наблюдался самый высокий уровень смертности, далее по оценке высокого уровня смертности отмечали пациентов с раком легких и пищевода [9]. Кроме того, у пациентов с метастатическим раком IV стадии и COVID-19 регистрировали общий высокий риск смерти, госпитализации в отделение интенсивной терапии, развития тяжелых состояний и использования искусственной вентиляции легких [6]. В многочисленных ретроспективных исследованиях отмечается, что различные виды специфического лечения онкологических пациентов по-разному влияют на реакцию организма на течение и исход заболевания COVID-19 [4–6, 10–12]. Следует также учитывать, что подавляющее большинство онкологических пациентов – это пациенты пожилого возраста, что является дополнительным фактором риска [13]. В частности, в ретроспективное исследование пациентов с подтвержденным COVID-19 было включено 312 онкологических больных и 4833 добровольца без онкологических заболеваний. Полученные результаты показали, что у пациентов с онкологическими заболеваниями наблюдалась более высокая смертность на фоне инфекции SARS-CoV-2 по сравнению с пациентами без онкологии. При этом отмечается, что пациенты с онкологическими заболеваниями в возрасте 65 лет и старше, а также с сопутствующими заболеваниями имеют наибольший риск смерти. Кроме того, на показатели смертности влияют недавно проведенная противоопухолевая терапия и статус заболевания [13].

Иммунологические показатели у онкологических и неонкологических больных с COVID-19

Результаты исследования J. Tian и соавт. [14] показали, что уровни провоспалительных цитокинов составляли в среднем: фактор некроза опухоли α – 8,7 и 6,9 пг/мл у онкологических ($n = 89$) и неонкологических ($n = 336$) пациентов соответственно ($p = 0,004$); интерлейкин 6 – 12,8 и 4,9 пг/мл у онкологических ($n = 138$) и неонкологических ($n = 350$) пациентов соответственно ($p < 0,0001$); интерлейкин 2R – 615 и 535 Ед/мл у онкологических ($n = 79$) и неонколо-

гических ($n = 340$) пациентов соответственно ($p = 0,012$). Кроме того, связанные с инфекцией биомаркеры были выше у онкологических больных, например уровень прокальцитонина в среднем составлял 0,3 и 0,1 нг/мл у онкологических ($n = 161$) и неонкологических ($n = 251$) пациентов соответственно ($p = 0,0041$), уровень С-реактивного белка – 46,4 и 40,7 мг/л у онкологических ($n = 91$) и неонкологических ($n = 246$) пациентов соответственно ($p = 0,047$).

Также у больных с ЗНО наблюдалось значительное снижение количества лимфоцитов, в том числе CD4⁺-Т-клеток (370,0 и 625,5 кл/мкл у онкологических ($n = 37$) и неонкологических ($n = 82$) пациентов соответственно, $p < 0,0001$) и CD8⁺-Т-клеток (206,0 и 305,0 кл/мкл у онкологических ($n = 43$) и неонкологических ($n = 82$) пациентов соответственно, $p < 0,0081$). Это может быть фактором риска для онкологических больных, что делает их более уязвимыми для инфекции SARS-CoV-2 [14].

С другой стороны, результаты исследования, проведенного B. Diao и соавт., показали, что количество Т-клеток было значительно снижено и функционально истощено также у пациентов с COVID-19 [15]. Количество CD8⁺- и CD4⁺-Т-клеток отрицательно коррелировало с выживаемостью пациентов с COVID-19. Кроме того, на большем количестве CD8⁺- и CD4⁺-Т-клеток регистрировали повышенную экспрессию белка программируемой клеточной смерти 1 (PD-1), Т-клеточного иммуноглобулина и муцинодержательного домена 3 (Tim-3). На некоторых опухолевых клетках наблюдается повышенная экспрессия PD-L1 – трансмембранного белка, являющегося лигандом для PD-1. Связывание PD-L1 с PD-1 активирует последующую передачу сигналов рецептора PD-1 на Т-клетки, что ингибирует их пролиферацию и цитотоксическую активность [16]. На основании этого механизма действия сигнального пути PD-1 и PD-L1 некоторые авторы предполагают, что высокая экспрессия PD-L1 у онкологических больных может делать их более восприимчивыми к чужеродным патогенам, таким как SARS-CoV-2 [17].

Антителозависимый иммунный ответ на SARS-CoV-2 у онкологических пациентов в сравнительных исследованиях

В ходе исследования A. Marra и соавт. было проведено сравнение образования антител (оценка уровня сероконверсии) против антигена SARS-CoV-2 у онкологических больных и медработников с подтвержденным COVID-19 или клинически обоснованными подозрениями на COVID-19. В исследование было включено 166 человек, в том числе 61 (36,7 %) онкологический больной и 105 (63,3 %) медицинских работников. В целом у 86 (51,8 %) человек была подтверждена инфекция SARS-CoV-2 с помощью полимеразной

цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) мазка из носоглотки, а у 60 (36,2 %) – клиническое подозрение на COVID-19. Среднее время от появления симптомов (для случаев, не тестированных методом ОТ-ПЦР) или подтверждения SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР до анализа сывороточных антител составляло 17 дней (межквартильный диапазон – 26). В популяции с подтвержденным тестом ОТ-ПЦР 83,8 % случаев были положительными по IgG. Различий в качественной положительной оценке IgG между онкологическими больными и медицинскими работниками не наблюдалось (87,9 и 80,5 % соответственно, $p = 0,39$). Авторы считают, что положительный результат на SARS-CoV-2 теста ПЦР по материалу из носоглотки при отсутствии клинических доказательств требует дополнительного исследования [18].

В работе S. Yazaki и соавт. [19] аналогичным образом было проведено сравнение образования антител у онкологических пациентов и врачей. В этом исследовании уровень сывороточных антител к SARS-CoV-2 также не различался между 2 группами. При этом, однако, полученные результаты показали, что системная терапия, включая химиотерапию и ингибиторы контрольных точек (ИКТ), могут влиять на иммунный ответ на SARS-CoV-2. Например, уровни антител N-IgG и S-IgG у пациентов были значительно ниже, чем у медицинских работников. Кроме того, среди пациентов уровни N-IgG были значительно ниже у тех, кто получал химиотерапию, чем у тех, кто ее не получал.

Гуморальный иммунный ответ на SARS-CoV-2 у пациентов с ЗНО оценили M. Esperança-Martins и соавт. в одноцентровом ретроспективном исследовании [20], в которое были включены взрослые пациенты с SARS-CoV-2, госпитализированные с 15 марта по 17 июня 2020 г. Наличие антител к рецептору SARS-CoV-2, связывающему домену или спайковому белку IgM, IgG и IgA количественно определяли в образцах сыворотки крови пациентов. Целями исследования были оценка уровня гуморального иммунного ответа к SARS-CoV-2; сравнение этого уровня у пациентов с разными ЗНО, стадиями и методами лечения; уточнение взаимосвязи между гуморальным ответом и клиническим результатом лечения у онкологических пациентов; сравнение уровня антителозависимого ответа у онкологических или неонкологических пациентов, инфицированных SARS-CoV-2. Всего оценивали данные 72 пациентов с SARS-CoV-2 (19 онкологических пациентов, 53 участника контрольной группы). Около 90 % результатов контрольной группы показали устойчивый серологический ответ. Среди пациентов с онкологическими заболеваниями выраженный ответ был подтвержден у 57,9 %, при этом у 42,1 % наблюдался незначительный ответ.

Химиотерапия в течение 14 дней до положительного результата была единственным фактором, статистически доказанным, связанным со слабыми серологическими реакциями у пациентов с ЗНО. Существенных различий по клиническим результатам между пациентами с выраженной и слабой иммунной реакцией не наблюдалось. Титры всех IgG, IgM, IgA и общих антител были значительно ниже у пациентов с ЗНО по сравнению с пациентами без онкологического заболевания. Таким образом, у значительной части онкологических пациентов развивается соответствующий гуморальный иммунный ответ. Предшествующая химиотерапия может быть связана со слабыми серологическими реакциями у пациентов с ЗНО. У онкологических пациентов развивается более слабый антителозависимый ответ на SARS-CoV-2 по сравнению с пациентами без ЗНО [20].

В работе A. Thakkar и соавт. [17] обсуждается ретроспективное когортное исследование пациентов с онкологическими заболеваниями, прошедших тестирование на IgG к SARS-CoV-2. Тест был проведен у 261 онкологического пациента, и результаты показали высокий уровень сероконверсии (92 %). Однако значительно более низкая сероконверсия наблюдалась у пациентов с гемобластомами (82 %), у пациентов, получавших терапию анти-CD-20 антителами (59 %) и трансплантацию стволовых клеток (60 %). Примечательно, что у всех 17 пациентов, получавших иммунотерапию, в том числе 16 пациентов, получавших моноклональные антитела против PD-1/PD-L1, развились антитела IgG к SARS-CoV-2 (100 % сероконверсия). При проведении такого же теста на обнаружение IgG к SARS-CoV-2 в общей популяции сообщалось, что уровень сероконверсии составляет 90–100 % [21, 22]. Действительно, в случайно подобранной когорте из 1008 пациентов с положительным результатом ПЦР на SARS-CoV-2, у которых был проведен тест на антитела, уровень сероконверсии составил 91 %, что почти идентично общему уровню сероконверсии в представленной когорте онкологических пациентов [17].

В небольшом исследовании T. Qin и соавт. [23] было проведено секвенирование одноклеточной РНК в образцах периферической крови 3 здоровых доноров, 4 пациентов с COVID-19 и 4 пациентов с COVID-19 и прогрессирующим гинекологическим злокачественным заболеванием до и после противоопухолевого лечения. Все пациенты с острой инфекцией COVID-19 были вылечены. Интересно, что молекулярные особенности периферической крови при гинекологическом ЗНО были аналогичны таковым у пациентов с COVID-19 без ЗНО, что позволяет предположить, что выздоравливающие от COVID-19 с гинекологическими ЗНО не имеют серьезных иммунологических изменений и у них может формироваться

иммунологическая память подобно пациентам с COVID-19 без ЗНО. Более того, химиотерапия, проводимая этим пациентам, в основном вызывала нейтропению, оказывая незначительное влияние на пропорцию и функциональный фенотип Т- и В-клеток, а также на клональную экспансию Т-клеток. Примечательно, что лечение анти-PD-L1 значительно увеличивало показатели цитотоксичности NK- и Т-клеток и способствовало клональной экспансии Т-клеток у этих пациентов. Авторы предполагают, что Т-клетки могут защитить пациентов от повторного заражения вирусом SARS-CoV-2, а лечение анти-PD-L1 может усилить противовирусную активность Т-клеток [23].

Противоопухолевая иммунотерапия и иммунный ответ на SARS-CoV-2

У пациентов с тяжелым течением инфекции SARS-CoV-2 значительно увеличивается количество нефункциональных CD8⁺-Т-клеток в сравнении с пациентами с умеренными симптомами. Тем не менее функциональная активность CD8⁺-Т-клеток может быть восстановлена блокадой PD-1 и CTLA-4, тем самым повышая антигенспецифические реакции и противовирусную активность в отношении SARS-CoV-2 [24]. Кроме того, исследования *in vivo* продемонстрировали быструю стимуляцию экспрессии PD-1 после активации CD8⁺-Т-клеток при заражении вирусом лимфоцитарного хориоменингита. На ранней стадии острого заболевания блокирование пути PD-1 с использованием антител против PD-L1 или против PD-1 способствует активации ответа CD8⁺-Т-клеток, специфичных к вирусу, за счет ускоренного выведения инфекционных факторов [25]. Однако исследований, подтверждающих положительное влияние иммунотерапии на исход лечения COVID-19, пока недостаточно.

В работе С.М. Da Costa и соавт. описано лечение пембролизумабом пациента с карциномой Меркеля, который перенес тяжелую инфекцию и респираторный дистресс-синдром, осложненный острым поражением почек, что привело к его госпитализации в отделение интенсивной терапии. Пациент был выписан через 3 мес после длительного восстановления [26]. В двух других работах описаны случаи пациентов с меланомой, получавших анти-PD-1 терапию, которые полностью излечились от COVID-19 после проявления легких симптомов инфекции [27].

Одно из первых исследований, наиболее полно представившее результаты анти-PD-1-терапии 41 из 69 пациентов с раком легких, показало, что блокада PD-1 не была связана с повышенным риском тяжелого течения COVID-19 и, по-видимому, не влияет на степень тяжести заболевания COVID-19 у пациентов с раком легких [28].

Согласно анализу базы данных TERAVOLT никакой связи между видами полученного противоопухолевого лечения, включая химиотерапию, ингибиторы тирозинкиназы, химиотерапию в сочетании с ИКТ и ИКТ в качестве монотерапии, у 147 пациентов с ЗНО торакальной локализации и смертью, вызванной COVID-19, не было [29].

М. Dai и соавт. обнаружили, что у небольшого числа пациентов из 105 онкологических больных, которым проводилась иммунотерапия, были тяжелая форма заболевания COVID-19 и повышенная смертность от него [6]. В ходе комплексного проспективного исследования CAPTURE по мониторингу иммунного ответа опухоли на SARS-CoV-2 оценивали противовирусный ответ при COVID-19 при разных типах рака. Было показано, что при многих видах ЗНО иммунный ответ резко нарушается, а новые инфекции встречаются чаще [30].

Недавно было завершено крупнейшее исследование онкологических пациентов с COVID-19. Были изучены результаты из баз данных Консорциума по COVID-19 и раку (CCC19) о более чем 900 пациентах с текущим или предыдущим онкологическим заболеванием [10]. Менее 4 % пациентов получали какое-либо лечение, включающее иммунотерапию (например, ИКТ, аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток или адоптивную клеточную терапию). Из 928 обследованных пациентов у 38 была диагностирована меланома. Прогностическим фактором, который был достоверно связан с двукратным увеличением 30-дневного риска смерти, был пожилой возраст. Для мужчин коэффициент вероятности составляет 1,63 (95 % доверительный интервал (ДИ) 1,07–2,48). Кроме того, отношение шансов на 10-летнее увеличение возраста составляет 1,84 (95 % ДИ 1,53–2,21). К сожалению, не было проведено какого-либо анализа взаимосвязи между различными видами получаемой терапии (например, иммунотерапии) и заболеваемостью COVID-19 [10].

Итальянские исследователи М.А. Isgro и соавт. [31] изучали наличие IgM и/или IgG, ассоциированных с SARS-CoV-2, в 3 разных группах: онкологические больные, получавшие инновационную иммунотерапию ИКТ, проходящие стандартную химиотерапию, и медицинские работники. У 9 (3,1 %) из 287 пациентов с терапией ИКТ оказались IgM- и/или IgG-положительные результаты тестирования, что было значительно ниже по сравнению с числом Ig-положительных пациентов, получавших химиотерапию (39 (6,5 %) Ig-положительных из 598 пациентов) ($p = 0,04$). Не было статистически значимой разницы между группой пациентов с терапией ИКТ и медицинскими работниками: у 48 (4,6 %) из 1050 медработников зарегистрирован положительный результат по IgM и/или IgG. Авторы провели статистический анализ с помощью

регрессионной логистической модели по определению корреляции пола, стадии заболевания и влияния лечения на серопозитивность. Оказалось, что иммунотерапия ИКТ была единственным протективным фактором, достоверно связанным ($p = 0,03$) с серопозитивностью (отношение шансов 0,41, 95 % ДИ 0,18–0,91). На основании предварительных данных авторы предполагают, что терапия ИКТ является защитным фактором от заражения SARS-CoV-2 [31].

В проспективном исследовании N. Yatim и соавт. [32], включившем 292 пациента с меланомой, половина из которых получали терапию ИКТ, было зарегистрировано 15 пациентов с COVID-19 в острой фазе или на стадии выздоровления. У этих пациентов были изучены транскриптомный, протеомный и клеточный профили. Обнаружено, что лечение ИКТ не было связано с тяжелой формой COVID-19 и не влияло на индукцию воспалительных реакций и повышение продукции интерферона I типа. Результаты расширенного фенотипирования показали увеличение количества эффекторных Т-клеток памяти CD8⁺, повышенную активацию Т-клеток и нарушение индукции плазмобластов у пациентов с COVID-19, получавших ИКТ. Оценка специфического адаптивного иммунитета у выздоравливающих пациентов выявила более высокие показатели спайковых (S), нуклеопротеиновых (N) и мембранных (M) антигенспецифических Т-клеточных ответов и аналогичную индукцию спайкспецифических антител. Полученные результаты свидетельствуют о том, что иммунотерапия ИКТ при COVID-19 усиливает Т-клеточный иммунитет, не усугубляя воспаление.

У значительной части пациентов, выздоровевших от COVID-19, наблюдаются симптомы, ассоциированные с COVID-19 даже через несколько месяцев после выписки из больницы. В работе С. Loretelli и соавт. [33] был проведен глубокий анализ иммунологических характеристик пациентов, выздоровевших от COVID-19. Количество Т-клеток у наблюдаемых пациентов было снижено, при этом увеличилась доля PD-1⁺-Т-клеток по сравнению со здоровыми донорами контрольной группы. Уровни интерлейкина 1 β , 1RA и 8 в плазме крови также были повышены у пациентов, выздоровевших от COVID-19. Измененный иммунофенотип проявлялся в форме ослабленного ответа Т-клеток *ex vivo* как на неспецифическую, так и на специфическую стимуляцию, что свидетельствовало о дисфункции Т-клеток, включая слабую реакцию на антигены SARS-CoV-2. Также наблюдались измененные уровни растворимого в плазме белка PD-L1, а также метилирования промотора PD-1 и нацеленного на PD-1 miR-15-5p в CD8⁺-Т-клетках, что указывает на аномальную функцию сигнального

пути иммунных контрольных точек PD-1/PD-L1. Примечательно, что блокада PD-1 *ex vivo* привела практически к нормализации иммунофенотипа и восстановлению функции Т-клеток и наблюдаемых иммунных нарушений после COVID-19; также был отмечен повышенный опосредованный Т-клетками ответ на пептиды SARS-CoV-2. Кроме того, в тесте нейтрализации блокада PD-1 не изменяла способность Т-клеток нейтрализовать спайковую псевдотипированную лентивирусную инфекцию SARS-CoV-2. Исследователи пришли к заключению, что ингибирование иммунных контрольных точек восстанавливает иммунные нарушения после COVID-19 и стимулирует иммунный ответ против SARS-CoV-2 [33].

В результате тщательно проведенного анализа авторы специального обзора, посвященного влиянию анти-PD-1-терапии на течение COVID-19, пришли к заключению, что иммунотерапия ИКТ (против PD-1, PD-L1 и/или CTLA-4) не повышает риск заражения SARS-CoV-2 [34].

Заключение

В связи со стремительно распространявшимся инфекционным заболеванием COVID-19 были проведены различные ретроспективные и проспективные исследования по оценке влияния этой инфекции на эффективность лечения и статус онкологических пациентов. Было обнаружено, что в большей степени негативное влияние инфекции сказывается на пациентах, получающих химиотерапию, пациентах с гематобластомами, раком легких, метастатическими ЗНО и поздней стадией ЗНО. Определенным фактором риска признан пожилой возраст старше 65 лет.

На основании данных о механизме действия иммунотерапии ИКТ и иммунного ответа при коронавирусной инфекции предполагалось, что ИКТ могут индуцировать иммунокомпетентность у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2. Однако к настоящему времени лишь ограниченные исследования могут указать на протективный эффект ИКТ против заражения SARS-CoV-2. Таким образом, существующие противоречивые данные пока не позволяют с уверенностью утверждать, что применение ИКТ у онкологических больных вызывает повышенную заболеваемость инфекцией SARS-CoV-2 или повышенную смертность от COVID-19. С практической точки зрения и с учетом механизма действия подобной терапии она, как правило, безопасна для онкологических больных с инфекцией SARS-CoV-2. Необходима интенсификация экспериментальных и клинических исследований, чтобы определить значение противоопухолевой иммунотерапии в развитии COVID-19 у онкологических пациентов.

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

- Melenotte C., Silvin A., Goubet A.G. et al. Immune responses during COVID-19 infection. *Oncoimmunology* 2020;9(1):1807836. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1807836
- 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
- 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
- Поляков А.А., Лунин В.В., Аббайсбейли Ф.М. и др. Вакцинация против SARS-CoV-2 в онкологической практике. *Онкогематология* 2021;16(2):70–80. DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-2-70-80
Polyakov A.A., Lunin V.V., Abbaysbeyli F.M. et al. Vaccination against SARS-CoV-2 in oncology. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2021;16(2):70–80 (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-2-70-80
- Каприн А.Д., Гамеева Е.В., Поляков А.А. и др. Влияние пандемии COVID-19 на онкологическую практику. *Сибирский онкологический журнал* 2020;19(3):5–22. DOI: 10.21294/1814-4861-2020-19-3-5-22
Kaprin A.D., Gameeva E.V., Polyakov A.A. et al. Impact of the COVID-19 pandemic on the oncological practice. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2020;19(3): 5–22. (In Russ.) DOI: 10.21294/1814-4861-2020-19-3-5-22
- Dai M., Liu D., Liu M. et al. Patients with cancer appear more vulnerable to SARS-CoV-2: a multicenter study during the COVID-19 outbreak. *Cancer Discov* 2020;10(6):783–91. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-0422
- Rogado J., Pangua C., Serrano-Montero G. et al. Covid-19 and lung cancer: a greater fatality rate? *Lung Cancer* 2020;146:19–22. DOI: 10.1016/j.lungcan.2020.05.034
- Zhang L., Zhu F., Xie L. et al. Clinical characteristics of COVID-19-infected cancer patients: a retrospective case study in three hospitals within Wuhan, China. *Ann Oncol* 2020;31(7):894–901. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.03.296
- 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
- Kuderer N.M., Choueiri T.K., Shah D.P. et al. Clinical impact of COVID-19 on patients with cancer (CCC19): a cohort study. *Lancet* 2020;395(10241):1907–18. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31187-9
- 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
- Mohseni Afshar Z., Hosseinzadeh R., Barary M. et al. Challenges posed by COVID-19 in cancer patients: a narrative review. *Cancer Med* 2022;11(4):1119–35. DOI: 10.1002/cam4.4519
- Lunski M.J., Burton J., Tawagi K. et al. Multivariate mortality analyses in COVID-19: comparing patients with cancer and patients without cancer in Louisiana. *Cancer* 2021;127(2):266–74. DOI: 10.1002/ncr.33243
- Tian J., Yuan X., Xiao J. et al. Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 disease severity in patients with cancer in Wuhan, China: a multicenter, retrospective, cohort study. *Lancet Oncol* 2020;21(7):893–903. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30309-0
- Diao B., Wang C., Tan Y. et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol* 2020;11:827. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00827
- McDermott D.F., Atkins M.B. PD-1 as a potential target in cancer therapy. *Cancer Med* 2013;2(5):662–73. DOI: 10.1002/cam4.106
- Thakkar A., Pradhan K., Jindal S. et al. Patterns of seroconversion for SARS-CoV-2-IgG in patients with malignant disease and association with anticancer therapy. *Nat Cancer* 2021;2(4):392–9. DOI: 10.1038/s43018-021-00191-y
- Marra A., Generali D., Zagami P. et al. Seroconversion in patients with cancer and oncology health care workers infected by SARS-CoV-2. *Ann Oncol* 2021;32(1):113–9. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.10.473
- 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
- Esperança-Martins M., Gonçalves L., Soares-Pinho I. et al. Humoral immune response of SARS-CoV-2-infected patients with cancer: influencing factors and mechanisms. *Oncologist* 2021;26(9):e1619–32. DOI: 10.1002/onco.13828
- Bryan A. Pepper G., Wener M.H. et al. Performance characteristics of the Abbott Architect SARS-CoV-2 IgG assay and seroprevalence in Boise, Idaho. *J Clin Microbiol* 2020;58(8):e00941–20. DOI: 10.1128/JCM.00941-20
- Chew K.L., Tan S.S., Saw S. et al. Clinical evaluation of serological IgG antibody response on the Abbott Architect for established SARS-CoV-2 infection. *Clin Microbiol Infect* 2020;26(9):1256.e9–e11. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.05.036
- Qin T., Guo E., Lu F. et al. Impact of chemotherapy and immunotherapy on the composition and function of immune cells in COVID-19 convalescent with gynecological tumors. *Aging (Albany NY)* 2021;13(23):24943–62. DOI: 10.18632/aging.203739
- Zheng H.Y., Zhang M., Yang C.X. et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* 2020;17(5):541–3. DOI: 10.1038/s41423-020-0401-3
- Ahn E., Araki K., Hashimoto M. et al. Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115(18):4749–54. DOI: 10.1073/pnas.1718217115
- Da Costa C.M., de Souza Z.S., Real Salgues A.C. et al. COVID-19 in a patient with advanced Merkel cell carcinoma receiving immunotherapy. *Immunotherapy* 2020;12(15):1133–8. DOI: 10.2217/imt-2020-0193
- Di Giacomo A.M., Gambale E., Monterisi S. et al. SARS-CoV-2 infection in patients with cancer undergoing checkpoint blockade: clinical course and outcome. *Eur J Cancer* 2020;133:1–3. DOI: 10.1016/j.ejca.2020.04.026
- Luo J., Rizvi H., Egger J.V. et al. Impact of PD-1 blockade on severity of COVID-19 in patients with lung cancers [published correction appears in *Cancer Discov* 2021;11(2):520]. *Cancer Discov* 2020;10(8):1121–8. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-0596
- Garassino M.C., Whisenant J.G., Huang L.C. et al. COVID-19 in patients with thoracic malignancies (TERAVOLT): first results of an international, registry-based, cohort study. *Lancet Oncol* 2020;21(7):914–22. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30314-4
- Au L., Boos L.A., Swerdlow A. et al. Cancer, COVID-19, and antiviral immunity: the CAPTURE study. *Cell* 2020;183(1):4–10. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.005
- Isgro M.A., Vitale M.G., Celentano E. et al. Immunotherapy may protect cancer patients from SARS-CoV-2 infection: a single-center retrospective analysis. *J Transl Med* 2021;19(1):132. DOI: 10.1186/s12967-021-02798-2
- Yatim N., Boussier J., Tetu P. et al. Immune checkpoint inhibitors increase T cell immunity during SARS-CoV-2 infection. *Sci Adv* 2021;7(34):eabg4081. DOI: 10.1126/sciadv.abg4081
- Loretelli C., Abdelsalam A., D'Addio F. et al. PD-1 blockade counteracts post-COVID-19 immune abnormalities and stimulates the anti-SARS-CoV-2 immune response. *JCI Insight* 2021;6(24):e146701. DOI: 10.1172/jci.insight.146701
- Awadasseid A., Yin Q., Wu Y., Zhang W. Potential protective role of the anti-PD-1 blockade against SARS-CoV-2 infection. *Biomed Pharmacother* 2021;142:111957. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111957

Вклад авторов

Е.А. Погодина: сбор и анализ данных литературы;
И.Ж. Шубина: дизайн обзора, сбор и анализ данных литературы, написание текста статьи;
А.В. Лобов, П.И. Иванова: анализ источников литературы;
Н.Ю. Соколов: экспертный анализ текста.

Authors contributions

E.A. Pogodina: collection and analysis of literature data;
I.Zh. Shubina: design of the review, collection and analysis of literature data, article written;
A.V. Lobov, P.I. Ivanova: analysis of literature data;
N.Yu. Sokolov: final expertize of the article text.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Погодина / E.A. Pogodina: <https://orcid.org/0000-0002-0421-3287>
И.Ж. Шубина / I.Zh. Shubina: <https://orcid.org/0000-0002-9374-3158>
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>
Н.Ю. Соколов / N.Yu. Sokolov: <https://orcid.org/0000-0002-0316-5156>

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

Финансирование. Исследование выполнено без спонсорской поддержки.
Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 03.05.2022. Принята к публикации: 16.05.2022.
Article submitted: 03.05.2022. Accepted for publication: 16.05.2022.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-2-19-32>

Современные противовирусные биомедицинские клеточные продукты и перспективы их применения в терапии COVID-19

И.О. Чикилева, И.Ж. Шубина, М.В. Киселевский

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

Контакты: Ирина Олеговна Чикилева irinatchikileva@mail.ru

За короткий промежуток времени было разработано несколько типов вакцин против COVID-19. Однако именно группы риска по тяжелому течению COVID-19 (пожилые люди, лица с подавленным иммунитетом, такие как онкологические пациенты или пациенты после пересадки органов) хуже всего развивают адекватный иммунный ответ на вакцинацию. Поэтому для получения защитных реакций у данных групп следует применять вакцины на основе таких биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), как дендритные клетки (ДК), нагруженные антигенами SARS-CoV-2 *ex vivo* в оптимальных условиях. В некоторых случаях, когда вакцинация не была проведена своевременно, а риск тяжелого заболевания велик, целесообразно немедленно предпринять меры для защиты организма от вируса, инфицировавшего организм.

Для подобного протективного действия могут использоваться другие БМКП – лимфоциты с химерным рецептором антигенов (chimeric antigen receptors, CAR). Такие рецепторы распознают антигены при помощи модифицированных доменов антител, то есть вне контекста молекул главного комплекса гистосовместимости. Поэтому возможно применение для экстренных нужд донорских эффекторных CAR-лимфоцитов, которые были заготовлены заранее. CAR-лимфоциты в настоящее время используются главным образом для противоопухолевой терапии. До 2020 г. велось достаточно ограниченное количество исследований противовирусных CAR-лимфоцитов. Однако пандемия COVID-19 привела к резкой интенсификации подобных работ. ДК, которые считаются наиболее эффективными антигенпрезентирующими клетками, тоже первоначально использовались в качестве противоопухолевых вакцин. Безопасность ДК-вакцин, их высокая эффективность в случае присутствия целевого антигена достаточно быстро привели к тому, что экспериментаторы стали пытаться применять ДК также в качестве терапевтического агента при хронических вирусных заболеваниях типа гепатитов В и С, вирусе иммунодефицита человека.

В настоящем обзоре суммируются данные о противовирусных БМКП, которые были разработаны к настоящему времени, особое внимание уделяется продуктам против COVID-19. Обсуждается, каким образом результаты предыдущих исследований могут быть применены для увеличения эффективности БМКП, направленных против COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, биомедицинские клеточные продукты, химерные рецепторы антигенов, дендритные клетки

Для цитирования: Чикилева И.О., Шубина И.Ж., Киселевский М.В. Современные противовирусные биомедицинские клеточные продукты и перспективы их применения в терапии COVID-19. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(2):19–32. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-19-32

Modern antiviral biomedical cell products and their applications for COVID-19 therapy

Irina O. Chikileva, Irina Zh. Shubina, Mikhail V. Kiselevskiy

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

Contact: Irina Olegovna Chikileva irinatchikileva@mail.ru

Several types of COVID-19 vaccines have been developed in a short period of time. However, the groups at risk of severe COVID-19 (the elderly, people with suppressed immunity, such as oncological patients, or organ transplantation patients) are the least likely to develop an adequate immune response to vaccination. Therefore, in order to obtain protective reactions in these groups, it is advisable to use such biomedical cell products (BMCP) as dendritic cell (DC) based vaccines loaded with SARS-CoV-2 antigens *ex vivo* under optimal conditions. In some cases, when vaccination has not been carried out in a timely manner and the risk of a serious disease is high, it is worthwhile to take immediate measures to protect the body from the virus that has infected the organism.

For this protective action lymphocytes with chimeric antigen receptors (CAR) may be suitable. Such receptors recognize antigens using modified antibody domains, without need for presentation within molecules of major histocompatibility complex. Therefore, it is possible to use donor effector CAR lymphocytes, which were prepared in advance, for emergency needs. CAR lymphocytes are currently used primarily for tumor therapy. Until 2020, there was limited research on antiviral CAR lymphocytes. However, the COVID-19 pandemic has led to a dramatic intensification of such activities. DCs, which are considered to be the most effective antigen-presenting cells, were also originally used as anti-tumor vaccines. The safety of DC vaccines, their high effectiveness in the presentation of target antigens quickly led researchers to try using DCs also as a therapeutic agent for chronic viral diseases such as hepatitis B and C, human immunodeficiency virus.

This review summarizes the data on antiviral BMCPs that have been developed so far, with a particular focus on products against COVID-19. It discusses how the results of previous studies can be used to increase the efficiency of anti-COVID-19 BMCP.

Keywords: COVID-19, biomedical cell products, chimeric antigen receptors, dendritic cells

For citation: Chikileva I.O., Shubina I.Zh., Kiselevskiy M.V. Modern antiviral biomedical cell products and their applications for COVID-19 Therapy. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022; 21(2):19–32. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-19-32

Введение

SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома) – одноцепочечный РНК-вирус, возбудитель коронавирусного заболевания 2019 г. (COVID-19), проявления которого варьируют от бессимптомного течения до острого респираторного дистресс-синдрома с вероятностью неврологического повреждения и даже смерти [1, 2]. Современные стратегии лечения включают противовирусные препараты, такие как ремдесивир и рибавирин, плазму выздоровевших доноров, антитела к рецепторам интерлейкина (ИЛ) 6 и кортикостероиды, чтобы ослабить провоспалительный иммунный ответ, и подробно рассматриваются в ряде источников [1, 3]. Несколько эффективных вакцин против SARS-CoV-2 были быстро разработаны в ряде стран [4, 5]. Однако у некоторых пациентов после иммунизации не развивается желаемый иммунный ответ [4]. Эффективность вакцин колеблется в пределах 60–95 % в зависимости от их типа и способа введения [4]. Появление новых вирусных штаммов снижает эффективность вакцинации. Крайне важно то, что лица с иммунными расстройствами, которые подвержены наибольшему риску тяжелого течения COVID-19, имеют более низкий потенциал развития резистентности при иммунизации [6]. Риск низкой иммуногенности вакцин против COVID-19 особенно высок у реципиентов трансплантатов органов и пациентов с гематологическими злокачественными заболеваниями [6]. Вторая проблема, связанная с этим тяжелым заболе-

ванием, заключается в том, что в случае развития иммунного ответа на естественную инфекцию приобретенный защитный иммунитет сохраняется недолго – около 6 мес. Было показано, что SARS-CoV-2 подавляет функции Т-клеток и дендритных клеток (ДК) [7]. Таким образом, повышение иммунного ответа очень желательно даже в случае нормального развития иммунных реакций в ответ на инфекцию.

Дендритные клетки являются наиболее мощными антигенпрезентирующими клетками. До сих пор ДК-вакцины использовались в основном в онкологии, где была твердо доказана их безопасность [8]. Обычно ДК для противоопухолевых вакцин получают из аутологичных моноцитов в присутствии рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и ИЛ-4 (мДК). Опухолеассоциированные антигены обычно обладают низким потенциалом для индуцирования иммунного ответа. Тем не менее при генерации и нагрузке ДК опухолеассоциированными антигенами *ex vivo* можно преодолеть это препятствие. Многочисленные эксперименты доказали их высокий потенциал в экспериментальных животных моделях лечения опухолей [9]. Однако их эффективность в качестве монотерапии рака все еще недостаточна [8, 10, 11]. Низкий потенциал противоопухолевых ДК-вакцин определяется рядом факторов, включая лечение вакциной на запущенных стадиях, хотя вакцинация имеет наибольший эффект в качестве профилактики. Другие факторы, влияющие на низкую эффективность ДК-вакцин, включают гетерогенность опухоли,

низкую иммуногенность опухолевых антигенов и отсутствие существенных отличий от нормальных тканей. Напротив, SARS-CoV-2 – это вирус с его собственными антигенами. Противовирусные ДК-вакцины могут быть использованы для профилактики и, следовательно, предполагается, что они обладают высокой эффективностью наряду с безопасностью. Наиболее важно и интригующе то, что ДК могут быть так обработаны *in vitro*, чтобы вызывать различные типы иммунного ответа или даже подавлять нежелательные аутоиммунные реакции (например, в присутствии 1,25-дигидроксивитамина D₃, трансформирующего фактора роста β) [12, 13]. Это делает их чрезвычайно привлекательными для достижения желаемого иммунного ответа против SARS-CoV-2. Иммунный ответ должен быть сильным и одновременно достаточно умеренным, чтобы не вызывать цитокиновый шторм, который особенно опасен во время данной инфекции.

В некоторых ситуациях требуется немедленная помощь организму, который не способен справиться с вирусом своими силами. Антитела от иммунных организмов, такие как противотоксинные сыворотки, могут спасти от потенциально смертельной угрозы, например столбняка или укуса змеи. На самом деле антитела к SARS-CoV-2 являются основными действующими веществами плазмы, полученной от пациентов, выздоровевших от SARS-CoV-2. Их плазма используется в качестве последнего средства лечения тяжелобольных пациентов с COVID-19 [3, 14]. В начале заболевания SARS-CoV-2 индуцирует антитела, которые только нейтрализуют вирус (иммуноглобулины (Ig M)). Затем тип антител переключается на IgG, которые способны вдобавок запускать реакции антителозависимой клеточной цитотоксичности и антителозависимого эндоцитоза. Натуральные киллеры (НК) имеют низкоаффинный рецептор к IgG (FcγRIII) CD16, что позволяет им обнаруживать через антитела и разрушать клетки с вирусными компонентами на их мембранах. Этот процесс называется антителозависимой клеточной цитотоксичностью. Антителозависимый эндоцитоз выполняется макрофагами, моноцитами и нейтрофилами, которые распознают через рецепторы к Fcγ, такие как CD16 и CD64 (FcγRI), вирусные частицы в комплексах с IgG и эндоцитируют их. Примечательно, что хотя устойчивые реакции IgM и IgA развивались как у выживших, так и у погибших пациентов с тяжелой формой COVID-19, у невыживших были отмечены ослабленные реакции IgG, сопровождаемые пониженным связыванием рецепторов к Fcγ и эффекторной активностью Fc [15, 16]. Это четко указывает на важную роль антителозависимой клеточной цитотоксичности в ликвидации вируса. Химерный рецептор антигенов (chimeric antigen receptors, CAR) сочетает свойства антител и Т-клеточных рецепторов. Его рецепторная часть состоит из моди-

фицированного антигенсвязывающего фрагмента антитела, так называемого одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv). scFv соединяется через петлю и трансмембранный домен с сигнальными доменами Т-клеточных рецепторов (CD3ζ) и костимуляторов типа CD28, OX40, 4-1BB и др. [17]. CAR 1-го поколения содержали только CD3ζ [18]. Однако их потенциал активации не был оптимальным. М.А. Pule и соавт. улучшили CAR-конструкцию, заменив трансмембранный домен CD3ζ на аналогичный от CD28 и добавив стимуляторный участок CD28 к CD3ζ [19]. Существенно то, что костимуляция CD28 увеличивает ИЛ-2-независимую пролиферацию и увеличивает сопротивление CAR-Т-клеток к регуляторным Т-клеткам [20]. CAR 3-го поколения включают 3 активационных домена. Кроме CD28 добавлены другие домены, такие как 4-1BB и OX40, которые дополнительно поддерживают выживание и активацию CAR-Т-клеток [21, 22]. Механизм действия CAR-лимфоцитов напоминает антителозависимую клеточную цитотоксичность. CAR-Т-клетки очень эффективны при лечении гематологических новообразований, особенно при остром лимфобластном лейкозе, с достижением полной ремиссии у 90 % пациентов [23]. Около 10 лет назад был разработан еще один тип CAR, называемый универсальным [24]. Такие CAR основаны на молекулах, которые связывают естественные или модифицированные специфические антитела к опухолеассоциированным антигенам. Рецепторная часть таких CAR может состоять из Fc-рецепторов (CD16 или CD64), авидина, который связывается с биотинилированными антителами, и т.д. Такие CAR-лимфоциты обеспечивают антителозависимую клеточную цитотоксичность к опухолевым клеткам, опсонизированным антителами, подобно НК. Тем не менее CD16 на НК строго регулируется протеолитическим процессом, который быстро снижает его экспрессию при активации [25]. В генно-инженерных CAR можно удалить этот цикл негативной обратной связи путем замещения участка протеазы ADAM17 на последовательность, непригодную для протеолиза, для пролонгирования действия [26]. В ходе интенсивных исследований начали внедрять технологию CAR для лечения COVID-19, хотя ранее она использовалась в основном в онкологии.

Данный обзор посвящен различным биомедицинским клеточным продуктам (БМКП), которые могут быть нацелены на SARS-CoV-2, а именно ДК-вакцинам и CAR-лимфоцитам.

ДК-вакцины против COVID-19 и других инфекционных заболеваний

На данный момент есть информация о 2 клинических испытаниях ДК-вакцин против SARS-CoV-2.

Биофармацевтическая компания Aivita Biomedical (США) планирует провести фазы I–II клинических

испытаний ДК-вакцины для профилактики COVID-19 на основе аутологичных мДК, нагруженных рекомбинантным спайковым (spike, S) белком COVID-19 без вспомогательных веществ, или в присутствии ГМ-КСФ в качестве адъюванта [27]. Иммунизацией предполагается охватить население пожилого возраста и группы риска по тяжелому течению заболевания. После регистрации на скрининг испытуемые пройдут тест (носовой мазок), чтобы исключить активную инфекцию COVID-19, и быстрый тест на антикоронавирусные антитела, чтобы исключить наличие уже выработанных антител к SARS-CoV-2. Всего будет собрано 50 мл крови. Моноциты аутологичной периферической крови будут изолированы и дифференцированы в ДК перед инкубацией с S-белком SARS-CoV-2. Предполагается вакцинация только одной дозой вакцины.

В похожее китайское клиническое исследование уже набирают пациентов для иммунизации вакциной LV-SMENP-DC, которая производится путем модификации ДК лентивирусными векторами (ЛВ), экспрессирующими мини-ген COVID-19 SMENP и иммуномодулирующие гены [28]. Цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) будут активированы *ex vivo* в присутствии ЛВ-ДК, представляющих вирусные антигены. Участник получит вакцину ЛВ-ДК (5×10^6 клеток) и антигенспецифичные ЦТЛ (10^8 клеток) путем подкожной инъекции и внутривенного вливания соответственно. Это исследование охватывает как здоровых добровольцев, так и инфицированных COVID-19 пациентов. ЛВ являются модифицированными вирусами и, следовательно, обладают своими собственными адъювантными свойствами, поскольку ДК легко активируются различными вирусными патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (поверхностными гликопротеинами, ДНК и РНК) через toll-подобные и другие рецепторы.

Q. Zhou и соавт. провели исследования потенциальных новых адъювантов (крупноразмерные наночастицы оксида графена (L-GO)) в модели ДК-вакцины к SARS-CoV-2 у мышей [29]. Для нагрузки был использован S-белок. L-GO облегчает агрегацию кластеров ДК-Т-клеток для получения стабильного микроокружения для активации Т-клеток. Мышам вводили 2 дозы вакцины (при дозировке 2×10^6 ДК на мышь) с интервалом в 1 нед, и через 3 дня после последней вакцинации все иммунизированные мыши были подвергнуты экспериментальному заражению с помощью адаптированного штамма SARS-CoV-2. Важно отметить, что в присутствии L-GO ДК вызывают устойчивый иммунный ответ ЦТЛ против SARS-CoV-2, что приводит к удалению $>99,7\%$ вирусной РНК у иммунизированных мышей.

М.К. Saadeldin предложил интересный подход, который одновременно нацелен на опухоль и SARS-CoV-2

[11]. Больные раком особенно выиграли бы от такой вакцины, поскольку они являются группой риска по тяжелому течению COVID-19 и нуждаются в эффективной терапии злокачественной опухоли.

Важную информацию можно почерпнуть из уже существующих исследований по противоионфекционным ДК-вакцинам. ДК-вакцины для лечения опасных вирусных инфекций изучаются по крайней мере с 2004 г., когда T. Reuter и соавт. показали, что вакцинация с помощью ДК, нагруженных *ex vivo* вирусным антигеном, может защитить мышей от последующего заражения ретровирусом Friend (FV) [30]. У всех контрольных мышей, которые получили ДК без антигена, развился прогрессирующий лейкоз после инфицирования FV. В отличие от этого, 5 из 14 вакцинированных животных были защищены от инфекции, 3 выздоровели, заболев FV, и только 6 животных погибли от смертельной лейкемии.

Многочисленные исследования продемонстрировали безопасность и индукцию противовирусной реакции в терапевтической модели ДК-вакцины у пациентов с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Однако следует еще раз подчеркнуть преимущество ДК-вакцин для профилактики заболеваний, а не лечения [31, 32]. Были проведены как доклинические исследования, так и несколько клинических испытаний. Данные тщательно обобщены в прекрасном обзоре Н. Mohamed и соавт. [32]. Большинство исследовательских групп сообщают об активизации Т-клеточного ответа на ВИЧ-инфекцию после иммунизации. Тем не менее некоторые группы указывают на отсутствие противовирусного эффекта и корреляции между Т-клеточной реакцией и снижением вирусной нагрузки. Проведены исследования различных типов вирусных антигенов (пептиды, инактивированные вирусы, РНК) и маршрутов их доставки в ДК. Электропорация является эффективным способом нагрузки ДК РНК, кодирующей вирусные белки. Однако вирусные векторы (аденовирус, поксвирус, лентивирус), по-видимому, более эффективны в индукции провоспалительных цитокинов и реакции ЦТЛ [32]. Для обеспечения эффективности терапевтических ДК-вакцин применяются сложные методы. В работе T.D. Norton и соавт. исследуется эффект от одновременной экспрессии ДК антигена ВИЧ-1 с CD40-лигандом (CD40L) и растворимым димером белка программируемой смерти 1 (programmed death 1, PD-1) [33]. CD40L активирует ДК, в то время как димер PD-1 связывается со своим лигандом (PD-L1) на поверхности ДК для предотвращения активации данной контрольной точки иммунитета и усиления реакции ЦТЛ. После инфицирования ВИЧ-1 в экспериментальной модели у вакцинированных мышей вирусная нагрузка была значительно снижена по сравнению с контрольной группой.

Полиинозиновая-полицитидиловая кислота-поли-L-лизин карбоксилцеллюлоза (Poly-ICLC) считается имитацией вирусных патогенассоциированных молекулярных паттернов. Ее предлагается использовать как мощный адъювант для активации ДК при нагрузке вирусными антигенами [34].

Кроме того, проводятся исследования по созданию ДК-вакцин против вируса гепатита С (ВГС) [35–37]. В. Hong и соавт. разработали суперстимулятор ДК, который состоит из модифицированного лиганда toll-подобного рецептора 5 на основе бактериального флагеллина и ингибитора негативного регулятора иммунных реакций, супрессора сигналов цитокинов-1 (SOCS1) [35]. Они обнаружили, что экспрессия суперстимулятора прямо в ДК является значительно более мощной и стойкой, чем использование обычных стимуляторов ДК для повышения уровня и продолжительности производства воспалительных цитокинов как у мышей, так и у людей. Более того, ДК, экспрессирующие суперстимулятор, мощнее запускали как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ против антигена ВГС *in vivo* в мышинной модели. Авторы другого исследования стремились разработать ДК-вакцину, кодирующую множественные эпитопы ВГС, которые могут стимулировать реакцию Т-клеток *in vitro*, и могут быть использованы для иммунизации *in vivo* [36]. ДК были заражены рекомбинантными аденовирусами с дефектами репликации, несущими 2 последовательности ВГС. Такая ДК-вакцина эффективно запускала антивирусные иммунные реакции Т-лимфоцитов *in vitro*, судя по специфическому лизису клеток гепатомы человека Huh7,5. Z.A. Mekonnen и соавт. разработали другой подход для повышения эффективности ДК-вакцины против ВГС [37]. Они предполагают использовать некротические ДК, экспрессирующие антиген ВГС для иммунизации.

Два клинических испытания I/II фаз терапевтических ДК-вакцин для лечения хронического гепатита С перечислены в базах данных ClinicalTrials.gov. В первом использовали аутологичные ДК, сгенерированные из моноцитов в присутствии интерферона α /ГМ-КСФ и пульсированных рекомбинантными белками ВГС Core (1–120) и NS3 (1192–1457) [38, 39]. Исследование проводилось в Новосибирске (Российская Федерация), в нем участвовало 10 пациентов в возрасте от 18 до 65 лет. Пациентов вакцинировали несколько раз с помощью подкожной инъекции аутологичных ДК (5×10^6) в сочетании с подкожной адъювантной инъекцией рекомбинантного ИЛ-2 (250 000 МЕ). Не было участников с тяжелыми побочными реакциями и/или не соответствующими норме клиническими лабораторными показателями, обусловленными лечением. У 4 из 10 участников было отмечено снижение вирусной нагрузки. Другое исследование,

проведенное в Наварре (Испания), было направлено на оценку эффективности терапевтической вакцинации пациентов с генотипом ВГС-1 с использованием аутологичных ДК-вакцин, инфицированных рекомбинантным аденовирусом, кодирующим NS3 [40]. К сожалению, результаты не были опубликованы.

Хронический гепатит В является еще одним инфекционным заболеванием, которое требует улучшения естественного иммунного ответа. М. Chen и соавт. показали, что аутологичная ДК-вакцина может эффективно подавлять репликацию вируса гепатита В (ВГВ), уменьшая вирусную нагрузку в сыворотке крови пациентов [41]. В китайском клиническом исследовании I/II фазы, указанном в базе данных ClinicalTrials.gov, пытаются предоставить дополнительную помощь пациентам с хроническим гепатитом В через ДК-вакцину, нагруженную обычным вакцинным препаратом против ВГВ [42]. Предварительные результаты исследования показали, что такая вакцинация эффективно восстановила иммунитет и выявила снижение вирусных показателей, а также серологические и биохимические улучшения у некоторых пациентов с хроническим ВГВ [43, 44]. В другом клиническом испытании пытаются сочетать противовирусный препарат энтекавир с ДК-вакциной [45]. Так как ВГВ является основной причиной развития гепатокарциномы, ДК-вакцины против него могут выступать в качестве противораковой терапии. Эффективность данного подхода была показана в исследованиях *in vitro*, а также на мышинной модели [46, 47].

Реактивация цитомегаловируса (ЦМВ) остается одной из основных причин заболеваемости у пациентов с аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), и происходит более чем у 60 % пациентов без противовирусной профилактики [48]. А.Н. Van Craenenbroeck и соавт. в успешном экспериментальном клиническом испытании показали индукцию ЦМВ-специфичных Т-клеток при помощи ДК, которые были трансфицированы РНК, кодирующей вирусные белки [49]. Вакцина активировала наивные Т-клетки против вируса у серонегативных лиц и Т-клетки памяти у ЦМВ-положительных лиц. С.К.К. Ма и соавт. получали аллогенную донорскую ДК-вакцину на основе пептидов ЦМВ для пациентов с ТГСК в присутствии провоспалительного коктейля цитокинов (фактор некроза опухоли (ФНО) α , ИЛ-1 β , простагландин E2 и ИЛ-6) для созревания мДК при нагрузке антигенным материалом [50]. ДК вводились одновременно с ЦМВ-специфичными Т-клетками. Никаких немедленных побочных реакций не было замечено при вакцинации ДК или инфузии Т-клеток. У всех пациентов, получивших данную терапию, были выявлены иммунные реакции против ЦМВ. Недавно в США была завершена I стадия клинического исследования ДК-вакцины

против ЦМВ [51]. ДК, нагруженные РНК, кодирующей вирусные белки, были введены одновременно со столбнячным анатоксином и адьювантом (ГМ-КСФ) детям и молодым людям до 35 лет с IV стадией глиомы по классификации Всемирной организации здравоохранения, рецидивирующей злокачественной глиомой или рецидивирующей медуллобластомой. Это исследование включало 10 пациентов. Не наблюдалось никаких тяжелых побочных эффектов лечения.

Некоторые исследователи изучают противогрибковые ДК-вакцины против высоковирулентных грибов, таких как *Cryptococcus gattii*, которые могут вызвать смертельную инфекцию у людей с нормальным иммунитетом [52–55]. Важно, что ДК, пульсированные пептидом от *Paracoccidioides brasiliensis*, оказались эффективны в борьбе с уже развившимся заболеванием в модели терапевтического применения ДК у иммунокомпрометированных мышей [55].

Таким образом, в настоящее время разрабатывается ряд противинфекционных ДК-вакцин для лечения опасных и трудноизлечимых хронических заболеваний. Терапевтические ДК-вакцины дают преимущества даже при хронических инфекционных заболеваниях и даже у иммунокомпрометированных индивидуумов, что подчеркивает их высочайшую эффективность. Именно поэтому, как ожидается, ДК-вакцины будут полезны для иммунизации против SARS-CoV-2 пациентов с нарушениями иммунитета. Различные стимулы созревания ДК и адьюванты для иммунизации все еще изучаются в целях разработки наиболее эффективных и безопасных ДК-вакцин. Использование различных вариантов активаторов позволяет тонко настраивать функциональную активность ДК (презентация антигенов и секреция цитокинов). К сожалению, нет четких и систематизированных данных в плане того, какие именно стимуляторы наиболее целесообразны при получении противовирусных ДК, каким именно образом следует обработать ДК, чтобы далее они вызвали длительный, адекватный, но не избыточный ответ Т-лимфоцитов. В клиническом исследовании NCT04386252 предполагается использовать S-белок SARS-CoV-2 для нагрузки ДК [27]. Однако авторы не предоставляют никакой информации о стимулах созревания, особенно необходимых, если белковые антигены используются для этой цели. Poly-ICLC, провоспалительный коктейль цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , простагландин E2 и ИЛ-6), L-GO [29] или другие факторы, описанные выше для различных противовирусных ДК-вакцин, могут быть добавлены вместе с пептидными или белковыми антигенами для индуцирования созревания ДК и повышения их антигенпредставляющего потенциала. Тем не менее вирусные векторы, по-видимому, эффективнее белковых, пептидных

и РНК-антигенов (судя по урокам, которые были извлечены из исследований ДК-вакцин против ВИЧ-инфекции). Таким образом, ДК-вакцина из клинического испытания NCT04276896, основанная на ЛВ, экспрессирующей мини-ген COVID-19, не нуждается в дополнительных факторах созревания [28]. Кроме того, можно надеяться, что антигены на основе вирусных векторов, будут стимулировать наиболее подходящий для индукции противовирусного иммунитета фенотип у ДК. Помимо этого, авторы исследования включили иммунные модулирующие гены в конструкцию для повышения потенциала ДК вакцины (что должно повысить ее эффективность), основываясь на опыте предыдущих исследователей. Такой подход использовался в ДК-вакцинах против ВИЧ-инфекции [33]. Вместе с тем необходимо тщательно рассмотреть вопросы безопасности вирусных векторов. Важно проверить другие вирусные векторы, такие как аденовирус и поксвирус и т.д., для производства ДК-вакцин против SARS-CoV-2. Примечательно, что в исследованиях ДК-вакцин против ЦМВ предлагается привлекательный подход, который может быть использован для противовирусной защиты пациентов после ТГСК, особенно чувствительных к любой инфекции, не говоря уже о высокозаразном SARS-CoV-2. Донорские моноциты, с подобранными вариантами главного комплекса гистосовместимости, могут быть использованы для производства любой противовирусной ДК-вакцины, включая SARS-CoV-2, ЦМВ и т.д., и обеспечивают защиту пациентов через активацию противовирусной реакции донорских Т-клеток.

Остается интригующей и полностью неисследованной возможность использования толерогенной ДК-вакцины для облегчения неадекватных и чрезмерных иммунных реакций в виде синдрома высвобождения цитокинов (СВЦ) во время COVID-19 [12, 13].

Таким образом, ДК-вакцины могут быть адаптированы для профилактики SARS-CoV-2 и любых инфекционных заболеваний для иммунокомпрометированных пациентов.

Противовирусные CAR-эффекторы в терапии вирусных заболеваний, включая COVID-19

Технология CAR интенсивно используется для разработки новых методов лечения SARS-CoV-2. Большинство из подходов направлено на поверхностный S-белок вируса. Это гликозилированный белок, который обеспечивает проникновение вируса в клетки и играет важную роль в получении иммунного ответа хозяина [56, 57]. Он связывается с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) [58, 59]. Белок S состоит из тримера, где каждый мономер имеет 2 субъединицы (S1 и S2), разделенные сайтом

расщепления, который распознается белками клеток хозяина [60]. Субъединица S1 состоит из сигнального пептида (SP), терминального домена N (NTD) и рецепторсвязывающего домена (RBD), в то время как субъединица S2 опосредует слияние мембраны с частицами вируса. S-белок служит мишенью нейтрализующих антител [61, 62].

В настоящее время проводится ряд исследований с использованием традиционных CAR на основе scFv, полученных на базе противовирусных антител к S-белку SARS-CoV-2. CAR-T-клетки к S1-белку показали мощную цитотоксическую активность *in vitro* против целевых клеток, нагруженных RBD, пептидом S1 или самим белком S1 [63]. Данные CAR относятся ко 2-му поколению и включают scFv от CR3022 антител с последующей последовательностью Flag-Tag (DYKDDDDK), различными областями шарниров, трансмембранным и внутриклеточным доменами CD28 и внутриклеточным доменом CD3 ζ . Нейтрализующее антитело от выздоровевшего пациента с SARS, называемое CR3022, связывается с областью RBD S-белка как в SARS-CoV-1, так и в SARS-CoV-2 [64]. Таким образом, S1-эпитоп, связанный с CR3022, по-видимому, консервативный и может оказаться стабильным во время эволюции вируса. Распознавание CAR-лимфоцитами целевого пептида в RBD SARS-CoV-2 ведет к увеличению экспрессии активационного антигена T-клеток CD69 и интерферона γ , гранзима B, перфорина и Fas-лиганда на CAR-T-клетках. Эффективность лизиса варьировала в зависимости от состава шарнирной области. Замедленная микроскопия показала формирование кластера CAR-T-клеток вокруг RBD-экспрессирующих целей. Цитолиз мишеней был опосредован в первую очередь гранзим-B/перфориновым путем. Более того, авторы показали *in vivo* лизис S1-экспрессирующих клеток CAR-T-лимфоцитами у мышей.

Тем не менее CAR-T-клетки – мощные индукторы СВЦ, который является одним из основных факторов патогенеза COVID-19 [65]. Таким образом, активно исследуются другие источники эффекторных клеток, которые могут служить эффективными носителями CAR. НК являются высокоперспективными антивирусными эффекторами. НК распознают SARS-CoV-2-инфицированные клетки через свои собственные врожденные рецепторы и убивают инфицированные клетки на ранней стадии иммунного ответа [66]. Модифицированные CAR-НК не могут вызывать реакции трансплантата против хозяина, как CAR-T-клетки [67, 68]. НК реже вызывают СВЦ, который потенциально может усилить симптомы COVID-19 [69]. Важно отметить, что CAR-трансфицированные НК можно заранее подготовить, т. е. сделать их готовым к использованию универсальным клеточным продуктом [70]. Однако следует подчер-

кнуть, что использование НК в клеточной терапии не исключает развития реакций хозяина против трансплантата, ограничивающих время жизни в реципиенте и потенциал БМКП. Более того, T-клетки могут также подготавливаться, чтобы их можно было использовать в качестве готового универсального продукта, хотя это и требует дополнительных стадий генетической модификации для удаления локуса $\alpha\beta$ -T-клеточных рецепторов либо удаления T-лимфоцитов с $\alpha\beta$ -T-клеточных рецепторов [71].

Из этих соображений M. Ma и соавт. хотя и выбрали антитела CR3022 для своего scFv, но НК служили в качестве эффекторных клеток [72]. CR3022-CAR-НК могут специфически связываться с RBD S-белка SARS-CoV-2 и с целым S-белком SARS-CoV-2 и активируются псевдотипированными вирусными частицами SARS-CoV-2-S *in vitro*. Псевдотипированные SARS-CoV-2-S вирусные частицы – это частицы вируса, который допустимо использовать в обычной биологической лаборатории, в отличие от опасного SARS-CoV-2, но с включением S-белка SARS-CoV-2. CR3022-CAR-НК могут специфически убивать целевые клетки, зараженные псевдо-SARS-CoV-2. В последующей работе авторы усовершенствовали свой подход к генерации CAR-НК для нацеливания на исходный SARS-CoV-2 и его мутантный штамм D614G [73, 74]. CAR-НК были сформированы с использованием домена scFv S309 (далее S309-CAR-НК) антител, нейтрализующих и SARS-CoV, и SARS-CoV-2. Антитела S309 нацелены на высококонсервативный регион S гликопротеина SARS-CoV-2, поэтому, скорее всего, способны распознать различные варианты изолятов SARS-CoV-2 [75]. S309-CAR-НК могут специфически связываться с псевдотипированным вирусом SARS-CoV-2 и его мутантами D614G, N501Y и E484K. Кроме того, S309-CAR-НК специфически лизировали целевые клетки, несущие S-белок *in vitro*, и демонстрировали превосходящую цитотоксическую активность и продукцию цитокинов по сравнению с клетками CR3022-CAR-НК.

Интересный подход был предложен W. Fu и соавт. [76]. Их команда генетически перепрограммировала человеческие макрофаги рецепторами CAR для направления их фагоцитарной активности против SARS-CoV-2. После исследования конструкций CAR с различными внутриклеточными доменами рецепторов они обнаружили, что цитозольные домены из протоонкогена тирозинкиназы MER (*MERTK*) (CAR-*MERTK*) не вызывали антигенспецифичный клеточный фагоцитоз или цитотоксический эффект, в отличие от MEGF10, Fc γ и CD3 ζ . Однако CAR с любыми доменами, включая *MERTK*, приводили к схожему обезвреживанию SARS-CoV-2 *in vitro*. Самое примечательное, что в присутствии на макрофагах CAR-*MERTK* они осуществляли свои

функции по антигенспецифичному удалению вирионов SARS-CoV-2 без секреции провоспалительных цитокинов. Таким образом, подобные эффекторные макрофаги с CAR-MERTK могут иметь преимущества для лечения COVID-19, в особенности у лиц с повышенным риском гиперовоспаления.

Лектин банана (BanLec) предлагается в качестве перспективного CAR рецептора для SARS-CoV-2 [77]. Он связывает протеогликаны с высоким содержанием маннозы на вирусных оболочках, оказывая противовирусное действие. Точечная мутация (H84T) позволяет получить вариант BanLec с противовирусной активностью при отсутствии митогенной. SARS-CoV-2 содержит значительное количество подобных маннозосодержащих олигосахаридов в непосредственной близости к RBD-домену S-белка. Рецепторный домен BanLec был включен в CAR 2-го поколения с сигнальными доменами костимулятора 4-1BB и CD3 ζ . H84T-BanLec CAR-НК снижали уровень инфекции псевдотипированными лентивирусами, содержащими S-белок, у 293T-клеток с рецептором ACE2. НК активировались и секретировали провоспалительные цитокины при культивировании в присутствии зараженных клеток.

В настоящее время в Китае проводится фаза I/II клинического испытания NCT04324996 по лечению COVID-19 с использованием аллогенных CAR-НК [78]. Авторы тестируют генетически модифицированные первичные человеческие НК в качестве терапевтического БМКП. НК модифицировали ACE2 для распознавания вируса и инфицированных клеток. Кроме того, клетки НК были модифицированы для секреции суперагониста ИЛ-15 (химерный растворимый белок, состоящий из ИЛ-15 и α -цепи его рецептора sИЛ-15/ИЛ-15R α). По мнению авторов, эта модификация способствует увеличению срока службы генетически модифицированных НК в организме хозяина. Для сокращения СВЦ в исследовании была внесена еще одна модификация: клетки CAR-НК секретируют scFv к ГМ-КСФ.

Математические модели показывают потенциальную эффективность COVID-19-специфичных CAR-T-клеток в антивирусной терапии [79, 80].

T. Zhu и соавт. исследуют антивирусный потенциал нановезикул (NV), полученных из биспецифических CAR-T-клеток, экспрессирующих 2 scFv, названных CR3022 и B38, против целевого SARS-CoV-2 [81]. NV, которые экспрессируют как CR3022, так и B38 (CR3022/B38 NV), имеют более сильную способность нейтрализовать инфекцию псевдовирусом с S-белком SARS-CoV-2, чем NV лишь с одним из них. Примечательно, что коэкспрессия CR3022 и B38, которые нацелены на различные эпитопы S-белка, может уменьшить случаи вирусной резистентности за счет мутации одного из эпитопов. Ремдесивир был

инкапсулирован в CR3022/B38 NV с помощью электропорации, а затем доставлен в инфекционные места SARS-CoV-2 на основе нацеливания рецепторами CR3022/B38. Авторы предполагают, что CR3022/B38 NV обладают потенциальной способностью направлять и доставлять противовирусный препарат в главный участок вирусной инфекции, тем самым значительно ингибируя внутриклеточную репликацию вируса и снижая побочные реакции от препарата.

CAR-T-клетки были успешно протестированы для лечения нескольких вирусных заболеваний, таких как ЦМВ человека, ВИЧ, вирус Эпштейна–Барр (ЭБВ), ВГВ и ВГС [82, 83]. Применение CAR для терапии ЦМВ было рассмотрено в обзоре С. Bednar и А. Ensser [82]. CAR-T-клетки, направленные против ЦМВ, оказались эффективны при лизисе инфицированных клеток *in vitro*, выделяли провоспалительные цитокины при контакте с их целями (ФНО и интерферон γ). Эффективность CAR, ориентированных на ЦМВ, была продемонстрирована также в мышинной модели. Тем не менее некоторые исследователи сообщают о низкой цитолитической активности CAR-лимфоцитов. Было замечено, что инфицированные ЦМВ клетки могут сопротивляться цитотоксическому лизису CAR⁺-Т-клетками с помощью ингибиторных вирусных белков.

Помимо ЦМВ, другим клинически значимым членом герпесвирусов является ЭБВ. Это латентный и онкогенный вирус человека. ЭБВ обильно экспрессирует на поверхности зараженных клеток вирусный гликопротеин gp350 во время литической инфекции, что делает этот гликопротеин потенциальной мишенью для CAR-T-клеточной терапии. CAR 2-го поколения был создан С. Slabik и соавт. на основе 2 нейтрализующих антител, нацеленных на gp350 (7A1 и 6G4) [84]. scFv были слиты с сигнальными доменами CD28/CD3 ζ . gp350CAR-T-клетки специфически распознавали и убивали gp350⁺293T-клетки *in vitro*. Наиболее эффективные из полученных 7A1-gp350CAR-T-клетки проявляли цитотоксичность против ЭБВ⁺-клеточной линии B95-8. Полностью гуманизированным мышам Nod.Rag.Gamma пересаживали CD34⁺-клетки пуповинной крови и инфицировали литическим штаммом EBV/M81/fLuc. Далее проводился динамический мониторинг на предмет вирусного распространения. У зараженных мышей воспроизводились ЭБВ-индуцированная лимфопролиферация, развитие опухоли и системное воспаление. Авторы тестировали эффект от введения аутологичных CD8⁺gp350CAR-T-клеток в протективном (до инфицирования) или терапевтическом режимах. После терапии gp350CAR-T-клетками 75 % мышей контролировали или уменьшали распространение ЭБВ, у них с меньшей частотой наблюдалась злокачественная лимфопролиферация зараженных В-лимфоцитов, не развивались опухоли

и было снижено воспаление. CAR-T-клетки, нацеленные на латентный мембранный белок 1 (latent membrane protein-1, LMP-1) ЭБВ, показали противовирусный потенциал *in vitro* и у мышей с ксенотрансплантатом с ЭБВ-отрицательной линией карциномы носоглотки (SUNE1), генетически модифицированной для сверхэкспрессии LMP-1 [85]. Вирусный LMP-1 экспрессируется в большинстве связанных с ЭБВ лимфопролиферативных заболеваний и злокачественных опухолей, и он критически способствует патогенезу болезни [86]. В ранней фазе I клинических испытаний NCT04657965 (Китай, пока не набирает пациентов) намерены вводить LMP-1-специфические CAR-T-клетки для лечения инфекции ЭБВ и гематологических злокачественных образований, им вызванных [87].

CAR-T-клетки с умеренной эффективностью используются при лечении серьезного вирусного заболевания – ВИЧ [82, 88]. В период между 1995 и 2005 г. в нескольких клинических испытаниях исследовали безопасность и эффективность использования CD4 ζ -CAR-T-клеток у ВИЧ-инфицированных лиц (обзор исследований составлен С.Р. Maldini и соавт.) [88]. Результаты этих исследований доказали безопасность и целесообразность генной терапии *ex vivo* с использованием Т-лимфоцитов, но в конечном итоге лечение не смогло окончательно уменьшить вирусную нагрузку в кровеносных и тканевых резервуарах. Первые анти-ВИЧ-CAR были основаны на CD4-домене, который связывает ВИЧ, и представляли собой CAR 1-го поколения только с CD3-активационным доменом. Для повышения активности и стойкости CAR-T-клеток были разработаны 2-е и 3-е поколения анти-ВИЧ-CAR. По сравнению с 1-м поколением CAR-T-клеток CAR-T-клетки 2-го поколения были более мощными в подавлении репликации ВИЧ *in vitro*. Кроме того, в гуманизированной мышинной модели ВИЧ-инфекции они сохраняли количество CD4 $^{+}$ -Т-клеток, уменьшали ВИЧ-нагрузку и расширили защиту в большей степени, чем 1-е поколение CAR-T-клеток. Тем не менее рецепторы CAR, построенные на CD4-элементах, как было показано, делают сами CAR-T-клетки восприимчивыми к ВИЧ-инфекции. Разработано несколько способов защиты таких CAR-T-клеток от вирусного проникновения. Например, создан биспецифический CAR, в котором сегмент CD4 связан с scFv моноклональных антител человека 17b, которые распознают высококонсервативный CD4-индуцированный эпитоп на вирусном gp120, участвующий в связывании корцептора, и защищает CD8-позитивные CAR-T-клетки от вирусного проникновения, делает их еще более эффективными при лизисе инфицированных клеток [89]. Другой способ преодолеть эту потенциально опасную ситуацию – оснастить CD4 ζ CAR-систему ингибитором

слияния с вирусом (пептид С46) или небольшими шпилечными РНК для разрушения корцептора ВИЧ (CCR5) и деградации вирусной РНК [90]. Ингибитор слияния вируса с клетками С34, связанный с CXCR4, оказывается достаточно мощным и препятствует проникновению различных штаммов ВИЧ независимо от их тропизма [91]. Недавно данный ингибитор был использован для создания ВИЧ-устойчивых ВИЧ-специфических CAR-модифицированных CD4 $^{+}$ -Т-клеток (CAR4) [92]. Авторы продемонстрировали, что CAR4-T-клетки напрямую подавляют репликацию ВИЧ *in vitro* и уничтожают клетки, зараженные вирусом.

Несколько групп исследовали альтернативную возможность нацеливания CAR 2-го поколения на ВИЧ-инфицированные клетки [88]. Были разработаны CAR, содержащие scFv, которые нацелены на консервативные участки вирусных белков. Несмотря на значительную противовирусную способность клеток на основе scFv *in vitro*, несколько факторов могут ограничивать их терапевтический потенциал у человека. Чтобы стать широкоприменимой терапией, CAR-T-клетки на основе scFv должны преодолеть вероятность ускользания ВИЧ из-под иммунологического надзора за счет мутаций, быть эффективными против разнообразных штаммов ВИЧ и неиммунными, чтобы они могли сохраняться в течение десятилетий.

В настоящее время проводится оценка нескольких подходов для повышения эффективности CAR по борьбе с ВИЧ. Блокада иммунной точки PD-1 оказалась эффективным способом повышения активности CAR против ВИЧ *in vitro* и в мышинной модели, так как анти-ВИЧ-CAR-лимфоциты подвергаются значительному истощению из-за хронического течения инфекции [93]. Во время хронической инфекции ВИЧ или вируса обезьяньего иммунодефицита до прогрессирования СПИД подавляющее большинство вирусной репликации концентрируется в фолликулах В-клеток вторичных лимфоидных тканей. Таким образом, M.S. Ramprusch и соавт. исследовали, могут ли Т-клетки, экспрессирующие специфичный к вирусу обезьяньего иммунодефицита CAR и рецептор хоуминга в фолликулы CXCR5, успешно лизировать инфицированные клетки в целевых фолликулах у зараженных макаков [94]. В целом CAR/CXCR5-T-клетки животных поддерживали более низкую вирусную нагрузку и уровень вирусных РНК в фолликулах макаков после инфузии клеток, чем у контрольных животных, и не было отмечено никаких серьезных побочных реакций. Эти результаты показывают, что лечение CAR/CXCR5-T-клетками является безопасным и обещает стать будущим лечением для достижения прочной ремиссии ВИЧ. Стратегия универсальных CAR была также протестирована для лечения

ВИЧ [95]. R. M. Lim и соавт. сообщили о разработке универсальных CAR-НК, которые распознавали 2,4-динитрофенил (DNP) и впоследствии могли быть перенаправлены на различные эпитопы gp160 ВИЧ, используя DNP-конъюгированные антитела в качестве молекул адаптеров. Они показали, что такие CAR-НК могут распознавать и убивать псевдоинфицированные ВИЧ клеточные линии с gp160 подтипов В и С. Подтверждено, что ВИЧ-инфицированные первичные CD4⁺-Т-клетки человека могут быть эффективно уничтожены с помощью того же подхода. Учитывая, что многочисленные антитела против gp160 с различной специфичностью легкодоступны, эта модульная универсальная клеточная платформа CAR-НК может потенциально преодолеть разнообразие ВИЧ, тем самым обеспечивая многообещающую стратегию по искоренению ВИЧ.

Проходящее в данный момент клиническое исследование фазы I анти-ВИЧ-CAR-Т-клеток NCT03617198 (США) основано на CAR 2-го поколения (41В-В-, CD3ζ-внутриклеточные домены) с CD4-рецепторной частью [96, 97]. Противовирусная защита CAR-Т-клеток обеспечивается системой, описанной L. Liu и соавт. [89]. В настоящее время проводится еще несколько клинических испытаний анти-ВИЧ-CAR: NCT04648046 (США) [98], NCT04863066 (Китай, планируется) [99], NCT03240328 (Китай) [100].

Кроме того, предпринимаются попытки восстановить/усилить специфические иммунные реакции при хроническом гепатите В [101]. CAR, направленный против поверхностных белков ВГВ, позволил Т-клеткам человека убить инфицированные гепатоциты человека и устранить ковалентно замкнутую круговую ДНК вируса (cccDNA) *in vitro* [102]. CAR-Т-клетки сохраняли свою функцию *in vivo* и контролировали репликацию вируса без существенной цитотоксичности, связанной с Т-клетками, в модели хронической инфекции ВГВ у трансгенных мышей (HBVtg) с функциональной иммунной системой [103]. Схожие результаты были получены R. L. Kruse и соавт. Научный коллектив создал CAR, ориентированный на поверхностный антиген ВГВ (HBsAg), и оценил его способность распознавать клеточные линии, положительные по ВГВ, и частицы HBsAg *in vitro* и проверил, будут ли человеческие HBsAg-CAR-Т-клетки эффективны против инфицированных гепатоцитов в печени химерных мышей [104]. HBsAg-CAR-Т-клетки распознали ВГВ-положительные клеточные линии и частицы HBsAg *in vitro*, судя по производству цитокинов. Однако HBsAg-CAR-Т-клетки не убивали ВГВ-положительные клеточные линии в цитотоксических тестах *in vitro*, так же как в исследовании K. Krebs и соавт. [103]. Адоптивный перенос HBsAg-CAR-Т-клеток зараженным гуманизированным мышам привел к накоплению их в печени и значи-

тельному снижению уровней HBsAg и ДНК вируса в плазме по сравнению с контрольными мышами. Примечательно, что доля инфицированных гепатоцитов человека была значительно уменьшена после лечения HBsAg-CAR-Т-клетками, что указывает на нецитопатический клиренс вируса. Противовирусная терапия CAR-Т-клетками является перспективным терапевтическим подходом для лечения хронического гепатита В и ассоциированного с ним рака. Однако из-за большого количества целевых клеток побочные эффекты, такие как СВЦ или гепатотоксичность, могут ограничивать ее безопасность. A. Kloor и соавт. разработали анти-ВГВ-CAR-Т-клетки с защитным механизмом, который обеспечивает уничтожение введенных Т-клеток при необходимости [105]. В этом исследовании Т-клетки были модифицированы путем ретровирусной трансдукции для экспрессии ВГВ-специфичных CAR и, кроме того, индуцируемой каспазы-9 или тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK) в качестве выключателей. M. M. Festag и соавт. спроектировали полностью человеческие HBsAg-специфичные CAR-Т-клетки 2-го поколения и протестировали их в модели мышей AAV-HBV с переносимостью человеческих HBsAg-CAR [106]. В этой системе были продемонстрированы долгосрочные противовирусные эффекты с уменьшением HBsAg в 2 раза и уменьшением вирусной ДНК на 60 % в течение 110 дней после переливания CAR-лимфоцитов. Однако HBsAg-CAR-Т-клетки не смогли полностью очистить организм животных от ВГВ.

G. A. Sautto и соавт. разработали первые CAR против ВГС, направленные на гликопротеин ВГС/E2 [107]. Анти-ВГС/E2 CAR 2-го поколения состояли из scFv, полученных из перекрестно-реактивного и перекрестно-нейтрализующего моноклонального антитела человека, e137, слитого с внутриклеточными сигнальными мотивами CD28 и CD3ζ. Активность пересаженных CAR-Т-клеток была оценена *in vitro* по отношению к ВГС/E2-трансфектным клеткам, а также гепатоцитам, зараженным ВГС, полученным из клеточной культуры (HCVcc). CAR-Т-лимфоциты специфически распознавали антигены, что сопровождалось дегрануляцией и секрецией провоспалительных и противовирусных цитокинов (интерферон γ, ИЛ-2 и ФНО-α). Кроме того, CAR-Т-клетки были способны лизировать целевые клетки как печеночного, так и непеченочного происхождения, которые экспрессировали ВГС/E2 наиболее клинически значимых генотипов вируса, включая 1a, 1b, 2a, 3a, 4 и 5. Наконец, что более важно, они были способны убивать гепатоциты, зараженные вирусом HCVcc.

Таким образом, большинство исследований противовирусных CAR находятся на доклинических стадиях. Все они, за исключением работ по SARS-CoV-2, посвящены хроническим заболеваниям. Поэтому

многие ученые сталкиваются с вирусными механизмами, которые позволяют вирусам избежать естественного человеческого иммунитета. Такие вирусные свойства также могут снижать эффективность CAR-лимфоцитов. К сожалению, большинство из этих механизмов еще только предстоит прояснить. COVID-19 является острой инфекцией, однако SARS-CoV-2, безусловно, обладает определенными свойствами, позволяющими ослабить естественный адаптивный иммунитет. Эти особенности еще предстоит обнаружить, и они могут иметь решающее значение для успешного противовирусного лечения.

Существует несколько устоявшихся стратегий разработки противовирусных CAR, которые могут быть адаптированы для создания эффективных CAR против SARS-CoV-2. Наиболее подробная информация доступна из обширной и хорошо развитой области исследований CAR против ВИЧ. Эти исследования четко указывают на то, что CAR 2-го поколения превосходят по антивирусной защите CAR 1-го поколения [82, 88]. Кроме того, активационные домены семейства TNFR (CD27, OX40 и 4-1BB), по-видимому, важны для эффективного функционирования в естественных условиях модифицированных клеток, обеспечивая экспансию клеток [92]. Тогда как активирующие домены, производные от семейства рецепторов CD28 (ICOS и CD28), важны для эффекторных функций CAR-лимфоцитов. Таким образом, CAR 3-го поколения против SARS-CoV-2, содержащие CD28-, 4-1BB- и CD3 ζ -активирующие домены, как ожидается, будут очень эффективны в очистке от вируса [72–74]. Нацеливание CAR на отдельные вирусные эпитопы при помощи scFv имеет недостаток, связанный с возможным ускользанием вируса от действия CAR в силу его быстрых мутаций. По-

этому CAR, в которых используются другие рецепторные области с более широкой специфичностью, такие как ACE2 или VanLec, представляются в этом отношении предпочтительными. Однако возможная перекрестная реакция таких CAR с другими лигандами может оказаться проблемой. ACE2 – рецептор для ангиотензина, неотъемлемая часть ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, которая существует для того, чтобы поддерживать кровяное давление тела. Таким образом, ACE2-несущие CAR-лимфоциты могут изменить естественный контроль кровяного давления. Для выбора наилучших вариантов необходимо проводить прямое сопоставление эффективности и безопасности различных CAR. Как и в случае с ВИЧ, нельзя исключить вероятность того, что может потребоваться защита анти-COVID-19-CAR-лимфоцитов от проникновения в них вируса и инфицирования. Необходимо изучить данный вопрос. Потенциально такие методы могут быть разработаны на основе предыдущих исследований анти-ВИЧ-CAR-лимфоцитов. Дополнительные механизмы для уменьшения или выключения нежелательных реакций СВЦ (суицидальные гены, scFv для нейтрализации воспалительных цитокинов) крайне желательны по соображениям безопасности во время CAR-терапии COVID-19 [78, 105].

Заключение

Противовирусные БМКП, такие как ДК-вакцины и противовирусные CAR-эффекторы, перспективны в проблемных случаях терапии и профилактики SARS-CoV-2. Современные исследования противовирусных ДК-вакцин и CAR против других инфекций доказывают, что этот подход является осуществимым, достаточно безопасным и эффективным.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Li C.X., Noreen S., Zhang L.X. et al. A critical analysis of SARS-CoV-2 (COVID-19) complexities, emerging variants, and therapeutic interventions and vaccination strategies. *Biomed Pharmacother* 2022;146:112550. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112550
- Sarubbo F., El Haji K., Vidal-Balle A., Bargay Lleonart J. Neurological consequences of COVID-19 and brain related pathogenic mechanisms: a new challenge for neuroscience. *Brain Behav Immun Health* 2022;19:100399. DOI: 10.1016/j.bbih.2021.100399
- Jean S.S., Lee P.I., Hsueh P.R. Treatment options for COVID-19: the reality and challenges. *J Microbiol Immunol Infect* 2020;53(3):436–43. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.03.034
- Zinatizadeh M.R., Zarandi P.K., Zinatizadeh M. et al. Efficacy of mRNA, adenoviral vector, and perfusion protein COVID-19 vaccines. *Biomed Pharmacother* 2022;146:112527. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112527
- 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
- Galmiche S., Luong Nguyen L.B., Tartour E. et al. Immunological and clinical efficacy of COVID-19 vaccines in immunocompromised populations: a systematic review. *Clin Microbiol Infect* 2022;28(2):163–77. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.09.036
- Zhou R., To K.K., Wong Y.C. et al. Acute SARS-CoV-2 infection impairs dendritic cell and T cell responses. *Immunity* 2020;53(4):864–77.e.5. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.07.026
- Filin I.Y., Kitaeva K.V., Rutland C.S. et al. Recent advances in experimental dendritic cell vaccines for cancer. *Front Oncol* 2021;11:730824. DOI: 10.3389/fonc.2021.730824
- Zhang X., Gordon J.R., Xiang J. Advances in dendritic cell-based vaccine of cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2002;17(6):601–19. DOI: 10.1089/108497802320970217

10. Sadeghzadeh M., Bornehdeli S., Mohahammadrezakhani H. et al. Dendritic cell therapy in cancer treatment; the state-of-the-art. *Life Sci* 2020;254:117580. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117580
11. Saadeldin M.K., Abdel-Aziz A.K., Abdellatif A. Dendritic cell vaccine immunotherapy; the beginning of the end of cancer and COVID-19. A hypothesis. *Med Hypotheses* 2021;146:110365. DOI: 10.1016/j.mehy.2020.110365
12. Brusko M.A., Stewart J.M., Posgai A.L. et al. Immunomodulatory dual-sized microparticle system conditions human antigen presenting cells into a tolerogenic phenotype *in vitro* and inhibits type 1 diabetes-specific autoreactive T cell responses. *Front Immunol* 2020;11:574447. DOI: 10.3389/fimmu.2020.574447
13. Adorini L., Penna G., Giarratana N., Uskokovic M. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *J Cell Biochem* 2003;88(2):227–33. DOI: 10.1002/jcb.10340
14. Shen C., Wang Z., Zhao F. et al. Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma. *JAMA* 2020;323(16):1582–9. DOI: 10.1001/jama.2020.4783
15. Tosta E. The protective immunity induced by SARS-CoV-2 infection and vaccination: a critical appraisal. *Explor Immunol* 2021;1:199–225. DOI: 10.37349/ei.2021.00014
16. Zohar T., Loos C., Fischinger S. et al. Compromised humoral functional evolution tracks with SARS-CoV-2 mortality. *Cell* 2020;183(6):1508–19.e12. DOI: 10.1016/j.cell.2020.10.052
17. Wu Y., Huang Z., Harrison R. et al. Engineering CAR T cells for enhanced efficacy and safety. *APL Bioeng* 2022;6(1):011502. DOI: 10.1063/5.0073746
18. Maus M.V., Grupp S.A., Porter D.L., June C.H. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood* 2014;123(17):2625–35. DOI: 10.1182/blood-2013-11-492231
19. Pule M.A., Savoldo B., Myers G.D. et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 2008;14(11):1264–70. DOI: 10.1038/nm.1882
20. Loskog A., Giandomenico V., Rossig C. et al. Addition of the CD28 signaling domain to chimeric T-cell receptors enhances chimeric T-cell resistance to T regulatory cells. *Leukemia* 2006;20(10):1819–28. DOI: 10.1038/sj.leu.2404366
21. Hombach A.A., Abken H. Costimulation by chimeric antigen receptors revisited: the T cell antitumor response benefits from combined CD28–OX40 signalling. *Int J Cancer* 2011;129(12):2935–44. DOI: 10.1002/ijc.25960
22. Finney H.M., Akbar A.N., Lawson A.D. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR ζ chain. *J Immunol* 2004;172(1):104–13. DOI: 10.4049/jimmunol.172.1.104
23. Maude S.L., Frey N., Shaw P.A. et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 2014;371(16):1507–17. DOI: 10.1056/NEJMoa1407222
24. Zhang Y., Li P., Fang H. et al. Paving the way towards universal chimeric antigen receptor therapy in cancer treatment: current landscape and progress. *Front Immunol* 2020;11:604915. DOI: 10.3389/fimmu.2020.604915
25. Wu J., Mishra H.K., Walcheck B. Role of ADAM17 as a regulatory checkpoint of CD16A in NK cells and as a potential target for cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2019;105(6):1297–303. DOI: 10.1002/JLB.2MR1218-501R
26. Walcheck B., Wu J. iNK-CD64/16A cells: a promising approach for ADCC? *Expert Opin Biol Ther* 2019;19(12):1229–32. DOI: 10.1080/14712598.2019.1667974.
27. Phase I–II Trial of dendritic cell vaccine to prevent COVID-19 in adults. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04386252>.
28. Immunity and safety of Covid-19 synthetic minigene vaccine. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04276896?term=DC&cond=SARS+CoV+2+Infection&draw=2&rank=1>.
29. Zhou Q., Gu H., Sun S. et al. Large-sized graphene oxide nanosheets increase DC-T-cell synaptic contact and the efficacy of DC vaccines against SARS-CoV-2. *Adv Mater* 2021;33(40):e2102528. DOI: 10.1002/adma.202102528
30. Reuter T., Heldmann M., Schimmer S. et al. Protection of mice against Friend retrovirus infection by vaccination with antigen-loaded, spleen-derived dendritic cells. *Vaccine* 2004;22(21–22):2686–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.01.005
31. Norton T.D., Miller E.A. Recent advances in lentiviral vaccines for HIV-1 infection. *Front Immunol* 2016;7:243. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00243
32. Mohamed H., Miller V., Jennings S.R. et al. The evolution of dendritic cell immunotherapy against HIV-1 infection: improvements and outlook. *J Immunol Res* 2020;2020:9470102. DOI: 10.1155/2020/9470102
33. Norton T.D., Zhen A., Tada T. et al. Lentiviral vector-based dendritic cell vaccine suppresses HIV replication in humanized mice. *Mol Ther* 2019;27(5):960–73. DOI: 10.1016/j.yjth.2019.03.008
34. Miller E., Spadaccia M., Sabado R. et al. Autologous aldrithiol-2-inactivated HIV-1 combined with polyinosinic-polycytidylic acid-poly-L-lysine carboxymethylcellulose as a vaccine platform for therapeutic dendritic cell immunotherapy. *Vaccine* 2015;33(2):388–95. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.10.054
35. Hong B., Lee S.H., Song X.T. et al. A super TLR agonist to improve efficacy of dendritic cell vaccine in induction of anti-HCV immunity. *PLoS One* 2012;7(11):e48614. DOI: 10.1371/journal.pone.0048614
36. Zhou Y., Zhao F., Chen L. et al. Development of a dendritic cell vaccine encoding multiple cytotoxic T lymphocyte epitopes targeting hepatitis C virus. *Int J Mol Med* 2013;32(4):901–9. DOI: 10.3892/ijmm.2013.1466
37. Mekonnen Z.A., Masavuli M.G., Yu W. et al. Enhanced T cell responses induced by a necrotic dendritic cell vaccine, expressing HCV NS3. *Front Microbiol* 2020;11:559105. DOI: 10.3389/fmicb.2020.559105
38. Ostanin A.A., Chernykh E.R. Autologous dendritic cell vaccine for treatment of patients with chronic HCV-infection. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03119025?term=DC+vaccine&cond=Hepatitis+C&draw=2&rank=1>.
39. Chernykh E., Leplina O., Oleynik E. et al. Immunotherapy with interferon- α -induced dendritic cells for chronic HCV infection (the results of pilot clinical trial). *Immunol Res* 2018;66(1):31–43. DOI: 10.1007/s12026-017-8967-2
40. Phase I–II vaccination of autologous dendritic cells transduced with adenoviral vector encoding NS3 in hepatitis C encoding NS3 in hepatitis C. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02309086?term=DC+vaccine&cond=Hepatitis+C&draw=2&rank=2>.
41. Chen M., Li Y.G., Zhang D.Z. et al. Therapeutic effect of autologous dendritic cell vaccine on patients with chronic hepatitis B: a clinical study. *World J Gastroenterol* 2005;11(12):1806–8. DOI: 10.3748/wjg.v11.i12.1806
42. A Clinical Trial on Hepatitis B Vaccine Activated-Dendritic Cells Combined With Anti-HBV Drugs in CHB (CTHBVACADCHB). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02615639?term=DC+vaccine&cond=Hepatitis+B&draw=2&rank=1>.
43. Luo J., Li J., Chen R.L. et al. Autologous dendritic cell vaccine for chronic hepatitis B carriers: a pilot, open label, clinical trial in human volunteers. *Vaccine* 2010;28(13):2497–504. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.01.038
44. Akbar S.M., Furukawa S., Horiike N. et al. Safety and immunogenicity of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2011;18(6):408–14. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2010.01320.x
45. Wei M.J., Pan X.N., Wei K.P. et al. Efficacy of HBV-pulsed DCs in combination with entecavir in patients with chronic hepatitis B infection. *Int Immunopharmacol* 2015;27(2):238–43. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.06.019

46. Yang J.Y., Cao D.Y., Liu W.C. et al. Dendritic cell generated from CD34⁺ hematopoietic progenitors can be transfected with adenovirus containing gene of HBsAg and induce antigen-specific cytotoxic T cell responses. *Cell Immunol* 2006;240(1):14–21. DOI: 10.1016/j.cellimm.2006.06.005
47. Long J., Zhou B., Li H. et al. Improvement of HBsAg gene-modified dendritic cell-based vaccine efficacy by optimizing immunization method or the application of β -glucosylceramide. *Immunol Invest* 2013;42(2):137–55. DOI: 10.3109/08820139.2012.744418
48. Chemaly R.F., Ullmann A.J., Stoelben S. et al. Letemovir for cytomegalovirus prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2014;370(19):1781–9. DOI: 10.1056/NEJMoa1309533
49. Van Craenenbroeck A.H., Smits E.L., Anguille S. et al. Induction of cytomegalovirus-specific T cell responses in healthy volunteers and allogeneic stem cell recipients using vaccination with messenger RNA-transfected dendritic cells. *Transplantation* 2015;99(1):120–7. DOI: 10.1097/TP.0000000000000272
50. Ma C.K.K., Clancy L., Simms R. et al. Adjuvant peptide pulsed dendritic cell vaccination in addition to T cell adoptive immunotherapy for cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018;24(1):71–7. DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.08.028
51. Cytomegalovirus (CMV) RNA-pulsed dendritic cells for pediatric patients and young adults with WHO grade IV glioma, recurrent malignant glioma, or recurrent medulloblastoma (ATTAC-P). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03615404?term=DC&cond=CMV&draw=2&rank=1>.
52. Ueno K., Kinjo Y., Okubo Y. et al. Dendritic cell-based immunization ameliorates pulmonary infection with highly virulent *Cryptococcus gattii*. *Infect Immun* 2015;83(4):1577–86. DOI: 10.1128/IAI.02827-14
53. Ueno K., Urai M., Ohkouchi K. et al. Dendritic cell-based vaccine against fungal infection. *Methods Mol Biol* 2016;1403:537–49. DOI: 10.1007/978-1-4939-3387-7_30
54. Ueno K., Urai M., Takatsuka S. et al. Immunization with antigen-pulsed dendritic cells against highly virulent *Cryptococcus gattii* infection: analysis of cytokine-producing T cells. *Methods Mol Biol* 2017;1625:327–39. DOI: 10.1007/978-1-4939-7104-6_22
55. Silva L.B.R., Dias L.S., Rittner G.M.G. et al. Dendritic cells primed with *Paracoccidioides brasiliensis* peptide P10 are therapeutic in immunosuppressed mice with paracoccidioidomycosis. *Front Microbiol* 2017;8:1057. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01057
56. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I. et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell* 2020;181(7):1489–501.e15. DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.015
57. Premkumar L., Segovia-Chumbez B., Jadi R. et al. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci Immunol* 2020;5(48):eabc8413. DOI: 10.1126/sciimmunol.abc8413
58. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder 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.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052
59. Letko M., Marzi A., Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol* 2020;5(4):562–9. DOI: 10.1038/s41564-020-0688-y
60. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Pöhlmann S. A Multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Mol Cell* 2020;78(4):779–84.e5. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.04.022
61. Cao Y., Su B., Guo X. et al. Potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 identified by high-throughput single-cell sequencing of convalescent patients' B cells. *Cell* 2020;182(1):73–84.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.025
62. Shi R., Shan C., Duan X. et al. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. *Nature* 2020;584(7819):120–4. DOI: 10.1038/s41586-020-2381-y
63. Guo X., Kazanova A., Thurmond S. et al. Effective chimeric antigen receptor T cells against SARS-CoV-2. *iScience* 2021;24(11):103295. DOI: 10.1016/j.isci.2021.103295
64. Tian X., Li C., Huang A. et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerg Microbes Infect* 2020;9(1):382–5. DOI: 10.1080/22221751.2020.1729069
65. Mehrabadi A.Z., Ranjbar R., Farzanehpour M. et al. Therapeutic potential of CAR T cell in malignancies: a scoping review. *Biomed Pharmacother* 2022;146:112512. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112512
66. Björkström N.K., Strunz B., Ljunggren H.G. Natural killer cells in antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 2022;22(2):112–23. DOI: 10.1038/s41577-021-00558-3
67. Carlsten M., Childs R.W. Genetic manipulations of NK cells for cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2015;6:266. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00266
68. Simonetta F., Alvarez M., Negrin R.S. Natural killer cells in graft-versus-host-disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Front Immunol* 2017;8:465. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00465
69. Shah N., Li L., McCarty J. et al. Phase I study of cord blood-derived natural killer cells combined with autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2017;177(3):457–66. DOI: 10.1111/bjh.14570
70. Heipertz E.L., Zynda E.R., Stav-Noraas T.E. et al. Current perspectives on “off-the-shelf” allogeneic NK and CAR-NK cell therapies. *Front Immunol* 2021;12:732135. DOI: 10.3389/fimmu.2021.732135
71. Mo F., Mamonkin M., Brenner M.K., Heslop H.E. Taking T-cell oncotherapy off-the-shelf. *Trends Immunol* 2021;42(3):261–72. DOI: 10.1016/j.it.2021.01.004
72. Ma M., Badeti S., Geng K., Liu D. Efficacy of targeting SARS-CoV-2 by CAR-NK cells. *bioRxiv* 2020;2020.08.11:247320. Preprint. DOI: 10.1101/2020.08.11.247320
73. Ma M., Badeti S., Chen C.H. et al. CAR-NK cells effectively target the D614 and G614 SARS-CoV-2-infected cells. *bioRxiv* 2021;2021.01.14:426742. Preprint. DOI: 10.1101/2021.01.14.426742
74. Ma M.T., Badeti S., Chen C.H. et al. CAR-NK cells effectively target SARS-CoV-2-spike-expressing cell lines *in vitro*. *Front Immunol* 2021;12:652223. DOI: 10.3389/fimmu.2021.652223
75. Pinto D., Park Y.J., Beltramello M. et al. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature* 2020;583(7815):290–5. DOI: 10.1038/s41586-020-2349-y
76. Fu W., Lei C., Ma Z. et al. CAR macrophages for SARS-CoV-2 immunotherapy. *Front Immunol* 2021;12:669103. DOI: 10.3389/fimmu.2021.669103
77. Christodoulou I., Rahnama R., Ravich J.W. et al. Glycoprotein targeted CAR-NK cells for the treatment of SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol* 2021;12:763460. DOI: 10.3389/fimmu.2021.763460
78. A phase I/II study of universal off-the-shelf NKG2D-ACE2 CAR-NK cells for therapy of COVID-19. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04324996?term=CAR&cond=COVID-19&draw=2&rank=1>.
79. Sohail A., Yu Z., Arif R. et al. Piecewise differentiation of the fractional order CAR-T cells-SARS-2 virus model. *Results Phys* 2022;33:105046. DOI: 10.1016/j.rinp.2021.105046
80. Al-Utaibi K.A., Nutini A., Sohail A. et al. Forecasting the action of CAR-T cells against SARS-corona virus-II infection with branching process. *Model Earth Syst Environ* 2021:1–9. Online ahead of print. DOI: 10.1007/s40808-021-01312-3

81. Zhu T., Xiao Y., Meng X. et al. Nanovesicles derived from bispecific CAR-T cells targeting the spike protein of SARS-CoV-2 for treating COVID-19. *J Nanobiotechnology* 2021;19(1):391. DOI: 10.1186/s12951-021-01148-0
82. Bednar C., Ensser A. CARs – a new perspective to HCMV treatment. *Viruses* 2021;13(8):1563. DOI: 10.3390/v13081563
83. Seif M., Einsele H., Löffler J. CAR T cells beyond cancer: hope for immunomodulatory therapy of infectious diseases. *Front Immunol* 2019;10:2711. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02711
84. Slabik C., Kalbarczyk M., Danisch S. et al. CAR-T cells targeting Epstein-Barr virus gp350 validated in a humanized mouse model of EBV Infection and lymphoproliferative disease. *Mol Ther Oncolytics* 2020;18:504–24. DOI: 10.1016/j.omto.2020.08.005
85. Tang X., Zhou Y., Li W. et al. T cells expressing a LMP1-specific chimeric antigen receptor mediate antitumor effects against LMP1-positive nasopharyngeal carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *J Biomed Res* 2014;28(6):468–75. DOI: 10.7555/JBR.28.20140066
86. Kieser A., Sterz K.R. The latent membrane protein 1 (LMP1). *Curr Top Microbiol Immunol* 2015;391:119–49. DOI: 10.1007/978-3-319-22834-1_4
87. LMP1 CAR-T for Patients With LMP1 positive infectious diseases and hematological malignancies. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04657965?term=CAR&cond=Infections&draw=2&rank=3>.
88. Maldini C.R., Ellis G.I., Riley J.L. CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation. *Nat Rev Immunol* 2018;18(10):605–16. DOI: 10.1038/s41577-018-0042-2
89. Liu L., Patel B., Ghanem M.H. et al. Novel CD4-based bispecific chimeric antigen receptor designed for enhanced anti-HIV potency and absence of HIV entry receptor activity. *J Virol* 2015;89(13):6685–94. DOI: 10.1128/JVI.00474-15
90. Zhen A., Peterson C.W., Carrillo M.A. et al. Long-term persistence and function of hematopoietic stem cell-derived chimeric antigen receptor T cells in a nonhuman primate model of HIV/AIDS. *PLoS Pathog* 2017;13(12):e1006753. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006753
91. Leslie G.J., Wang J., Richardson M.W. et al. Potent and broad inhibition of HIV-1 by a peptide from the gp41 heptad repeat-2 domain conjugated to the CXCR4 amino terminus. *PLoS Pathog* 2016;12(1):e1005983. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005983
92. Maldini C.R., Gayout K., Leibman R.S. et al. HIV-resistant and HIV-specific CAR-modified CD4+ T cells mitigate HIV disease progression and confer CD4+ T cell help *in vivo*. *Mol Ther* 2020;28(7):1585–99. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.05.012
93. Jiang Z., Liang H., Pan H. et al. HIV-1-specific CAR-T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade enhance anti-HIV efficacy *in vivo*. *Front Microbiol* 2021;12:684016. DOI: 10.3389/fmicb.2021.684016
94. Pampusch M.S., Abdelaal H.M., Cartwright E.K. et al. CAR/CXCR5-T cell immunotherapy is safe and potentially efficacious in promoting sustained remission of SIV infection. *PLoS Pathog* 2022;18(2):e1009831. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009831
95. Lim R.M., Rong L., Zhen A., Xie J. A universal CAR-NK cell targeting various epitopes of HIV-1 gp160. *ACS Chem Biol* 2020;15(8):2299–310. DOI: 10.1021/acscchembio.0c00537
96. Kim G.B., Hege K., Riley J.L. CAR talk: how cancer-specific CAR T cells can instruct how to build CAR T cells to cure HIV. *Front Immunol* 2019;10:2310. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02310
97. CD4 CAR+ ZFN-modified T cells in HIV therapy. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03617198>.
98. CAR-T cells for HIV infection. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04648046?term=CAR&cond=Infections&draw=2&rank=1>.
99. Third-Generation CAR-T-cell Therapy in Individuals With HIV-1 Infection (TCTIWHI). Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04863066?term=CAR&cond=Infections&draw=2&rank=2>.
100. The effect of chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy on the reconstitution of HIV-specific immune function. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03240328?term=CAR&cond=Infections&draw=2&rank=10>.
101. Meng Z., Chen Y., Lu M. Advances in targeting the innate and adaptive immune systems to cure chronic hepatitis B virus infection. *Front Immunol* 2020;10:3127. DOI: 10.3389/fimmu.2019.03127
102. Bohne F., Chmielewski M., Ebert G. et al. T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology* 2008;134(1):239–47. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.11.002
103. Krebs K., Böttinger N., Huang L.R. et al. T cells expressing a chimeric antigen receptor that binds hepatitis B virus envelope proteins control virus replication in mice. *Gastroenterology* 2013;145(2):456–65. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.04.047
104. Kruse R.L., Shum T., Tashiro H. et al. HBsAg-redirection T cells exhibit antiviral activity in HBV-infected human liver chimeric mice. *Cytherapy* 2018;20(5):697–705. DOI: 10.1016/j.jcyt.2018.02.002
105. Klopp A., Schreiber S., Kosinska A.D. et al. Depletion of T cells *via* inducible caspase 9 increases safety of adoptive T-Cell therapy against chronic hepatitis B. *Front Immunol* 2021;12:734246. DOI: 10.3389/fimmu.2021.734246
106. Festag M.M., Festag J., Fräßle S.P. et al. Evaluation of a fully human, hepatitis B virus-specific chimeric antigen receptor in an immunocompetent mouse model. *Mol Ther* 2019;27(5):947–59. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.02.001
107. Sautto G.A., Wisskirchen K., Clementi N. et al. Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered T cells redirected against hepatitis C virus (HCV) E2 glycoprotein. *Gut* 2016;65(3):512–23. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-308316

Вклад авторов

И.О. Чикилева, И.Ж. Шубина, М.В. Киселевский: анализ данных литературы, написание текста статьи и ее обсуждение.

Authors' contributions

I.O. Chikileva, I.Zh. Shubina, M.V. Kiselevskiy: analysis of the literature data, writing the text of the review and its discussion.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.О. Чикилева / I.O. Chikileva: <https://orcid.org/0000-0003-0769-1695>

И.Ж. Шубина / I.Zh. Shubina: <https://orcid.org/0000-0002-9374-3158>

М.В. Киселевский / M.V. Kiselevskiy: <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 29.04.2022. **Принята к публикации:** 16.05.2022.

Article submitted: 29.04.2022. **Accepted for publication:** 16.05.2022.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-2-33-39>

Присутствие мРНК раково-тестикулярных генов в опухоли и периферической крови больных раком эндометрия

А. В. Калугин¹, Д. В. Новиков^{1,2}, М. Е. Мамаева³, А. В. Алясова⁴, Х. М. Ариуа¹, В. В. Новиков^{1,2}

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского»; Россия, 603950 Нижний Новгород, пр-кт Гагарина, 23;

²ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И. Н. Блохиной»; Россия, 603950 Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71;

³ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» Федерального медико-биологического агентства; Россия, 603001 Нижний Новгород, Нижневолжская наб., 2;

⁴ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России; Россия, 603950 Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

Контакты: Виктор Владимирович Новиков mbre@mail.ru

Введение. Раково-тестикулярные (РТ) гены экспрессируются в опухолевых клетках при многих онкологических заболеваниях, в том числе при раке эндометрия (РЭ). мРНК РТ-генов выявлена в крови больных с новообразованиями, что определяет перспективность использования мРНК РТ-генов в качестве опухолеассоциированных биомаркеров. В периферической крови больных РЭ экспрессия РТ-генов ранее не изучалась.

Цель исследования – оценка встречаемости мРНК принадлежащих разным семействам РТ-генов (*MAGEA1–MAGEA6* (*MAGEA(1–6)*), *SSX1*, *2*, *4*, *XAGE1*, *MAGEC1*, *NY-ESO1*) в опухолевых очагах и периферической крови больных РЭ.

Материалы и методы. В работе использовали 52 образца опухолевых очагов и 54 образца цельной периферической крови пациенток 39–79 лет с диагнозом РЭ, проходивших лечение в клиниках Нижнего Новгорода, а также крови 30 здоровых добровольцев. В крови и опухолях с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией определяли частоту встречаемости мРНК 12 наименований РТ-генов.

Результаты. Показано, что мРНК тестированных РТ-генов обнаруживается при РЭ не только в опухолях, но и в цельной периферической крови больных. Чаще всего встречается мРНК *MAGEA(1–6)*. При этом как в опухолях, так и в периферической крови больных обнаруживается высокая гетерогенность экспрессии РТ-генов. Выявлены случаи обнаружения мРНК *MAGEA(1–6)*, *SSX1*, *2*, *4*, *XAGE1*, *NY-ESO1*, *MAGEC1* в опухоли больных РЭ при отсутствии их детекции в периферической крови и наоборот. Суммарная частота встречаемости мРНК *MAGEA(1–6)*, *SSX1*, *2*, *4*, *XAGE1*, *NY-ESO1*, *MAGEC1* в опухолевых очагах составила 75,0 %, а в периферической крови – 44,6 %. Как и в опухолях, в большинстве образцов крови обнаруживалась экспрессия только одного РТ-гена. Лишь в отдельных случаях регистрировалась экспрессия 2 или 3 генов. Заметим, что во всех образцах крови здоровых добровольцев мРНК РТ-генов не обнаруживалась. Смешанная форма роста опухоли (экзофитная + эндофитная), рост по дну и стенкам матки, а также низкая степень дифференцировки опухолевых клеток характеризовались более высокой встречаемостью мРНК РТ-генов в крови и опухолях больных.

Заключение. При РЭ мРНК РТ-генов встречается в крови и опухолевых очагах больных. Более тяжелое течение РЭ сопровождается повышением частоты встречаемости мРНК РТ-генов.

Ключевые слова: раково-тестикулярные гены, мРНК, рак эндометрия, опухоль, периферическая кровь

Для цитирования: Калугин А. В., Новиков Д. В., Мамаева М. Е. и др. Присутствие мРНК раково-тестикулярных генов в опухоли и периферической крови больных раком эндометрия. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(2):33–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-33-39

Cancer-testis genes mRNA presence in tumor lesion and peripheral blood of endometrial cancer patients

Alexander V. Kalugin¹, Dmitriy V. Novikov^{1,2}, Marina E. Mamaeva³, Anna V. Alyasova⁴, Khalil M. Arioua¹, Viktor V. Novikov^{1,2}

¹*N. I. Lobachevsky National Research State University of Nizhny Novgorod; 23 Gagarin Ave., Nizhny Novgorod 603950, Russia;*

²*Academician N. I. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 71 Malaya Yamskaya St., Nizhny Novgorod 603950, Russia;*

³*Medical Center of Privolzhsky District, Federal Medical Biological Agency; 2 Nizhnevolzhskaya Embankment, Nizhny Novgorod 603001, Russia;*

⁴*Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 10/1 Minin and Pozharsky Sq., Nizhny Novgorod 603950, Russia*

Contacts: Viktor Vladimirovich Novikov *mbre@mail.ru*

Background. Cancer-testicular (CT) genes express in tumor cells in many cancers, including endometrial cancer (ER). CT genes mRNA was detected in the blood of patients with neoplasms, which determines the prospects of using CT gene mRNA as tumor-associated biomarkers. In the peripheral blood of patients with ER, the expression of CT genes has not been studied before.

Objective. Assessment of occurrence of mRNA of the CT genes *MAGEA1–MAGEA6* (*MAGEA(1–6)*), *SSX1, 2, 4, XAGE1, MAGEC1, NY-ESO1* in the tumors and peripheral blood of patients with ER.

Materials and methods. The work used 52 samples of tumor and 54 samples of whole peripheral blood of patients 39–79 years old diagnosed with RE who were treated in clinics in Nizhny Novgorod, as well as the blood of 30 healthy volunteers. In blood and tumors, the frequency of occurrence of mRNA of 12 CT genes was determined using multiplex reverse transcription polymerase chain reaction.

Results. It has been shown that the mRNA of the tested CT genes is detected in ER not only in tumors, but also in the peripheral blood of patients. The most common mRNA is *MAGEA(1–6)*. At the same time, both in tumors and in the peripheral blood of patients, high heterogeneity in the expression of CT genes detected. Moreover, cases of *MAGEA(1–6), SSX1, 2, 4, XAGE1, NY-ESO1, MAGEC1* mRNA detection in tumors were revealed in the absence of their detection in the peripheral blood and conversely. The total frequency of *MAGEA(1–6), SSX1, 2, 4, XAGE1, NY-ESO1, MAGEC1* mRNA occurrence in tumors was 75.0 %, and in peripheral blood – 44.6 %. As in tumors, most blood samples showed expression of only one CT gene. Only in some cases the expression of two or three genes was recorded. Note that in all blood samples of healthy volunteers mRNA CT genes was not detected. Additionally, mixed form of macroscopic growth (both exophytic and endophytic), growth along the uterine fundus and walls, as well as low degree of differentiation were followed by a higher mRNA CT genes occurrence in the blood and tumors.

Conclusion. In ER mRNA CT genes occur in the blood and tumors of patients. A more severe course of ER is associated with an increase in the incidence of mRNA CT genes.

Keywords: cancer-testicular genes, mRNA, endometrial cancer, tumor, peripheral blood

For citation: Kalugin A.V., Novikov D.V., Mamaeva M.E. et al. Cancer-testis genes mRNA presence in tumor lesion and peripheral blood of endometrial cancer patients. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2022;21(2):33–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-33-39

Введение

К раково-тестикулярным (РТ, cancer-testis) относят группу генов, общей характеристикой которых является ограниченная экспрессия в гаметогенных и опухолевых клетках. В соматических клетках их экспрессия обычно блокирована эпигенетически [1]. РТ-гены картированы и на аутозомах (X-независимые РТ-гены), и на половых хромосомах (X- и Y-ассоциированные РТ-гены) [2]. В клетках злокачественных опухолей экспрессия РТ-генов ассоциирована с повышением уровня генетической нестабильности и пролиферации, эпителиально-мезенхимальным переходом, иммортализацией, ангиогенезом, способностью к миграции и уклонению от иммунологического надзора [3]. Экспрессия РТ-генов обнаружена во многих опухолях. Кроме того, матричная РНК (мРНК) РТ-генов выявлена в крови больных с новообразованиями, что определяет перспективность использования мРНК РТ-генов в качестве опухоль-ассоциированных биомаркеров [4, 5]. При раке

эндометрия (РЭ) в опухолевых клетках также обнаружена мРНК ряда РТ-генов [6]. Однако в периферической крови больных РЭ экспрессия РТ-генов не изучалась.

Цель данного исследования – анализ частоты выявления мРНК X-ассоциированных РТ-генов разных семейств в периферической крови и опухолевых очагах больных РЭ.

Материалы и методы

В работе использовали 52 образца опухолевых очагов и 54 образца цельной периферической крови пациенток 39–79 лет с диагнозом РЭ, проходивших лечение в ГБУЗ НО «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко», ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер» и ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА России, а также кровь 30 клинически здоровых добровольцев. Формирование групп больных осуществлялось после

постановки диагноза на основании клинического, морфологического, эндоскопического, рентгенологического обследований и по результатам оперативного вмешательства. Больные были разделены на группы в соответствии со стадией заболевания, локализацией опухоли, степенью дифференцировки клеток опухоли, формой макроскопического роста опухоли.

Кровь для тестирования брали натощак утром в день операции до резекции опухоли. Работу с кровью и образцами опухолей проводили в соответствии с международными правилами работы с биологическим материалом. Кусочки опухоли размером $2,0 \times 2,0 \times 2,0$ мм иссекали в ходе плановых операций, промывали в физиологическом растворе и помещали в 500 мкл лизирующего буферного раствора (4 М гуанидин-изоотиоцианат, 0,5 % Тритон X-100, 25 мМ ацетат натрия, pH 7,0). Периферическую кровь смешивали с лизирующим буферным раствором в соотношении 1:1. Суммарную РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с последующей преципитацией спиртами.

С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) определяли частоту встречаемости мРНК 12 наименованных X-ассоциированных генов (*MAGEA1–MAGEA6* (*MAGEA(1–6)*), *NY-ESO1*, *XAGE1*, *SSX1*, 2, 4, *MAGEC1*), принадлежащих к разным семействам и не обнаруживаемых в нормальных соматических клетках. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием эквимольной смеси (4 пмоль) обратных праймеров, специфичных к мРНК тестируемых РТ-генов [6, 7], и ревертазы М–MLV (Fermentas, Латвия) согласно рекомендациям производителя.

Для амплификации кДНК РТ-генов выполняли 2 раунда «гнездовой» ПЦР. Амплификацию проводили в объеме 25 мкл. Реакционная смесь для первого раунда ПЦР содержала 70 мМ Трис-НСl, 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8,3, 3 мМ MgCl_2 , по 0,2 мМ каждого из четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов («Силекс», Россия), по 20 пмоль прямого и обратного праймеров, 2 мкл кДНК, 2,5 е. а. HotTaq-полимеразы («Силекс», Россия). Реакционная смесь для второго раунда ПЦР содержала 70 мМ Трис-НСl, 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8,3, 2 мМ MgCl_2 , по 0,16 мМ каждого из четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов («Силекс», Россия), по 20 пмоль прямого и обратного праймеров, 2 мкл ДНК, 2,5 е. а. HotTaq-полимеразы («Силекс», Россия).

В ОТ-ПЦР использовали праймеры, комплементарные местам соединения экзонов в первичной структуре мРНК РТ-генов, которые были сконструированы ранее. Праймеры синтезированы ООО НПФ «Литех» (Россия). В первом раунде проводили 35 циклов мультиплексной ПЦР при условиях: $94^\circ\text{C} - 30$ с, $55^\circ\text{C} - 30$ с, $72^\circ\text{C} - 40$ с. Во втором раунде проводи-

ли 25 циклов ген-специфической ПЦР для каждой из исследуемых мРНК РТ-генов, кроме мРНК *SSX1*, 2, 4, при следующих условиях: $94^\circ\text{C} - 30$ с, $60^\circ\text{C} - 30$ с, $72^\circ\text{C} - 40$ с. Для детекции мРНК *SSX1*, 2, 4 проводили 25 циклов второй ПЦР при условиях: $94^\circ\text{C} - 30$ с, $56^\circ\text{C} - 30$ с, $72^\circ\text{C} - 40$ с.

В качестве положительного контроля использовали положительные по мРНК РТ-генов образцы опухоли и тест на определение мРНК гена убиквитинлигазы С (*UBC*). Результаты реакции регистрировали методом горизонтального электрофореза в 1,5 % агарозном геле в присутствии 5 мкг/мл бромида этидия при напряжении 170 вольт, мощности 73 Вт и силе тока 250 мА.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Statistica v. 10.0 и MS Excel 2003. Для оценки встречаемости мРНК исследуемых РТ-генов рассчитывали относительные частоты обнаружения. Для анализа различий относительных частот обнаружения мРНК в группах использовали двусторонний (двухходовый) тест критерия сравнения пропорций. Для анализа различий абсолютных частот детекции мРНК в группах применяли критерий χ^2 по Пирсону или двусторонний тест точного критерия Фишера. Доверительный интервал выбрали равным 0,95. Различия считали статистически значимыми при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В опухолевых очагах чаще всего обнаруживалась общая мРНК генов *MAGEA(1–6)*, выявляемая с помощью разработанного нами ранее теста [8]. Частота обнаружения мРНК генов *MAGEA(1–6)* составила 53,8 % (28 из 52 образцов опухолей). Несколько реже встречались мРНК генов *SSX1*, 2, 4, также детектируемая в одном тесте (38,5 % случаев), и мРНК гена *XAGE1* (23,1 % случаев). мРНК генов *MAGEC1* и *NY-ESO1* обнаруживалась значительно реже (5,7 и 7,7 % случаев соответственно). Суммарная частота обнаружения мРНК тестируемых генов в опухолевых очагах составила 75,0 % (39 из 52 образцов) (рис. 1).

В 51,2 % положительных образцов детектировалась мРНК только одного гена, в 30,8 % положительных образцов обнаруживалась мРНК 2 генов. В остальных случаях выявлялась мРНК 3 или 4 разных генов. Чаще всего совместная экспрессия была свойственна генам *MAGEA(1–6)* и *XAGE1*.

В периферической крови частота встречаемости мРНК тестируемых РТ-генов была, как правило, ниже. Исключение составила мРНК *NY-ESO1*, которая обнаруживалась в 11,1 % случаев, что в 1,4 раза выше частоты экспрессии этого гена в опухоли. Общая частота детекции мРНК РТ-генов составила 44,6 %, что в 1,7 раза меньше, чем в опухолевых очагах (см. рис. 1). При этом чаще всего обнаруживалась

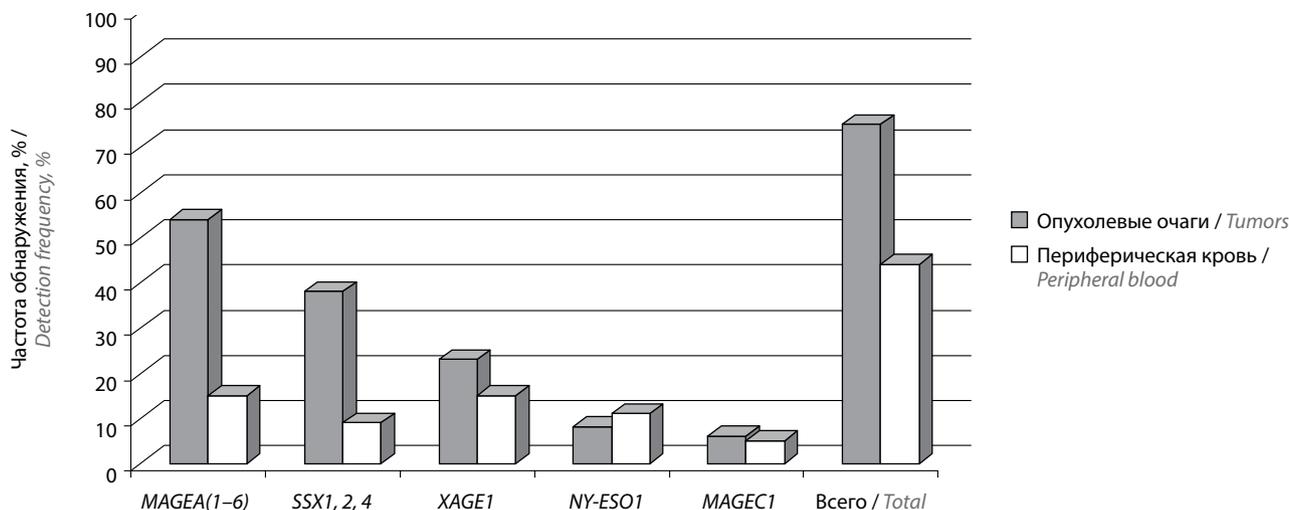


Рис. 1. Частота обнаружения мРНК *MAGEA(1-6)*, *NY-ESO1*, *XAGE1*, *SSX1, 2, 4*, *MAGEC1* в опухолевых очагах и периферической крови больных раком эндометрия

Fig. 1. Frequency of *MAGEA(1-6)*, *NY-ESO1*, *XAGE1*, *SSX1, 2, 4*, *MAGEC1* mRNA detection in tumors and peripheral blood of patients with endometrial cancer

мРНК генов *MAGEA(1-6)* и *XAGE1*. Частота их детекции в обоих случаях составила 14,8 %. Как и в опухолях, в большинстве образцов крови обнаруживалась экспрессия только одного РТ-гена. Лишь в отдельных случаях регистрировалась экспрессия 2 или 3 генов. Заметим, что во всех образцах крови здоровых добровольцев мРНК РТ-генов не обнаруживалась.

Набор мРНК РТ-генов, выявляемых в опухолевых очагах, далеко не всегда совпадал с набором, обнаруживаемым в периферической крови. У 15 из 39 больных мРНК РТ-генов регистрировалась в опухолях, но не детектировалась в крови, а у 6 больных, наоборот, мРНК РТ-генов присутствовала в крови, но не определялась в опухоли. Причиной отсутствия мРНК в тестируемом образце опухоли, вероятно, является пространственная неоднородность клеточно-гистологического состава опухолевых очагов.

Еще у 6 больных РЭ детектируемые наборы мРНК различались в крови и опухоли, и лишь у 12 больных определены одинаковые наборы мРНК РТ-генов в крови и опухоли. Таким образом, полученные данные продемонстрировали достаточно высокую гетерогенность экспрессии разных РТ-генов в опухолях больных РЭ и различия со спектрами мРНК РТ-генов, обнаруживаемыми в периферической крови этих же больных.

Проведено сопоставление частоты детекции мРНК генов *MAGEA(1-6)*, *SSX1, 2, 4*, *XAGE1*, *MAGEC1*, *NY-ESO1* в опухолевых очагах и периферической крови больных с разными формами макроскопического роста, типами (глубиной) инвазивного/инфильтративного роста, степенью дифференцировки и локализацией опухоли в теле матки.

В опухолях со смешанным ростом суммарная частота обнаружения тестируемых мРНК достигала

90 % и была статистически значимо выше, чем в опухолях с эндофитным ростом ($p = 0,03$). Основной вклад вносила мРНК *MAGEA(1-6)*, частота обнаружения которой также была статистически значимо выше, чем у больных с эндофитным ростом опухоли ($p = 0,005$). В периферической крови тех же больных суммарная частота обнаружения мРНК РТ-генов при смешанном росте превышала частоту детекции при экзофитном ($p = 0,017$) и эндофитном росте опухоли ($p = 0,035$). Реже всего мРНК РТ-генов выявляли при экзофитном росте. Так, мРНК *SSX1, 2, 4*, *XAGE1*, *MAGEC1* не была обнаружена ни у одного больного с экзофитным ростом опухоли.

Различия в глубине инвазивного роста не сопровождалось статистически значимыми изменениями в частоте выявления тестируемых мРНК. Максимальная суммарная частота обнаружения мРНК РТ-генов (до 90 %) была характерна для опухолевых очагов больных с ростом опухоли по дну и стенкам матки. Чаще всего определялась мРНК *MAGEA(1-6)*. Эти же больные характеризовались наиболее частым присутствием мРНК РТ-генов в периферической крови.

Степень дифференцировки опухоли не отражалась на частоте детекции мРНК РТ-генов в опухолевых очагах. Однако в крови больных с низкодифференцированным РЭ статистически значимо чаще обнаруживалась мРНК генов *SSX1, 2, 4* и *NY-ESO1*. В обоих случаях мРНК детектировалась у каждой 3-й больной. Суммарная частота обнаружения мРНК РТ-генов имела тенденцию к повышению по мере уменьшения степени дифференцировки опухолевых клеток (рис. 2).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что мРНК РТ-генов *MAGEA(1-6)*,

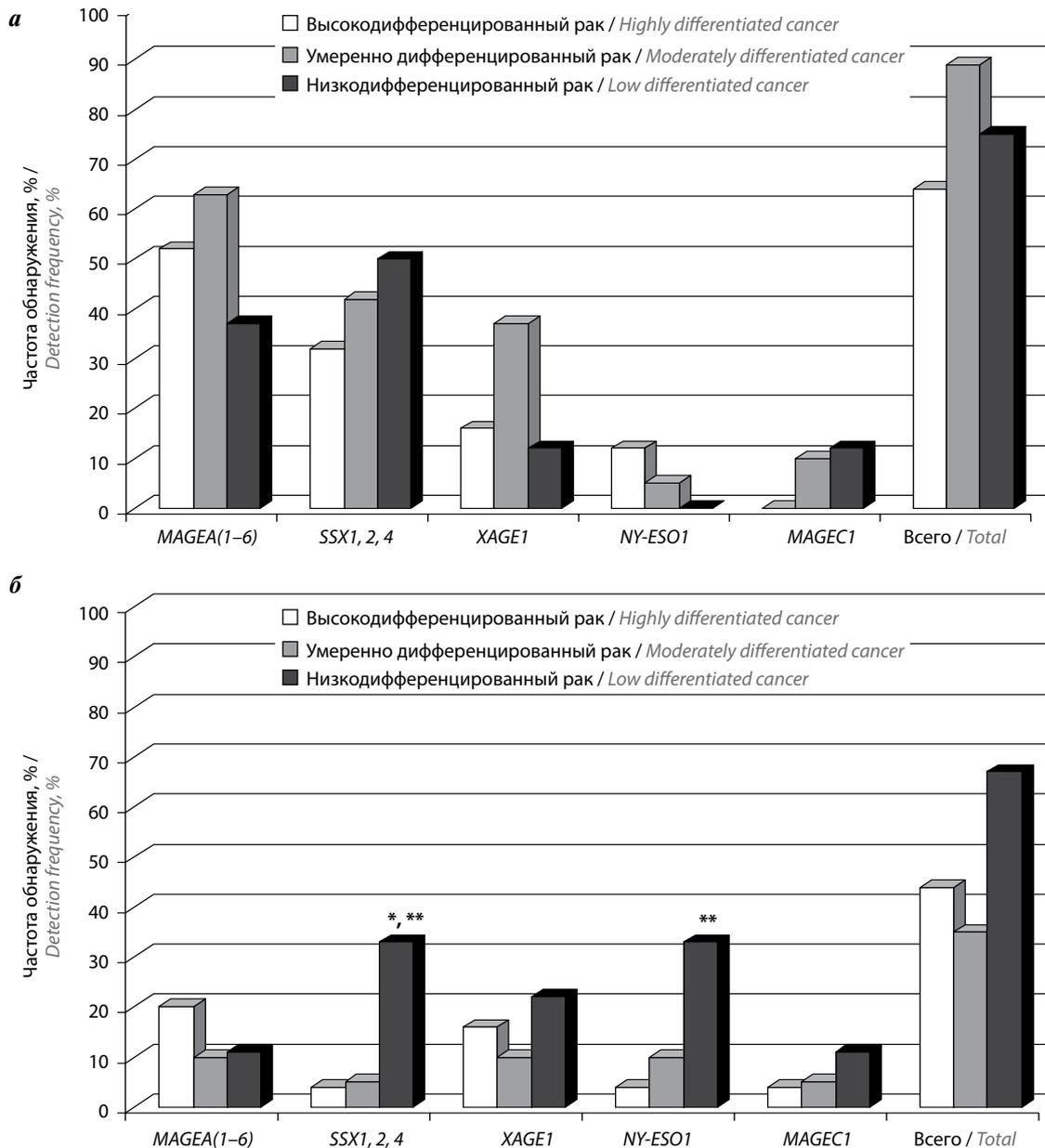


Рис. 2. Частота обнаружения мРНК MAGEA(1-6), SSX1, 2, 4, XAGE1, NY-ESO1 и MAGEC1 у больных раком эндометрия при разной степени дифференцировки опухоли: а – в опухолевых очагах, б – в периферической крови; *статистически значимые различия по сравнению с умеренно дифференцированным раком ($p = 0,041$), **статистически значимые различия по сравнению с высокодифференцированным раком ($p < 0,05$)

Fig. 2. Frequency of MAGEA(1-6), SSX1, 2, 4, XAGE1, NY-ESO1 and MAGEC1 mRNA detection in patients with endometrial cancer with different degrees of tumor differentiation: а – tumors, б – peripheral blood; *statistically significant differences with moderately differentiated cancer ($p = 0.041$), **statistically significant differences with highly differentiated cancer ($p < 0.05$)

SSX1, 2, 4, XAGE1, MAGEC1, NY-ESO1 с разной частотой выявляется не только в опухолях больных РЭ, но и в их периферической крови. В целом встречаемость мРНК РТ-генов в опухолях выше, чем в периферической крови. При этом обнаруживаются высокая гетерогенность экспрессии РТ-генов в опухолях больных и различия со спектрами мРНК РТ-генов в периферической крови этих же больных. Выявлены случаи обнаружения мРНК MAGEA(1-6), SSX1, 2, 4,

XAGE1, NY-ESO1 и MAGEC1 в периферической крови больных РЭ при отсутствии их детекции в опухоли и наоборот.

Анализ встречаемости мРНК РТ-генов MAGEA(1-6), SSX1, 2, 4, XAGE1, MAGEC1, NY-ESO1 показал, что глубина инвазивного роста опухоли не отражалась на частоте присутствия мРНК РТ-генов в опухолевых очагах и периферической крови больных РЭ. Однако различия в форме макроскопического роста

и локализации опухоли, а также в степени ее дифференцировки сопровождалась изменениями в частоте обнаружения мРНК РТ-генов в периферической крови. Смешанная форма роста (экзофитная + эндофитная), рост по дну и стенкам матки, а также низкая степень дифференцировки характеризовались более высокой встречаемостью мРНК РТ-генов в крови больных. То есть по мере прогрессирования РЭ увеличивается вероятность присутствия мРНК тестированных РТ-генов в крови больных.

Представленные результаты дополняют полученные другими авторами данные об экспрессии РТ-генов *MAGEA4*, *MAGEA9*, *SSX1*, *2*, *4*, *NY-ESO1* в опухолях больных РЭ [9] и демонстрируют присутствие мРНК РТ-генов также в крови больных. В периферической крови мРНК РТ-генов ранее была обнаружена при ряде других онкологических заболеваний, таких как рак толстой кишки, легких, почки, печени и др. [10–12]. Вероятной причиной появления в крови онкологических больных мРНК РТ-генов, в соответствии с разными источниками литературы, могут быть циркулирующие опухолевые клетки, экзосомы, деградация опухолевых клеток и появление в кровотоке нуклеопротеидных комплексов [13]. Наличие

мРНК РТ-генов в периферической крови можно рассматривать в качестве биомаркера опухолевого процесса, имеющего потенциальное мониторинговое значение и способного привести дополнительную информацию о патогенезе заболевания.

Заключение

С помощью двухраундовой «гнездовой» ОТ-ПЦР показано, что X-ассоциированные РТ-гены *MAGEA(1–6)*, *SSX1*, *2*, *4*, *XAGE1*, *MAGEC1*, *NY-ESO1* гетерогенно экспрессируются в опухолевых очагах больных РЭ. При этом мРНК данных генов обнаруживается также в периферической крови больных. Частота обнаружения мРНК каждого из тестированных РТ-генов различалась в крови и опухоли онкологических больных. Суммарная встречаемость мРНК *MAGEA(1–6)*, *SSX1*, *2*, *4*, *XAGE1*, *NY-ESO1* и *MAGEC1* в опухолевых очагах составила 75,0 %, а в периферической крови – 44,6 %. Более тяжелое течение РЭ, отражающееся в таких показателях, как смешанный рост опухоли, заполнение опухолью полости матки, низкодифференцированный гистологический тип опухоли, ассоциировано с повышением частоты встречаемости мРНК РТ-генов в крови и опухолевых очагах.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Van Tongelen A., Lorient A., De Smet C. Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Lett* 2017;396:130–7. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.03.029
2. Liu W.-S. Mammalian sex chromosome structure, gene content, and function in male fertility. *Annu Rev Anim Biosci* 2019;7: 103–24. DOI: 10.1146/annurev-animal-020518-115332
3. Gjerstorff M.F., Andersen M.H., Ditzel H.J. Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget* 2015;6(18):15772–87. DOI: 10.18632/oncotarget.4694
4. Guo L., Xu D., Lu Y. et al. Detection of circulating tumor cells by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction and magnetic activated cell sorting in the peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* 2017;16(5):5894–900. DOI: 10.3892/mmr.2017.7372
5. Gu L., Sang M., Yin D. et al. *MAGE-A* gene expression in peripheral blood serves as a poor prognostic marker for patients with lung cancer. *Thorac Cancer* 2018;9(4):431–8. DOI: 10.1111/1759-7714.12571
6. Vanderstraeten A., Tuyaerts S., Everaert T. et al. *In Vitro* assessment of the expression and T cell immunogenicity of the tumor-associated antigens *BORIS*, *MUC1*, *hTERT*, *MAGE-A3* and Sp17 in uterine cancer. *Int J Mol Sci* 2016;17(9):1525. DOI: 10.3390/ijms17091525
7. Калугин А.В., Новиков Д.В., Конторщикова Е.Ю. и др. Присутствие мРНК раково-тестикулярных генов в клетках опухолевых очагов и периферической крови больных миомой матки. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*. 2012;2(3):196–200. Kalugin A.V., Novikov D.V., Kontorshchikova E.Yu. et al. The presence of mRNA of cancer-testicular genes in the cells of tumor foci and peripheral blood of patients with uterine myoma. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo = Vestnik of Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod* 2012;2(3):196–200. (In Russ.).
8. Новиков Д.В., Белова Т.В., Пегов Р.Г. и др. Частота обнаружения мРНК *MAGE-A1-A6* в крови онкологических больных. *Клиническая лабораторная диагностика* 2009;4:25–7. PMID: 19514330. Novikov D.V., Belova T.V., Pegov R.G. et al. The frequency of detection of *MAGE-A1-A6* mRNA in the blood of cancer patients. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics* 2009;4:25–7. (In Russ.). PMID: 19514330.
9. Novikov D.V., Belova T.V., Plekhanova E.S. et al. [Early detection of cancer/testis mRNAs in tumor cells circulating in the peripheral blood of colorectal cancer patients (In Russ.)]. *Mol Biol (Mosk.)* 2012;46(5):766–72. PMID: 23156676.
10. Гуррам Н., Новиков Д.В., Алясова А.В., Новиков В.В. Экспрессия раково-тестикулярных генов у больных раком почки. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского* 2012;2(3):183–6. Gourram N., Novikov D.V., Aliasova A.A., Novikov V.V. Expression of cancer-testicular genes in patients with kidney cancer. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo = Vestnik of Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod* 2012;2(3):183–6. (In Russ.).
11. Hilal N.R., Novikov D.V., Novikov V.V., Karaulov A.V. [Cancer-testis genes in colon cancer (In Russ.)]. *Ter Arkh* 2017;89(5):113–7. DOI: 10.17116/terarkh2017895113-117
12. Kannan A., Philley J.V., Hertweck K.L. et al. Cancer testis antigen promotes triple negative breast cancer metastasis and is traceable in the circulating extracellular vesicles. *Sci Rep* 2019;9(1):11632. DOI: 10.1038/s41598-019-48064-w
13. Kuldkapp A., Karakai M., Toomsoo E. et al. Cancer-testis antigens *MAGEA* proteins are incorporated into extracellular vesicles released by cells. *Oncotarget* 2019;10(38):3694–708. DOI: 10.18632/oncotarget.26979

Вклад авторов

А.В. Калугин: получение данных для анализа;
Д.В. Новиков: получение данных для анализа, написание текста рукописи;
М.Е. Мамаева, А.В. Алясова: анализ полученных данных;
Х.М. Ариуа: обзор публикаций по теме статьи;
В.В. Новиков: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

A.V. Kalugin: obtaining data for analysis;
D.V. Novikov: obtaining data for analysis, manuscript writing;
M.E. Mamaeva, A.V. Alyasova: analysis of the obtained data;
K.M. Arioua: review of publications on the topic of the article;
V.V. Novikov: research design development.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.В. Калугин / A.V. Kalugin: <https://orcid.org/0000-0002-5484-5645>
Д.В. Новиков / D.V. Novikov: <https://orcid.org/0000-0001-7049-6935>
М.Е. Мамаева / M.E. Mamaeva: <https://orcid.org/0000-0001-5961-7986>
А.В. Алясова / A.V. Alyasov: <https://orcid.org/0000-0003-2621-0359>
Х.М. Ариуа / K.M. Arioua: <https://orcid.org/0000-0003-1179-2552>
В.В. Новиков / V.V. Novikov: <https://orcid.org/0000-0002-2449-7213>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Работу с кровью и образцами опухолей проводили в соответствии с международными правилами работы с биологическим материалом. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The work with blood and tumor samples was carried out in accordance with the international rules for working with biological material. All patients signed informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 22.04.2022. Принята к публикации: 16.05.2022.

Article submitted: 22.04.2022. Accepted for publication: 16.05.2022.

Молекулярные подтипы и иммунная система костного мозга в прогнозе рака молочной железы

Ф.К. Бердова, Т.А. Григорьева, И.К. Воротников, Н.Н. Тупицын

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

Контакты: Николай Николаевич Тупицын nntca@yahoo.com

Введение. Молекулярные подтипы рака молочной железы в настоящее время служат базисом для комбинированного лечения данного заболевания. Хорошо известно, что некоторые из них, например базальноподобный, являются чрезвычайно неблагоприятными даже при проведении современного лечения. Ранее нами была показана роль В-клеток костного мозга в прогнозе рака молочной железы. Взаимосвязь между этими параметрами (молекулярные подтипы и субпопуляции костномозговых лимфоцитов) до настоящего времени не анализировалась.

Цель исследования – изучить прогностическую роль молекулярных подтипов рака молочной железы в современной терапии и оценить взаимосвязь между этими подтипами и субпопуляционным составом лимфоцитов костного мозга пациентов.

Материалы и методы. Детальные исследования костного мозга проведены 107 больным, проходившим лечение в отделении опухолей молочных желез ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в основном в период 2013–2016 гг. Распределение больных по молекулярным подтипам было следующим: люминальный А – 36 (33,6 %) больных, люминальный В HER2-отрицательный – 38 (35,5 %), люминальный В HER2-положительный – 15 (14 %), с гиперэкспрессией Erb-B2 – 5 (4,4 %), трижды негативный – 13 (12,1 %). Сопоставление молекулярных подтипов с иммунологическими показателями проведено для следующих субпопуляций костномозговых лимфоцитов: CD19⁺, CD19⁺CD10⁺, CD19⁺CD38⁺, CD19⁺CD5⁺. Информацию о продолжительности жизни больных получали путем персональных опросов или через бюро записи актов гражданского состояния, по возможности уточняя длительность жизни больных, периода без прогрессирования, безметастатического периода и т. д.

Результаты. Молекулярные подтипы рака молочной железы не были взаимосвязаны с общей выживаемостью больных, однако они влияли на безрецидивную выживаемость, выживаемость без прогрессирования и безметастатическую выживаемость с высокой степенью достоверности. Не установлено связи молекулярных подтипов рака молочной железы с субпопуляциями В-лимфоцитов костного мозга CD19, CD19⁺CD10⁺, CD19⁺CD38⁺. Связь молекулярных подтипов с уровнем В1-лимфоцитов костного мозга была близка к достоверной, а при сравнении трижды негативного подтипа с Erb-B2-гиперэкспрессирующим – достоверной ($p = 0,039$), причем наиболее низкая частота В1-лимфоцитов отмечена при трижды негативном подтипе.

Заключение. Молекулярные подтипы рака молочной железы различаются по прогнозу безрецидивной выживаемости, выживаемости без прогрессирования и безметастатической выживаемости. Наиболее неблагоприятным остается трижды негативный подтип. Молекулярные подтипы имеют определенную связь с иммунологическими субпопуляциями лимфоцитов костного мозга больных раком молочной железы: уровни В1-лимфоцитов наиболее высокие при Erb-B2-варианте и наиболее низкие при трижды негативном подварианте ($p = 0,039$).

Ключевые слова: рак молочной железы, костный мозг, В-лимфоциты, молекулярные подтипы

Для цитирования: Бердова Ф.К., Григорьева Т.А., Воротников И.К., Тупицын Н.Н. Молекулярные подтипы и иммунная система костного мозга в прогнозе рака молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(2):40–6. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-40-46

Breast cancer molecular subtypes and bone marrow immune system in patient's prognosis

Farangiz K. Berdova, Tatiana A. Grigorieva, Igor K. Vorotnikov, Nikolay N. Tupitsyn

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

Contacts: Nikolay Nikolaevich Tupitsyn nntca@yahoo.com

Background. Breast cancer molecular subtypes serve as a basis for combined treatment of the disease. Some of them (e. g. triple negative subtype) are prognostically unfavorable. Recently, we've demonstrated role of bone marrow B-cells in breast cancer prognosis. Correlation between these parameters (molecular subtypes and bone marrow lymphocyte subpopulations) have not yet studied.

Aim. To investigate prognostic role of breast cancer molecular subtypes and to see the relationships between these subtypes and subpopulational composition of bone marrow lymphocytes.

Materials and methods. Detailed study of bone marrow has been performed in all 107 patients treated in breast cancer department of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology in 2013–2016 years. Distribution of patients according to molecular subtypes were as follows: Luminal A – 36 (33.6 %) pts, Luminal B HER2-negative – 38 (35.5 %), Luminal B HER2-positive – 15 (14 %), subtype with Erb-B2 hyper-expression – 5 (4.4 %), triple negative – 13 (12.1 %). Comparison of molecular subtypes with immunological parameters was done for the following bone marrow B-lymphocyte subpopulations: CD19⁺, CD19⁺CD10⁺, CD19⁺CD38⁺, CD19⁺CD5⁺. The following survival data were analyzed: overall survival, relapse-free survival, progression-free survival, metastasis-free survival.

Results. Breast cancer molecular subtypes were not related to overall survival of patients but influenced relapse-free survival, progression-free survival and metastasis-free survival. There were no correlation between molecular subtypes and bone marrow B-lymphocyte subpopulations CD19, CD19⁺CD10⁺, CD19⁺CD38⁺. B1-lymphocytes were related to molecular subtypes, the levels of B1 cells were significantly higher in Erb-B2 subtype compared to triple-negative subtype ($p = 0.039$).

Conclusion. Breast cancer molecular subtypes are different in prognosis – relapse-free survival, progression-free survival and metastasis-free survival. The most prognostically unfavorable is triple-negative subtype. There are some relationships of bone marrow subpopulations and molecular subtypes of breast cancer: levels of B1-cells are much higher in Erb-B2 subtype compared to triple negative subtype ($p = 0.039$).

Keywords: breast cancer, bone marrow, B-lymphocytes, breast cancer molecular subtypes

For citation: Berdova F.K., Grigorieva T.A., Vorotnikov I.K., Tupitsyn N.N. Breast cancer molecular subtypes and bone marrow immune system in patient's prognosis. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2022;21(2):40–6. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-40-46

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) – самое частое злокачественное заболевание у женщин. Ежегодно РМЖ диагностируют у 1,5 млн женщин. За 2017 г. в Российской Федерации зарегистрировано около 70 тыс. новых случаев, что составляет 20 % всех впервые выявленных злокачественных новообразований в стране.

В настоящее время стандартом в диагностике больных РМЖ является выделение молекулярных подтипов заболевания [1]. Эти подтипы отражают степень дифференцировки клеток и требуют дифференцированного лечебного подхода, что обусловлено их различной чувствительностью к химио-, гормоно- и таргетной терапии.

Из числа иммунологических факторов прогноза важную роль играют интратуморальные лимфоциты. С благоприятным прогнозом ассоциирована выраженная инфильтрация опухоли CD8-лимфоцитами. Экспрессия на опухолевых клетках трансферринового рецептора (CD71), напротив, ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [2]. В работе И.А. Новиковой и соавт. показано, что уровни НК-лимфоцитов при люминальном раке были выше, чем при других молекулярных подтипах РМЖ [3]. В последнее время большое внимание уделяется исследованию иммунологических субпопуляций костного мозга, их клиническому значению при РМЖ [4, 5]. Вместе с тем иммунологические показатели костного мозга

во взаимосвязи с молекулярными подтипами опухоли изучены недостаточно.

Цель исследования – изучить прогностическую роль молекулярных подтипов РМЖ в современной терапии и оценить взаимосвязь между этими подтипами и субпопуляционным составом лимфоцитов костного мозга пациенток.

Материалы и методы

Детальные исследования костного мозга проведены 107 больным, проходившим лечение в отделении опухолей молочных желез ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в основном в период 2013–2016 гг.: 2013 г. – 32 больные, 2014 г. – 19, 2015 г. – 28, 2016 г. – 18. Некоторые больные обследованы ранее или позднее: 1990 г. – 1, 2001 г. – 1, 2003 г. – 1, 2008 г. – 1, 2012 г. – 1, 2018 г. – 1. Таким образом, длительность периода наблюдения после оперативного лечения в основном составила от 5 до 8 лет.

При диагностике больным проводилось стандартное исследование рецепторного статуса, HER2/neu, экспрессии Ki-67 и т.д. Распределение больных в зависимости от стадии заболевания, критериев TNM, рецепторного статуса, видов лечения отражено в работе Ф.К. Бердовой и соавт. [5]. Морфологическое исследование костного мозга (миелограмма) выполнено всем больным.

Распределение больных по молекулярным подтипам РМЖ представлено в табл. 1.

Таблица 1. Распределение больных по молекулярным подтипам рака молочной железы

Table 1. Distribution of patients by molecular subtypes of breast cancer

Молекулярный подтип рака молочной железы Molecular subtype of breast cancer	n	%
Люминальный А, Ki-67 <20 % Luminal A, Ki-67 <20 %	36	33,6
Люминальный В HER2-отрицательный, Ki-67 >20 % Luminal B HER2-negative, Ki-67 >20 %	38	35,5
Люминальный В HER2-положительный Luminal B HER2-positive	15	14,0
Erb-B2-сверхэкспрессирующий Erb-B2-overexpressing	5	4,8
Трижды негативный Triple negative	13	12,1
<i>Всего</i> <i>Total</i>	<i>107</i>	<i>100</i>

С точки зрения иммунологических показателей наиболее многочисленными изученными группами были: CD3 – 95 больных, CD4 – 90, CD8 – 90, CD4/CD8 – 89, CD8+HLA-DR^{+/–} – 83, CD4+CD25^{+/–} – 80, CD19 – 80, CD19+CD10^{+/–} – 81, CD19+CD38^{+/–} – 88, CD19+CD5^{+/–} – 87.

Информацию о продолжительности жизни больных получали путем персональных опросов или через бюро записи актов гражданского состояния. По возможности была уточнена длительность жизни больных, периода без прогрессирования, безметастатического периода и т. д.

Сравнение кривых выживаемости (по Каплану–Майеру) проводили с помощью статистических методов с оценкой достоверности различий по *log-rank*-тесту, Бреслоу, Тарон–Уоре. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Молекулярные подтипы РМЖ являются важным ориентиром при выборе тактики лечения больных. Это обусловлено различным прогнозом и чувствительностью к гормональной терапии, а также возможностью и необходимостью назначения таргетных препаратов (трастузумаб) в случаях экспрессии рецептора HER2/neu.

Сравнение показателей общей выживаемости при различных молекулярных подтипах РМЖ не выявило достоверных различий ($p = 0,84$, *log-rank*-тест, 4 степени свободы). Наилучшие показатели выживаемости получены при Erb-B2-сверхэкспрессирующем

подтипе: ни одна из больных не погибла в сроки наблюдения до 75 мес.

Мы сопоставили Erb-B2-сверхэкспрессирующий подтип с другими подтипами РМЖ попарно по показателям общей выживаемости. Не выявлено достоверных различий с люминальным А подтипом ($p = 0,52$), люминальным В HER2-отрицательным подтипом ($p = 0,61$) и люминальным В HER2-положительным подтипом ($p = 0,61$). Сравнение Erb-B2-сверхэкспрессирующего подтипа с базальноклеточным (трижды негативным) подтипом РМЖ также не выявило различий в общей выживаемости ($p = 0,42$).

Таким образом, молекулярный подтип РМЖ в условиях современного лечения не влияет на общую выживаемость больных. Наиболее благоприятным с точки зрения общей выживаемости при сроках наблюдения до 75 мес оказался Erb-B2-гиперэкспрессирующий подтип. Вероятно, это связано с эффективностью терапии с применением таргетного препарата трастузумаб.

Показатели безрецидивной выживаемости были оценены также у 107 больных. При сравнении всех 5 подтипов (4 степени свободы) различия в показателях выживаемости были близки к достоверным ($p = 0,09$).

Достоверных различий в показателях выживаемости при сравнении Erb-B2-гиперэкспрессирующего подтипа с люминальным В HER2-отрицательным подтипом и трижды негативным подтипом выявлено не было ($p = 0,603$ и $p = 0,397$ соответственно). Сравнение трижды негативного подтипа с люминальным А подтипом выявило достоверные различия ($p = 0,005$) (рис. 1).

Аналогичным образом сравнили безрецидивную выживаемость при люминальном В HER2-положительном подтипе и трижды негативном подтипе. В данном случае различия были близки к достоверным ($p = 0,08$).

Таким образом, люминальный А подтип РМЖ характеризуется лучшими показателями безрецидивной выживаемости в сравнении с трижды негативным подтипом.

При сравнении всех 5 молекулярных вариантов РМЖ по выживаемости без прогрессирования (4 степени свободы) получены достоверные различия по всем статистическим тестам: $p = 0,002$ (*log-rank*), $p = 0,005$ (Бреслоу), $p = 0,003$ (Тарон–Уоре).

В результате сравнения показателей выживаемости без прогрессирования при подварианте с гиперэкспрессией Erb-B2 и люминальном В HER2-положительном подварианте получены недостоверные данные ($p = 0,293$). Следовательно, различия в безрецидивной выживаемости наблюдаются между люминальными подтипами и базальноподобным подтипом.

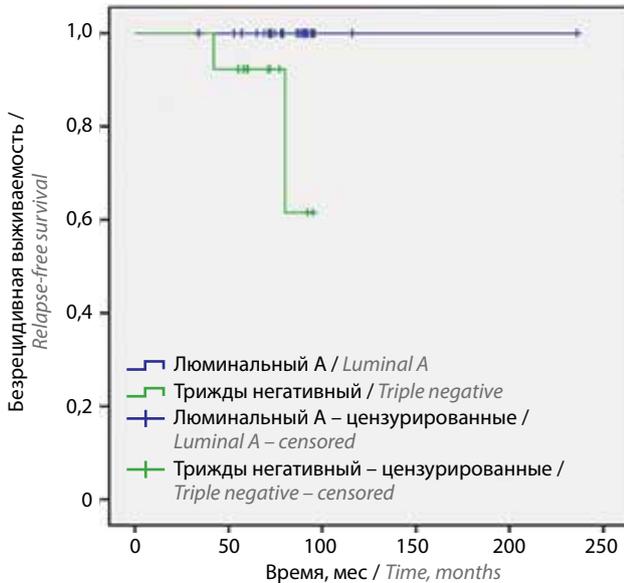


Рис. 1. Сравнение безрецидивной выживаемости при трижды негативном и люминальном А подтипах рака молочной железы. Безрецидивная выживаемость при люминальном А подтипе достоверно более продолжительная, $p = 0,005$

Fig. 1. Comparison of relapse-free survival in triple negative and luminal A subtypes of breast cancer. Relapse-free survival in luminal A subtype is significantly longer, $p = 0,005$

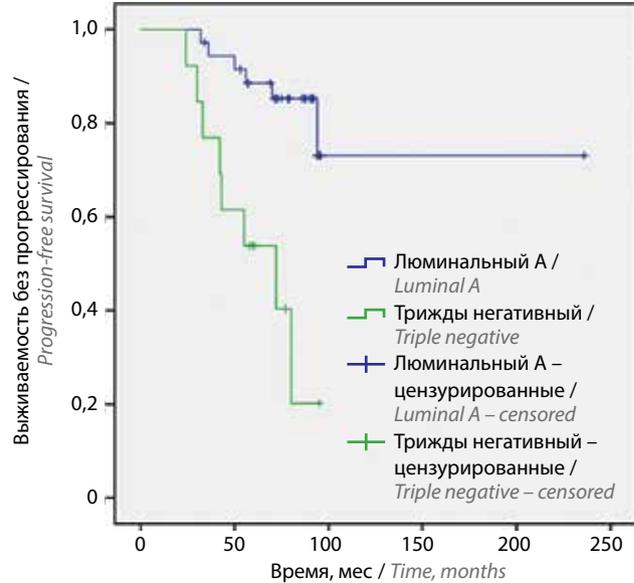


Рис. 2. Сравнение показателей выживаемости без прогрессирования при люминальном А и трижды негативном (базальноподобном) подтипах рака молочной железы. Люминальный А подтип характеризуется достоверно лучшим прогнозом, $p = 0,000$

Fig. 2. Comparison of progression-free survival rates in luminal A and triple negative (basal-like) subtypes of breast cancer. Luminal A cancer is characterized by a significantly better prognosis, $p = 0,000$

Сравнение базальноподобного подтипа с люминальным А подтипом выявило высокодостоверные различия ($p = 0,000$, *log-rank-тест*) (рис. 2).

Также выявлены достоверные различия в показателях выживаемости без прогрессирования при сравнении базальноподобного подтипа с люминальным В HER2-отрицательным подтипом ($p = 0,007$, *log-rank-тест*) (рис. 3) и с люминальными В HER2-положительным подтипом ($p = 0,021$, *log-rank-тест*) (рис. 4).

Важным показателем в прогнозе РМЖ является безметастатическая выживаемость. Оценка этого показателя в целом по группе выявила достоверные различия ($p = 0,038$) между молекулярными вариантами РМЖ.

Как и при анализе других показателей выживаемости, лучшим оказался рецептор-негативный вариант с гиперэкспрессией HER2/neu, а наиболее неблагоприятным – базальноподобный. Остальные варианты были примерно одинаковыми по безметастатической выживаемости.

Ранее нами было продемонстрировано, что В-лимфоциты субпопуляции костного мозга также имеют связь с прогнозом РМЖ (общей выживаемостью) [5]. Интересной показалась возможность оценить взаимосвязь прогностически значимых иммунологических показателей костного мозга с молекулярными типами РМЖ. Мы проанализировали соответствующие связи с CD19-лимфоцитами, а также субпопуляциями CD19⁺CD10⁺ и CD19⁺CD38⁺. Ни с одной

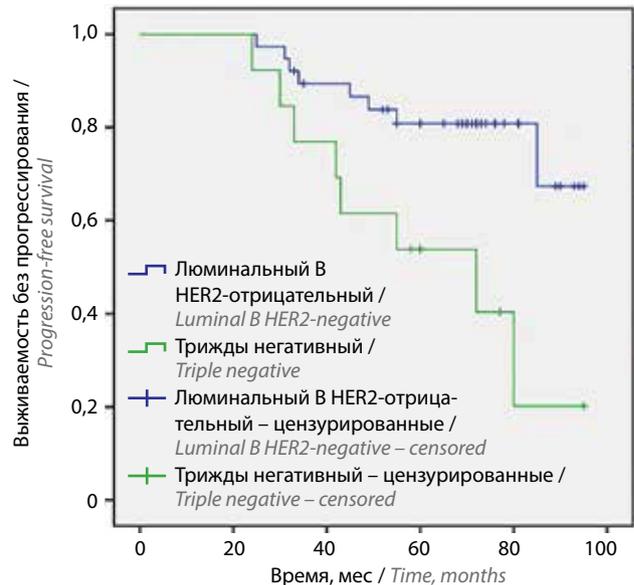


Рис. 3. Сравнение показателей выживаемости без прогрессирования при трижды негативном (базальноподобном) и люминальном В HER2-отрицательном подтипах рака молочной железы, $p = 0,007$ (*log-rank-тест*)

Fig. 3. Comparison of progression-free survival rates in triple negative (basal-like) and luminal B HER2-negative subtypes of breast cancer, $p = 0,007$ (*log-rank test*)

из указанных субпопуляций молекулярные варианты не были связаны (p по таблицам сопряженности признаков, $p = 0,3-0,52$).

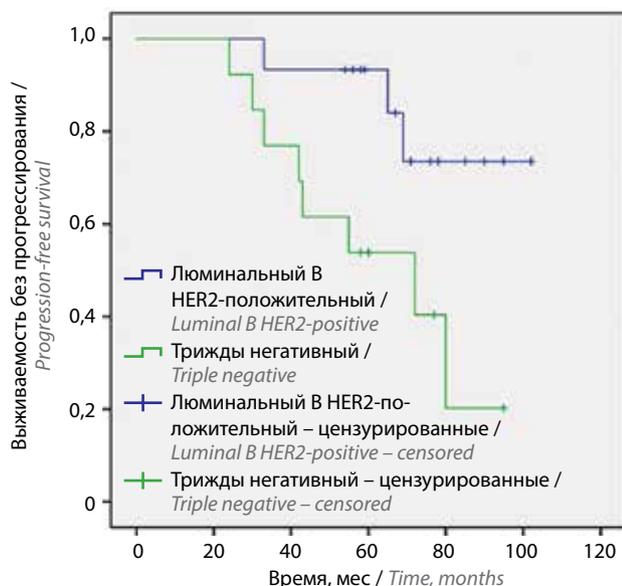


Рис. 4. Сравнение показателей выживаемости без прогрессирования при трижды негативном (базальноподобном) и люминальном В HER2-положительном подтипах рака молочной железы, $p = 0,021$ (log-rank-тест)

Fig. 4. Comparison of progression-free survival rates in triple negative (basal-like) and luminal B HER2-positive subtypes of breast cancer, $p = 0,021$ (log-rank test)

При сопоставлении популяции В1-лимфоцитов ($CD19^+CD5^+$) с молекулярными подтипами РМЖ отмечены более низкая частота значимых уровней В1-лимфоцитов при базальноподобном раке (18,2 %) и максимальная – при Erb-B2-сверхэкспрессирующем варианте (75 %), $p = 0,114$ (табл. 2).

Учитывая более низкие показатели популяции В1-лимфоцитов костного мозга при трижды негатив-

ном молекулярном подтипе РМЖ, мы сравнили средние значения В1-лимфоцитов костного мозга при трижды негативном и остальных молекулярных подтипах. Средние уровни В1-лимфоцитов при трижды негативном РМЖ были значительно более низкими, чем при прочих подтипах, $- 8,97 \pm 4,6 \% (n = 11)$ и $19,31 \pm 2,9 \% (n = 76)$ соответственно, однако различия недостоверны ($p = 0,07$).

Уровни В1-лимфоцитов костного мозга при наиболее благоприятном подтипе РМЖ (с гиперэкспрессией HER2/неу) были более чем в 3 раза выше, чем при наименее благоприятном (базальноподобном), $- 27,6 \pm 15,5 \% (n = 4)$ и $8,97 \pm 4,6 \% (n = 11)$ соответственно ($p = 0,136$).

В группе больных с высоким уровнем пролиферативной активности взаимосвязь уровней В1-лимфоцитов с молекулярным подтипом (с гиперэкспрессией Erb-B2, базальноподобным) была достоверной ($p = 0,039$).

Таким образом, молекулярные подтипы РМЖ имеют определенную взаимосвязь с уровнями В1-лимфоцитов костного мозга: для прогностически неблагоприятного базальноподобного подтипа характерны наиболее низкие уровни В1-клеток в костном мозге.

Обсуждение

Молекулярные подтипы РМЖ существенно различаются по прогнозу. Общая выживаемость больных достоверно не различается при различных молекулярных подтипах, однако выживаемость без прогрессирования и другие показатели возобновления болезни зависят от молекулярного подтипа. Наихудшим оказался трижды негативный подтип, а лучшие характеристики выживаемости отмечены

Таблица 2. Сопряженность уровней В1-лимфоцитов костного мозга с молекулярными подтипами рака молочной железы, $n (%)$

Table 2. Conjugation of the levels of B1-lymphocytes of the bone marrow with molecular subtypes of breast cancer, $n (%)$

Молекулярный подтип рака молочной железы Molecular subtype of breast cancer	Уровень $CD19^+CD5^+$ -лимфоцитов <10 % Population of $CD19^+CD5^+$ <10 %	Уровень $CD19^+CD5^+$ -лимфоцитов ≥ 10 % Population of $CD19^+CD5^+$ ≥ 10 %	Всего Total
Люминальный А Luminal A	14 (45,2)	17 (54,8)	31 (100)
Люминальный В HER2-отрицательный Luminal B HER2-negative	21 (65,6)	11 (34,4)	32 (100)
Люминальный В HER2-положительный Luminal B HER2-positive	6 (66,7)	3 (33,3)	9 (100)
Erb-B2-сверхэкспрессирующий Erb-B2-overexpressing	1 (25,0)	3 (75,0)	4 (100)
Трижды негативный Triple negative	9 (81,8)	2 (18,2)	11 (100)
Всего Total	51 (58,6)	36 (41,4)	87 (100)

при подварианте с гиперэкспрессией Erb-B2. Все это свидетельствует о том, что возобновление процесса при РМЖ в условиях современного лечения не является фатальным и может успешно купироваться, что приводит к выравниванию показателей выживаемости у больных.

Ранее нами было показано, что В-клеточные субпопуляции лимфоцитов костного мозга больных РМЖ тесно взаимосвязаны с общей выживаемостью пациенток [5]. Вместе с тем они не взаимосвязаны с показателями выживаемости, ассоциированными с прогрессированием. Это весьма интересный факт, который сложно интерпретировать.

Определенные данные для понимания роли костномозговых В-клеток дает анализ популяции В1-лимфоцитов (CD19⁺CD5⁺). Это единственный тип В-клеток костного мозга, который был связан с показателями выживаемости, ассоциированной с РМЖ. Интересно, что именно данный тип лимфоцитов костного мозга был значительно более низким при наиболее неблагоприятном подварианте РМЖ – трижды негативном. Этот факт (установленный в настоящей работе) дает основание для продолжения исследований с целью ответа на вопрос, обусловлен ли неблагоприятный прогноз при трижды негативном раке иммунодефицитом врожденного В-клеточного иммунитета.

В связи с этим интересно вспомнить одно наблюдение, сделанное у больной трижды негативным

РМЖ. После верификации диагноза методом кор-биопсии больной был назначен полиоксидоний в предоперационном режиме. На операции опухоль не была обнаружена, патоморфоз IV степени [6]. Иными словами, вполне возможно, что мишень терапевтического воздействия при трижды негативном раке следует искать не в злокачественных клетках РМЖ, а в В-линейном звене врожденного иммунитета. Для ответа на этот вопрос потребуются дополнительные исследования. В последнее время исследованию механизмов действия полиоксидония при раке уделяется большое внимание, и установленное влияние препарата на созревание дендритных клеток [7] может косвенно подтверждать высказанное предположение.

Заключение

Молекулярные подтипы РМЖ существенно различаются по прогнозу. Показатели общей выживаемости не различаются между этими подтипами. Наиболее благоприятным с точки зрения показателей выживаемости является рецептор-негативный вариант с гиперэкспрессией Erb-B2, а наименее благоприятным – трижды негативный подвариант. Остальные варианты примерно одинаковы в отношении прогноза: по показателям безрецидивной выживаемости, безметастатической выживаемости и выживаемости без прогрессирования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Пак Д.Д., Рассказова Е.А., Данилова Г.В. Подтипы рака молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2012;(3–4):13–8. DOI: 10.17650/1994-4098-2012-0-3-4-13-18
Pak D.D., Rasskazova E.A., Danilova G.V. Subtypes of breast cancer. Oukholi zhenskoy reproductivnoy systemy = Tumors of female reproductive system 2012;3–4:13–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/1994-4098-2012-0-3-4-13-18
2. Артамонова Е.В., Огнерубов Н.А., Тупицын Н.Н., Летагин В.П. Рак молочной железы: иммунологические факторы прогноза. Воронеж: Изд-во Воронежского гос. ун-та, 2005. 236 с.
Artamonova E. V., Ognerubov N.A., Tupitsyn N.N., Letyagin V.P. Breast cancer: immunological prognostic factors. Voronezh: Izd-vo Voronezhskogo gos. un-ta, 2005. 236 p. (In Russ.).
3. Новикова И.А., Шатова Ю.С., Златник Е.Ю. и др. Пролiferативные и иммунологические характеристики молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы. Международный журнал фундаментальных и прикладных исследований 2014;11(1):116–9.
Novikova I.A., Shatova Yu.S., Zlatnik E.Yu. et al. Proliferative and immunological characteristics of molecular biological subtypes of breast cancer. Mezhdunarodniy zhurnal fundamentalnykh y prikladnykh issledovaniy = International Journal of Fundamental and Applied Research 2014;11(1): 116–9. (In Russ.).
4. Tupitsyn N.N., Mkrtchan V.A., Palladina A.D., Vorotnikov I.K. Bone marrow lymphocyte populations of innate immunity in breast cancer patients. Global Journal of Medical Research: F disease 2020;20(2-F):20–7. DOI: 10.34257/GJMRFVOL20IS2PG21
5. Бердова Ф.К., Воротников И.К., Тупицын Н.Н. Субпопуляции лимфоцитов костного мозга больных раком молочной железы в прогнозе заболевания. Российский биотерапевтический журнал 2020;21(1):50–6.
DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-1-50-56
Berdova F.K., Vorotnikov I.K., Tupitsyn N.N. Bone marrow B-lymphocyte subpopulations of breast cancer patients in the prognosis of the disease. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;21(1):50–6. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-1-50-56
6. Шамилов Ф.А., Тупицын Н.Н., Воротников И.К. и др. Полиоксидоний в предоперационном лечении рака молочной железы. Полная регрессия опухоли в процессе неoadъювантной иммунотерапии. Иммунология гемопоза 2015;13(1):101–12.
Shamilov F.A., Tupitsyn N.N., Vorotnikov I.K. et al. Polyoxidonium in the preoperative treatment

of breast cancer. Complete regression of the tumor during neoadjuvant immunotherapy. *Immunologia gemopoeza = Haematopoiesis Immunology* 2015;13(1):101–12 (In Russ.).

7. Alexia C., Crew M., Louis-Plence P. et al. Polyoxidonium activates cytotoxic lymphocyte responses through dendritic cell maturation: clinical effects in breast cancer. *Frontiers in immunology* 2019;10:2693. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02693

Вклад авторов

Ф.К. Бердова, Т.А. Григорьева: сбор и анализ клинического и иммунологического материала, обзор публикаций по теме статьи, написание и оформление рукописи;

И.К. Воротников: анализ рукописи;

Н.Н. Тупицын: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи, анализ данных.

Authors' contributions

F.K. Berdova, T.A. Grigorieva: review of publications, analysis of clinical and immunological material, manuscript writing;

I.K. Vorotnikov: manuscript analysis;

N.N. Tupitsyn: research design, data analysis, manuscript writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Ф.К. Бердова / F.K. Berdova: <https://orcid.org/0000-0003-3867-0408>

И.К. Воротников / I.K. Vorotnikov: <https://orcid.org/0000-0003-2212-0102>

Н.Н. Тупицын / N.N. Tupitsyn: <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 30.01.2022. Принята к публикации: 16.05.2022.

Article submitted: 30.01.2022. Accepted for publication: 16.05.2022.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-2-47-55>

Влияние пола и возраста больных раком слизистой оболочки полости рта на фенотип системного и локального иммунитета

Т.Н. Заботина, А.И. Черткова, А.А. Борунова, Е.Н. Захарова, Э.К. Шоуа, И.Б. Шоуа, В.Т. Циклаури, И.А. Задеренко, З.Г. Кадагидзе

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

Контакты: Татьяна Николаевна Заботина tatzabotina@yandex.ru

Введение. Частота развития рака слизистой оболочки полости рта (РСОПР) выше у лиц старше 50 лет, а агрессивность течения заболевания выше у лиц младше 50 лет. В этом контексте представляет интерес выяснение механизмов иммунных нарушений, характерных для пациентов различных возрастных групп.

Цель исследования – провести сравнительное исследование системного и локального иммунитета у больных РСОПР, изучить взаимосвязь субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови (ПК) и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (tumor infiltrating lymphocytes, TILs), с полом и возрастом пациентов.

Материалы и методы. В исследование были включены пациенты в возрасте от 29 до 84 лет. Методом проточной цитометрии исследовали эффекторные и супрессорные популяции лимфоцитов ПК и TILs.

Результаты. У больных РСОПР в опухолевой ткани по сравнению с ПК было повышено процентное содержание CD3⁺, CD3⁺CD4⁺- и CD3⁺CD8⁺-Т-клеток, регуляторных CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} (CD4Трег) и CD8⁺CD11b⁻CD28⁻ (CD8Трег) Т-лимфоцитов, а также CD4⁻ и CD8⁺-Т-клеток, экспрессирующих коингибиторный рецептор PD-1. Уровни цитотоксических CD8⁺CD11b⁺CD28⁻-Т-лимфоцитов и CD8⁺Perforin⁺-клеток, цитотоксический потенциал CD8-Т-клеток, процент NK-клеток, включая CD16⁺Perforin⁺-популяцию, в опухоли были ниже, чем в ПК. Характер взаимосвязи уровня CD4Трег с другими популяциями лимфоцитов ПК и TILs зависел от пола пациентов. Возрастные изменения уровней NK- и CD8-Т-клеток наблюдались главным образом у мужчин, а CD4Трег – у женщин.

Заключение. Полученные данные подтверждают выраженное супрессивное состояние локального иммунитета у больных РСОПР. Пол пациентов влияет на характер взаимосвязи CD4Трег с другими популяциями лимфоцитов ПК и TILs, а также на возрастные изменения в иммунной системе пациентов с РСОПР. Результаты данного исследования могут внести определенный вклад в обеспечение персонализированного лечения больных РСОПР с учетом различий в системном и локальном иммунитете и в иммунном ответе на опухоль у больных разного пола и возраста.

Ключевые слова: лимфоциты периферической крови, TILs, CD4Трег лимфоциты, CD4⁺PD-1⁺- и CD8⁺PD-1⁺-лимфоциты, пол пациентов, возраст пациентов

Для цитирования: Заботина Т.Н., Черткова А.И., Борунова А.А. и др. Влияние пола и возраста больных раком слизистой оболочки полости рта на фенотип системного и локального иммунитета. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(2):47–55. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-47-55

Influence of gender and age of patients with oral mucosa cancer on the phenotype of systemic and local immunity

Tatiana N. Zabolina, Antonina I. Chertkova, Anna A. Borunova, Elena N. Zakharova, Esma K. Shoua, Ilona B. Shoua, Vasily T. Tsiklauri, Igor A. Zaderenko, Zaira G. Kadagidze

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

Contacts: Tatiana Nicolaevna Zabolina tatzabotina@yandex.ru

Background. The incidence of oral mucosa cancer (OMC) is higher in people over 50 years of age, and the aggressiveness of the course of the disease is higher in people under 50 years of age. In this context, it is of interest to clarify the mechanisms of immune disorders characteristic of patients of different age groups.

Aim. To research systemic and local immunity in OMC patients and the relationship of peripheral blood lymphocyte population (PBLs) and tumor infiltrating lymphocytes (TILs) with the patient's sex and age.

Materials and methods. PBLs and TILs effector and suppressor populations were studied by flow cytometry in OMC patients aged 29 to 84 years.

Results. The percentage of CD3, CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ T cells, regulatory CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} (CD4Treg) and CD8⁺CD11b⁻CD28⁻ (CD8Treg) T lymphocytes, CD4⁺PD-1⁺ and CD8⁺PD-1⁺ T cells was increased in TILs compared to PBLs. The levels of cytotoxic CD8⁺CD11b⁺CD28⁻ T lymphocytes, NK, CD8⁺Perforin⁺ and CD16⁺Perforin⁺ cells in TILs were lower than in PBLs. The relationship between the level of CD4Treg and other TILs and PBLs depended on the patient's sex. Age-related changes in the levels of NK and CD8 T-cells were observed in men, and CD4Treg – in women.

Conclusion. Local immunity in OMC patients is highly immunosuppressive. The sex of patients influences the relationship between CD4Treg and other populations of PBLs and TILs, as well as age-related changes in the OMC patients' immune system. This investigation results can make a certain contribution to personalized treatment of patients with OMC, taking into account differences in systemic and local immunity and in the immune response to the tumor in patients of different sex and age.

Keywords: peripheral blood lymphocytes, TILs, CD4Treg lymphocytes, CD4⁺PD-1⁺ and CD8⁺PD-1⁺ lymphocytes, patients gender, patients age

For citation: Zabolina T.N., Chertkova A.I., Borunova A.A. et al. Influence of gender and age of patients with oral mucosa cancer on the phenotype of systemic and local immunity. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(2):47–55. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-47-55

Введение

Рак слизистой оболочки полости рта (РСОПР) – один из наиболее распространенных вариантов злокачественных новообразований головы и шеи. РСОПР встречается в 2–4 раза чаще у мужчин, чем у женщин. Одним из факторов риска при этом варианте опухоли является возраст. Частота развития РСОПР наиболее высока у лиц 50–80 лет, однако течение заболевания у них менее агрессивное по сравнению с более молодыми людьми [1]. РСОПР – заболевание с высокой степенью иммуносупрессии, которая обусловлена истощением эффекторных Т-лимфоцитов, выработкой иммуносупрессивных цитокинов и высокой активностью регуляторных (супрессорных) клеток [2–5]. В последнее десятилетие были изучены новые подходы к терапии РСОПР. Предполагается, что лечение в большинстве случаев должно быть комплексным, с включением иммунотерапевтических методов, в том числе с использованием ингибиторов контрольных точек иммунитета [6, 7]. В связи с этим изучение основных показателей системного и локального иммунитета, а также их взаимосвязи с полом и возрастом больных РСОПР является актуальным. Полученные результаты могут внести определенный вклад в обеспечение персонализированного лечения больных РСОПР и прогнозирование клинического ответа на иммунотерапию.

Цель исследования – провести сравнительное исследование показателей системного и локального иммунитета, изучить взаимосвязь субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови (ПК) и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs), с полом и возрастом больных РСОПР.

Материалы и методы

Характеристика пациентов. В исследование были включены больные с I–IV стадиями РСОПР, получавшие лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследование лимфоцитов ПК проводилось у 62 пациентов (30 мужчин и 32 женщин). Медиана возраста пациентов составила 57,0 года (от 15 до 84 лет): женщины – 57,0 года (от 29 до 84 лет), мужчины – 58,0 года (от 15 до 79 лет). Исследование TILs проводилось у 48 пациентов (27 женщин и 21 мужчины).

Иммунологическое исследование. Исследовали параметры системного (лимфоцитов ПК) и локального (TILs) иммунитета. Лимфоциты выделяли из ПК и полученной из опухолевой ткани клеточной суспензии (операционный материал) по параметрам светорассеяния и экспрессии CD45. Проводили многопараметровый цитометрический анализ на 5-параметровом проточном цитофлуориметре аналитического типа FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Для 2-, 3- и 4-цветного окрашивания использовали панель моноклональных антител к поверхностным и внутриклеточным (Perforin) маркерам лимфоцитов (Becton Coulter, США). Определяли процентное содержание Т-клеток и их субпопуляций (CD3⁺CD19⁻, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺); активированных Т-клеток (CD4⁺CD25⁺, CD3⁺HLA-DR⁺); В-клеток (CD3⁻CD19⁺); активированных CD25⁺-, HLA-DR⁺-, CD3⁻HLA-DR⁺-лимфоцитов; CD3⁻CD16⁺CD56⁺- и CD16⁺Perforin⁺-NK-клеток; регуляторных CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}-Т-клеток (CD4Treg); CD4⁺PD-1 (CD279)⁺- и CD8⁺PD-1(CD279)⁺-клеток; CD8⁺CD11b⁻CD28⁺ (наивных), CD8⁺CD11b⁺CD28⁺ (наивных/клеток

памяти), CD8⁺CD11b⁺CD28⁻ (цитотоксических), CD8⁺CD11b⁻CD28⁻ (CD8⁺Treg) популяций в составе CD45⁺CD8⁺-лимфоцитов. Процент Perforin⁺-клеток в составе CD16⁺- и CD8⁺-лимфоцитов оценивался как цитотоксический потенциал (ЦТП).

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовали программный пакет Statistica 7. Характер распределения данных определяли с использованием критериев Шапиро–Уилка (при $n < 50$) и Колмогорова–Смирнова (при $n \geq 50$). Результаты представлены в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го процентилей (квартилей). Различия между показателями определяли с помощью двустороннего

U-критерия Манна–Уитни и критерия Вальда–Вулфовица (W-W). Для определения статистической взаимосвязи между показателями вычисляли коэффициент корреляции Пирсона (r) при нормальном распределении или коэффициент ранговой корреляции Спирмена (ρ) при распределении показателей, отличном от нормального. Уровень статистической значимости был принят равным 0,05.

Результаты

Сравнительное исследование системного и локального иммунитета выявило значительные различия субпопуляционного состава лимфоцитов ПК и TILs (табл. 1).

Таблица 1. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, у больных раком слизистой оболочки полости рта

Table 1. Subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes in oral mucosa cancer patients

Популяция лимфоцитов Lymphocyte populations	Лимфоциты периферической крови Peripheral blood lymphocytes		Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль Tumor infiltrating lymphocytes		p (U)
	Me (квартили), % Me (quartiles), %	n	Me (квартили), % Me (quartiles), %	n	
CD3 ⁺	71,9 (57,6–80,3)	62	88,4 (82,1–91,9)	48	0,000
CD3 ⁺ CD4 ⁺	39,3 (26,9–49,0)	62	48,6 (39,2–58,8)	48	0,000
CD3 ⁺ CD8 ⁺	20,9 (16,3–27,6)	62	39,7 (28,6–50,0)	48	0,000
CD3 ⁻ CD8 ⁺	8,6 (6,4–16,4)	61	1,2 (0,5–2,1)	48	0,000
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	7,3 (5,1–13,1)	62	5,9 (1,9–17,1)	43	0,322
CD3 ⁻ HLA-DR ⁺	6,5 (4,1–9,8)	61	2,0 (0,3–5,4)	43	0,000
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	16,2 (10,7–26,0)	62	2,9 (1,4–4,7)	47	0,000
CD3 ⁻ CD19 ⁺	4,4 (2,4–8,0)	62	3,1 (1,2–7,2)	46	0,183
CD16 ⁺ Perforin ⁺	16,4 (12,9–22,4)	61	2,1 (1,1–6,1)	40	0,000
ЦТП CD16 Cytotoxic potential CD16	92,6 (86,2–96,5)	61	34,6 (21,3–59,0)	40	0,000
CD8 ⁺ Perforin ⁺	19,7 (14,2–25,2)	62	2,6 (1,7–4,9)	41	0,000
ЦТП CD8 Cytotoxic potential CD8	61,4 (49,6–76,0)	62	12,6 (5,3–43,1)	41	0,000
CD4/CD8	1,07 (0,65–1,53)	62	1,22 (0,83–2,01)	45	0,181
CD4 ⁺ CD25 ⁺	9,8 (6,6–18,1)	61	18,8 (14,1–22,7)	45	0,000
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/-}	7,2 (6,1–8,8)	61	18,3 (11,1–24,4)	44	0,000
CD8 ⁺ CD11b ⁺ CD28 ⁻	56,2 (43,3–68,5)	62	9,6 (6,9–15,5)	44	0,000
CD8 ⁺ CD11b ⁺ CD28 ⁺	5,8 (3,9–9,0)	62	8,2 (5,8–18,9)	44	0,006
CD8 ⁺ CD11b ⁻ CD28 ⁻	7,4 (4,9–10,4)	62	41,0 (24,9–61,2)	44	0,000
CD8 ⁺ CD11b ⁻ CD28 ⁺	25,2 (16,9–38,0)	61	26,6 (18,4–41,1)	44	0,330
CD4 ⁺ CD279 ⁺	5,7 (3,5–10,4)	39	31,7 (24,4–38,5)	33	0,000
CD8 ⁺ CD279 ⁺	4,4 (2,1–9,4)	39	22 (9,2–27,4)	34	0,000

Примечание. n – число пациентов, у которых определялась данная популяция лимфоцитов; U – U-критерий Манна–Уитни; ЦТП – цитотоксический потенциал.

Note. n – the number of patients in whom this lymphocyte population was determined; U – Mann–Whitney U-criterion.

Определение процентного содержания клеток основных линейных популяций лимфоцитов — Т-, NK- и В-клеток — показало, что в опухолевой ткани по сравнению с ПК количество CD3⁺-Т-клеток было статистически значимо выше, что закономерно сочеталось со значительным снижением процентного содержания CD3⁺-CD16⁺-CD56⁺-NK-клеток (их доля в составе TILs была в 5,6 раза ниже, чем в ПК). Различий в количестве CD3⁺-CD19⁺-В-лимфоцитов между ПК и TILs не наблюдалось (см. табл. 1). Уровень основных субпопуляций Т-клеток (CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺) также был выше в составе TILs, чем в ПК.

Т-лимфоциты являются главными клетками-эффекторами противоопухолевого иммунитета [8]. При многих вариантах опухолей, включая РСОПР, в опухолевом микроокружении обнаруживаются высокие уровни CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов [9–11]. Однако в подавляющем большинстве случаев они не предотвращают опухолевую прогрессию, что указывает на их дисфункциональное состояние [4, 12]. Установлено, что постоянная антигенная стимуляция, характерная для хронических инфекций и многих типов рака, приводит к развитию истощения (exhaustion) Т-клеток. Это состояние отличается от толерантности и анергии [12–15]. Истощение характеризуется высокой и устойчивой экспрессией множества ингибиторных рецепторов, в частности PD-1, CTLA4, Tim-3 и Lag-3, отсутствием адекватного ответа на стимуляцию Т-клеточного рецептора, снижением секреции эффекторных цитокинов, таких как интерлейкин 2, интерферон γ и фактор некроза опухолей α , значительным снижением пролиферативного потенциала, нарушением эффекторных функций и, как следствие, неэффективным контролем опухолевого роста [15–17]. В настоящем исследовании было выявлено, что процентное содержание CD4⁺-, и CD8⁺-Т-клеток, экспрессирующих ингибиторный рецептор PD-1 (CD279), было значительно выше в опухолевой ткани, чем в ПК (см. табл. 1). Отмечалось снижение функциональной активности CD8⁺-лимфоцитов: уровень CD8⁺-клеток, экспрессирующих Perforin, и их ЦТП в опухоли были статистически значимо ниже, чем в составе лимфоцитов ПК. К тому же процентное содержание цитотоксических CD8⁺CD11b⁺CD28⁻-Т-клеток в составе CD8⁺-TILs было резко снижено по сравнению с ПК, где они являлись основной популяцией CD8⁺-клеток (см. табл. 1).

Супрессорные факторы опухолевого микроокружения могут вызывать дисфункцию и NK-клеток [18]. У больных РСОПР в данном исследовании отмечалось снижение уровня эффекторных CD16⁺Perforin⁺-NK-клеток, а также снижение ЦТП NK-клеток. Понижение уровня активированных CD3⁺-HLA-DR⁺-лимфоцитов, скорее всего, было связано с уменьшением числа NK-клеток в составе TILs. Истощение

Т-клеток обратимо, и накапливаются данные о том, что важным механизмом противоопухолевого эффекта блокаторов PD-1-пути у больных с некоторыми типами злокачественных опухолей является «отмена» истощения Т-клеток [15, 16]. В то же время частота случаев успешного применения блокаторов контрольных точек иммунитета у онкологических пациентов по-прежнему недостаточно высока. Известно, что ингибиторные рецепторы участвуют в процессе активации Т-клеток и играют физиологическую роль в иммунном ответе. Это усложняет обнаружение специфических для истощенных Т-клеток маркеров и, следовательно, идентификацию и разработку эффективных целевых методов лечения [17].

В опухолевом микроокружении эффекторные Т-клетки сталкиваются с различными клетками и цитокинами, которые подавляют их эффективность и превращают в дисфункциональные Т-клетки. В настоящее время предполагается, что истощению Т-клеток могут прямо или опосредованно содействовать регуляторные клетки: CD4⁺Трег, CD8⁺Трег, NKT- и другие супрессорные популяции [14]. В настоящем исследовании в составе CD8⁺-лимфоцитов в опухолевой ткани, в отличие от ПК, наибольший процент составляли регуляторные (супрессорные) CD8⁺CD11b⁻CD28⁻-Т-клетки. Процентное содержание CD4⁺CD25⁺-клеток было статистически значимо выше в опухоли, чем в ПК. При этом количество CD4⁺Трег-клеток в составе CD4⁺CD25⁺-популяции TILs был более чем в 2 раза выше, чем в ПК (см. табл. 1). Отмечалась положительная корреляция CD8⁺PD-1⁺-лимфоцитов с CD8⁺Трег (ρ (95 % доверительный интервал (ДИ) — 0,474 (0,145; 0,742); $n = 32$; $p = 0,006$) и CD4⁺PD-1⁺-лимфоцитов с CD4⁺CD25⁺-клетками (ρ (95 % ДИ) — 0,565 (0,246; 0,790); $n = 32$; $p = 0,001$). В экспериментальных исследованиях двойная блокада CD4⁺Трег и PD-1/PD-L1-пути приводила к отмене истощения CD8⁺-Т-клеток, и эффект был более выраженным, чем при блокаде только PD-L1 [19]. Эти результаты свидетельствуют о том, что регуляторные Т-клетки эффективно поддерживают дисфункциональное состояние эффекторных Т-клеток.

На характер взаимоотношения иммунной системы и опухоли могут оказывать влияние различные факторы организма, включая возраст и пол пациента [20, 21]. Согласно исследованиям о влиянии возраста на иммунную систему человека, представленным в обзоре G. Pawelec [20], в течение жизни происходит общее старение всех популяций лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунитета, изменение их количества в ПК, и, как правило, снижение их функциональной активности. Иммунная система становится менее способной функционировать оптимально. Для пожилых людей характерно присутствие меньшего числа наивных Т-клеток с ограниченным

репертуаром Т-клеточных рецепторов в сочетании с большим количеством Т-клеток памяти. Наиболее типичным изменением является выраженное увеличение дифференцированных клеток памяти, в частности CD28-негативных, CD27-негативных CD8⁺-Т-клеток (процесс, называемый иммуностарением, — immunosenescence), накопление которых может быть неблагоприятным прогностическим фактором [20, 22]. Хотя увеличение числа senescent-Т-клеток наиболее характерно для лиц пожилого возраста, в ряде случаев их накопление обнаруживали и у относительно молодых людей при хронической инфекции или некоторых типах рака [12]. С возрастом могут также увеличиваться уровни CD4Трег-клеток, что еще больше ослабляет иммунную реактивность у пожилых людей. Количество периферических НК-клеток у лиц старшего возраста обычно выше, чем у молодых людей. Однако НК-клетки пожилых людей могут иметь более низкую экспрессию активационных рецепторов NKp30 и NKp46 и костимулирующей молекулы DNAX (DNAM-1), что приводит к ухудшению их функционирования. Нарушение противоопухолевых функций senescent- и exhausted-Т-клеток контролируется различающимися регуляторными и молекулярными механизмами, однако оба процесса приводят к неспособности иммунной системы элиминировать опухолевые клетки и противодействовать прогрессивному опухолевому росту [12]. В нашем исследовании в опухолевой ткани статистически значимой корреляции содержания исследованных популяций лимфоцитов с возрастом не наблюдалось ни в целом по группе, ни в зависимости от пола (результаты не представлены). К сожалению, о влиянии старения на резидентные тканевые иммунные клетки известно очень мало [20].

В целом по группе мы обнаружили в ПК положительную взаимосвязь с возрастом уровня CD3⁺CD8⁺-НК-клеток и отрицательную — количества наивных CD8⁺CD28⁺-Т-лимфоцитов. Соответственно, с увеличением возраста снижалась величина соотношения CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ (табл. 2). В то же время характер возрастных изменений уровней NK-, Т- и CD4Трег-клеток у больных РСОПР зависел от пола пациентов (табл. 3).

Оказалось, что возрастание в ПК уровня CD3⁺CD56⁺CD16⁺-НК-клеток, CD3⁺CD8⁺, CD16⁺Perforin⁺-популяций в их составе и CD8⁺CD28⁻-Т-лимфоцитов, а также уменьшение числа наивных CD8⁺CD28⁺-Т-клеток наблюдалось только у пациентов мужского пола. У женщин отмечалось лишь изменение уровня регуляторных Т-клеток: с увеличением возраста их уровень не повышался, а снижался (см. табл. 3).

На основании анализа публикаций за период с 1999 по 2014 г. L. Miranda и соавт. [23] пришли

Таблица 2. Корреляция количества лимфоцитов периферической крови с возрастом больных раком слизистой оболочки полости рта

Table 2. Correlation of the number of peripheral blood lymphocytes with the age of patients with oral mucosa cancer

Популяция лимфоцитов (%) Lymphocyte population (%)	n	r (95 % ДИ) r (95 % CI)	p
CD3 ⁺ CD8 ⁺	61	0,423 (0,200; 0,592)	0,000
CD8 ⁺ CD28 ⁺	61	-0,426 (-0,667; -0,164)	0,001
CD8 ⁺ CD28 ⁺ / CD8 ⁺ CD28 ⁻	61	-0,379 (-0,587; -0,131)	0,005

Примечание. В таблице представлены только статистически значимые результаты. n — число пациентов, у которых определялась данная популяция лимфоцитов; r — коэффициент корреляции Пирсона; ДИ — доверительный интервал.

Note. The table shows only statistically significant results. n — the number of patients in whom this lymphocyte population was determined; r — Pearson correlation coefficient; CI — confidence interval.

Таблица 3. Взаимосвязь количества NK-, Т- и CD4Трег-клеток периферической крови с возрастом в зависимости от пола больных раком слизистой оболочки полости рта

Table 3. The relationship of the number of NK-, T- and CD4Treg cells of peripheral blood with age, depending on the sex of patients with oral mucosa cancer

Популяция лимфоцитов (%) Lymphocyte population (%)	n	R (95 % ДИ) R (95 % CI)	p
Мужчины Men			
CD3 ⁺ CD8 ⁺	30	0,508* (0,186; 0,738)	0,004
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	30	0,569* (0,303; 0,753)	0,001
CD16 ⁺ Perforin ⁺	29	0,667* (0,383; 0,836)	0,000
CD8 ⁺ CD28 ⁺	30	-0,436* (-0,697; -0,073)	0,016
CD8 ⁺ CD28 ⁻	30	0,484** (0,073; 0,735)	0,007

Женщины Women			
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low/-}	32	-0,477* (-0,745; -0,128)	0,006

Примечание. В таблице представлены только статистически значимые результаты. n — число пациентов, у которых определялась данная популяция лимфоцитов; R — коэффициент корреляции: *Спирмена (ρ), **Пирсона (r); ДИ — доверительный интервал.

Note. The table shows only statistically significant results. n — the number of patients in whom this lymphocyte population was determined; R — correlation coefficient: *Spearman (ρ), **Pearson (r); CI — confidence interval.

к заключению, что иммунные системы мужчин и женщин демонстрируют радикальные различия, главным образом из-за иммунорегуляторных эффектов половых гормонов. Факторы, связанные с полом, коррелируют с заболеваемостью раком, исходом и реакцией на терапию; подчеркивается, что половые различия имеют большое значение во взаимодействии опухоль-хозяин [21, 24, 25].

В настоящей работе также исследовалось влияние CD4Tрег на уровень других популяций лимфоцитов ПК и TILs у больных РСОПР в зависимости от пола пациентов. Результаты представлены в табл. 4 и 5. Уровень CD4Tрег у конкретного больного определялся по отношению к значению медианы этого показателя для всей группы больных: $\geq Me$ или $< Me$.

Оказалось, что статистически значимое влияние CD4Tрег на уровень других популяций лимфоцитов ПК наблюдалось главным образом у женщин. Повышение процентного содержания CD4Tрег сочеталось со снижением общего числа CD3⁺CD19⁻-Т-клеток и их популяций CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺, а также наивных CD8⁺CD11b⁻CD28⁺-Т-клеток и компенсаторным повышением процента НК-клеток, включая

CD16⁺Perforin⁺-популяцию (группы 1 и 2). В то же время у мужчин повышенный уровень CD4Tрег приводил лишь к снижению ЦТП CD8⁺-Т-лимфоцитов (группы 3 и 4).

В опухолевой ткани влияние количества CD4Tрег было менее выражено, чем в ПК, но различалось у мужчин и женщин. У женщин повышение уровня CD4Tрег ассоциировалось с увеличением CD3⁺CD4⁺- и снижением CD3⁺CD8⁺-Т-клеток. Уровень CD3⁺CD4⁺, скорее всего, был повышен за счет увеличения числа CD4Tрег (группы 5 и 6). В то же время у мужчин увеличение числа CD4Tрег сочеталось с уменьшением процента активированных CD3⁺HLA-DR⁺-Т-клеток и увеличением процента CD8⁺-Т-лимфоцитов, экспрессирующих коингибиторный рецептор PD-1 (группы 7 и 8). Таким образом, пол пациентов имел определенное влияние на характер взаимоотношения CD4Tрег с другими популяциями лимфоцитов ПК и TILs. В то же время следует отметить, что и в ПК, и в опухолевой ткани у пациентов обоего пола наиболее значимым неблагоприятным влиянием увеличения уровня CD4Tрег было влияние на CD3⁺CD8⁺-Т-клетки-эффекторы: снижение их уровня у женщин,

Таблица 4. Влияние CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}-Т-клеток (CD4Tрег) на количество лимфоцитов других популяций в периферической крови в зависимости от пола пациентов

Table 4. Influence of CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T cells (CD4Tрег) on the number of lymphocytes of other populations of peripheral blood depending on the sex of patients

Популяция лимфоцитов Lymphocyte population	Me (квартили), % Me (quartiles), %		p (U)
	Женщины Women		
	Группа 1* (n = 16) Group 1* (n = 16)	Группа 2* (n = 16) Group 2* (n = 16)	
CD3 ⁺ CD19 ⁻	78,2 (64,4–81,7)	65,2 (41,4–76,5)	0,021
CD3 ⁺ CD4 ⁺	48,8 (32,8–55,6)	28,9 (10,7–41,6)	0,017
CD3 ⁺ CD8 ⁺	23,6 (17,0–29,5)	17,1 (12,5–24,1)	0,047
CD8 ⁺ CD11b ⁻ CD28 ⁺	32,4 (18,2–39,3)	17,8 (10,6–23,7)	0,029
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	11,5 (10,0–27,7)	22,9 (18,3–41,2)	0,011
CD16 ⁺ Perforin ⁺	14,5 (7,6–19,3)	21,6 (13,8–29,0)	0,026
	Мужчины Men		
	Группа 3** (n = 15) Group 3** (n = 15)	Группа 4** (n = 15) Group 4** (n = 15)	
Цитотоксический потенциал CD8 ⁺ Cytotoxic potential CD8 ⁺	62,0 (56,1–77,0)	50,7 (39,6–66,2)	0,033

*Me CD4Tрег в группе женщин – 6,6 % (группа 1: CD4Tрег < Me; группа 2: CD4Tрег ≥ Me); **Me CD4Tрег в группе мужчин – 7,8 % (группа 3: CD4Tрег < Me); группа 4: CD4Tрег ≥ Me).

*Me CD4Tрег in the group of women – 6.6 % (Group 1: CD4Tрег < Me; Group 2: CD4Tрег ≥ Me); **Me CD4Tрег in the male group – 7.8 % (Group 3: CD4Tрег < Me; Group 4: CD4Tрег ≥ Me).

Примечание. Здесь и в табл. 5: U – U-критерий Манна–Уитни.

Note. Here and in table 5: U – Mann–Whitney U-criterion.

Таблица 5. Влияние CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}-Т-клеток (CD4Tрег) на количество лимфоцитов других популяций среди лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, в зависимости от пола пациентов

Table 5. Influence of CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T cells (CD4Tрег) on the number of lymphocytes of other populations of tumor-infiltrating lymphocytes depending on the sex of patients

Популяция лимфоцитов Lymphocyte population	Ме (квартили), % Me (quartiles), %		p (U)
	Женщины Women		
	Группа 5* (n = 12) Group 5* (n = 12)	Группа 6* (n = 12) Group 6* (n = 12)	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	42,0 (36,4–49,8)	54,4 (45,3–60,6)	0,049
CD3 ⁺ CD8 ⁺	45,3 (39,4–49,4)	32,4 (24,5–39,8)	0,020
	Мужчины Men		
	Группа 7** (n = 10) Group 7** (n = 10)	Группа 8** (n = 10) Group 8** (n = 10)	
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	10,0 (5,1–16,6)	2,3 (0,8–6,6)	0,022
CD8 ⁺ CD279 ⁺	10,3 (5,4–23,3) (n = 8)	28,6 (27,4–47,5) (n = 5)	0,019

*Ме CD4Tрег в группе женщин – 18,5 % (группа 5: CD4Tрег < Ме; группа 6: CD4Tрег ≥ Ме); **Ме CD4Tрег в группе мужчин – 19,6 % (группа 7: CD4Tрег < Ме; группа 8: CD4Tрег ≥ Ме).

*Me CD4Tрег in the group of women – 18.5 % (Group 5: CD4Tрег < Me; Group 6: CD4Tрег ≥ Me); **Me CD4Tрег in the male group – 19.6 % (Group 7: CD4Tрег < Me; Group 8: CD4Tрег ≥ Me).

снижение ЦТП CD8⁺ и повышение уровня CD8⁺PD-1⁺-Т-лимфоцитов у мужчин.

Закключение

Повышенное число CD4Tрег- и CD8Tрег-лимфоцитов наряду со сниженным уровнем CD8⁺Perforin⁺-лимфоцитов и ЦТП CD8-клеток, крайне низким процентным содержанием НК-клеток, в том числе экспрессирующих Perforin, повышенным уровнем CD4⁺PD-1- и CD8⁺PD-1⁺-Т-клеток в опухолевой ткани по сравнению с ПК подтверждает высокоиммуносупрессивный характер локального иммунитета

у больных РСОРП. Это указывает на необходимость учета состояния иммунной системы каждого пациента с РСОРП при назначении системной терапии, и особенно иммунотерапии. Пол пациентов влияет на характер взаимосвязи CD4Tрег с другими популяциями лимфоцитов ПК и TILs, а также на возрастные изменения в иммунной системе пациентов с РСОРП. Полученные результаты могут внести определенный вклад в обеспечение персонализированного лечения больных РСОРП с учетом различий в системном и локальном иммунитете и в иммунном ответе на опухоль у больных разного пола и возраста.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Dhanuthai K., Rojanawatsirivej S., Thosaporn W. et al. Oral cancer: a multicenter study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2018;23(1):e23–e9. DOI: 10.4317/medoral.21999
- Yokota T., Homma A., Kiyota N. et al. Head and neck cancer study group. Immunotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Jpn J Clin Oncol* 2020;50(10):1089–96. DOI: 10.1093/jcco/hyaa139
- Deng W.W., Li Y.C., Ma S.R. et al. Specific blockade CD73 alters the “exhausted” phenotype of T cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2018;143(6):1494–504. DOI: 10.1002/ijc.31534
- Fenoglio D., Belgioia L., Parodi A. et al. Development of exhaustion and acquisition of regulatory function by infiltrating CD8⁺CD28⁻ T Lymphocytes dictate clinical outcome in head and neck cancer. *Cancers (Basel)* 2021;13(9):2234. DOI: 10.3390/cancers13092234
- Chen J., Yang J., Li H. Single-cell transcriptomics reveal the intratumoral landscape of infiltrated T-cell subpopulations in oral squamous cell carcinoma. *Mol Oncol* 2021;5(4):866–86. DOI: 10.1002/1878-0261.12910
- Cohen E.E.W., Soulières D., Le Tourneau C. et al. KEYNOTE-040 investigators. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019;393(10167):156–67. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31999-8
- Johnson D.E., Burtneß B., Leemans C.R. et al. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2020;6(1):92. DOI: 10.1038/s41572-020-00224-3
- Raskov H., Orhan A., Christensen J.P., Gögenur I. Cytotoxic CD8⁺ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 2021;124(2):359–67. DOI: 10.1038/s41416-020-01048-4

9. Заботина Т.Н., Короткова О.В., Борунова А.А. и др. Многопараметровое исследование иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль у онкологических больных. *Российский онкологический журнал* 2016;21(1–2):51–4. DOI: 10.18821/1028-9984-2015-21-1-51-54
Zabotina T.N., Korotkova O.V., Borunova A.A. et al. Multiparameter study of the immunophenotype of lymphocytes infiltrating the tumor in cancer patients. *Rossiiskiy onkologicheskii zhurnal = Russian Journal of Oncology* 2016;21(1–2):51–4. (In Russ.). DOI: 10.18821/1028-9984-2015-21-1-51-54
10. Заботина Т.Н., Черткова А.И., Циклаури В.Т. и др. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и инфильтрирующих опухоль у больных плоскоклеточным раком головы и шеи. *Иммунология* 2019;40(3):10–9. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-13002
Zabotina T.N., Chertkova A.I., Tsiklauri V.T. et al. Features of peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes subpopulations in patients with squamous cell head and neck cancer. *Immunologiya = Immunology* 2019;40(3):10–9. (In Russ.). DOI: 10.24411/0206-4952-2019-13002
11. Заботина Т.Н., Черткова А.И., Борунова А.А. и др. Взаимосвязь субпопуляций лимфоцитов больных раком молочной железы с результатами лечения. *Российский биотерапевтический журнал* 2021;20(3):25–33. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-25
Zabotina T.N., Chertkova A.I., Borunova A.A. et al. Relationship of lymphocyte subpopulations in breast cancer patients with treatment results. *Rossiiskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(3):25–33. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-25
12. Zhao Y., Shao Q., Peng G. Exhaustion and senescence: two crucial dysfunctional states of T cells in the tumor microenvironment. *Cell Mol Immunol* 2020;17(1):27–35. DOI: 10.1038/s41423-019-0344-8
13. Wherry E.J., Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015;15(8):486–99. DOI: 10.1038/nri3862
14. Davoodzadeh Gholami M., Kardar G.A., Saedi Y. et al. Exhaustion of T lymphocytes in the tumor microenvironment: significance and effective mechanisms. *Cell Immunol* 2017;322:1–14. DOI: 10.1016/j.cellimm.2017.10.002
15. Yang F., Zeng Z., Li J., Ren X., Wei F. IM-3 and CEACAM1 are prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma. *Front Mol Biosci* 2021;8:619765. DOI: 10.3389/fmolb.2021.619765
16. Kurachi M. CD8(+) T cell exhaustion. *Semin Immunopathol* 2019;41(3):327–37. DOI: 10.1007/s00281-019-00744-5
17. Jiang W., He Y., He W. et al. Exhausted CD8⁺ T cells in the tumor immune microenvironment: new pathways to therapy. *Front Immunol* 2021;11:622509. DOI: 10.3389/fimmu.2020.622509
18. Zhang C., Liu Y. Targeting NK cell checkpoint receptors or molecules for cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2020;11:1295. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01295
19. Penalzo-MacMaster P., Kamphorst A.O., Wieland A. et al. Interplay between regulatory T cells and PD-1 in modulating T cell exhaustion and viral control during chronic LCMV infection. *J Exp Med* 2014;211(9):1905–18. DOI: 10.1084/jem.20132577
20. Pawelec G. Does patient age influence anti-cancer immunity? *Semin Immunopathol* 2019;41(1):125–31. DOI: 10.1007/s00281-018-0697-6
21. Irelli A., Sirufo M.M., D'Ugo C. et al. Sex and gender influences on cancer immunotherapy response. *Biomedicines* 2020;8(7):232. DOI: 10.3390/biomedicines8070232
22. Henson S.M., Riddell N.E., Akbar A.N. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. *Curr Opin Immunol* 2012;24(4):476–81. DOI: 10.1016/j.coi.2012.04.001
23. Mirandola L., Wade R., Verma R. et al. Sex-driven differences in immunological responses: challenges and opportunities for the immunotherapies of the third millennium. *Int Rev Immunol* 2015;34(2):134–42. DOI: 10.3109/08830185.2015.1018417
24. Gubbels Bupp M.R., Potluri T., Fink A.L., Klein S.L. The confluence of sex hormones and aging on immunity. *Front Immunol* 2018;9:1269. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01269
25. Capone I., Marchetti P., Ascierto P.A. et al. Sexual dimorphism of immune responses: a new perspective in cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2018;9:552. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00552

Вклад авторов

Т.Н. Заботина: разработка плана исследования, написание текста рукописи;
А.И. Черткова: анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи;
А.А. Борунова: статистическая обработка данных;
Е.Н. Захарова: подготовка полученных данных к анализу;
Э.К. Шоуа, И.Б. Шоуа: создание базы данных, анализ данных;
В.Т. Циклаури: клинические исследования, обработка клинических данных;
И.А. Задеренко: клинические исследования, анализ клинических данных;
З.Г. Кадагидзе: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение и научное редактирование рукописи.

Authors contributions

T.N. Zabotina: development of a research plan, manuscript writing;
A.I. Chertkova: analysis and interpretation of data, manuscript writing;
A.A. Borunova: statistical data processing;
E.N. Zakharova: preparation of the obtained data for analysis;
E.K. Shoua, I.B. Shoua: creation of database; data analysis;
V.T. Tsiklauri: clinical trials, processing of clinical data;
I.A. Zaderenko: clinical trials, clinical data analysis;
Z.G. Kadagidze: review of publications on the topic of the article, discussion and scientific editing of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.Н. Заботина / T.N. Zabotina: <https://orcid.org/0000-0001-7631-5699>
А.И. Черткова / A.I. Chertkova: <https://orcid.org/0000-0001-9146-5986>
А.А. Борунова / A.A. Borunova: <https://orcid.org/0000-0002-1854-3455>
Е.Н. Захарова / E.N. Zakharova: <https://orcid.org/0000-0003-2790-6673>
Э.К. Шоуа / E.K. Shoua: <https://orcid.org/0000-0003-3937-474X>

И.Б. Шоа / I.B. Shoua: <https://orcid.org/0000-0002-9488-4710>
В.Т. Циклаури / V.T. Tsiklauri: <https://orcid.org/0000-0002-3090-695X>
И.А. Задеренко / I.A. Zaderenko: <https://orcid.org/0000-0003-0183-4827>
З.Г. Кадагидзе / Z.G. Kadagidze: <https://orcid.org/0000-0002-0058-0987>

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

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках темы НИР № ААА-А-А19-119022090028-6.
Funding. The study was performed with the financial support of the Ministry of Health of Russian Federation in the framework of research No. ААА-А-А19-119022090028-6.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Compliance with patient rights and principles of bioethics. All the patients signed informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 18.02.2022. Принята к публикации: 16.05.2022.
Article submitted: 18.02.2022. Accepted for publication: 16.05.2022.

HLA-мономорфные детерминанты первичной опухоли у больных раком молочной железы

С.В. Чулкова^{1,2}, Е.Н. Шолохова¹, И.В. Поддубная³, И.С. Стилиди^{1,2}, Н.Н. Тупицын¹

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

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия 117997 Москва, ул. Островитянова, 1а;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Контакты: Светлана Васильевна Чулкова chulkova@mail.ru

Введение. Молекулы главного комплекса гистосовместимости изучаются при раке длительное время, но их клиническая значимость до сих пор вызывает полемику. Сообщается, что они могут иметь важное предиктивное значение в эффективности иммунотерапии. В этом контексте интерес представляет изучение HLA-иммунофенотипов опухоли, поскольку дополнительно раскрывает иммунобиологические особенности рака, что в дальнейшем может повлиять на подходы в лекарственной терапии рака молочной железы.

Цель исследования – оценить частоту HLA-иммунофенотипов рака молочной железы и их взаимосвязь с клинико-морфологическими признаками первичной опухоли.

Материалы и методы. В исследование включены 82 больные раком молочной железы, получавшие лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Иммунофенотипирование первичной опухоли выполнено иммуногистохимическим методом (иммунофлуоресцентного окрашивания) на криостатных срезах. Оценка реакции проводилась с помощью люминесцентного микроскопа ZEISS AxioScope 5 (Zeiss AG, Германия). В исследовании преобладали больные с IIB стадией – 54 %, IIA стадия выявлена в 5 % случаев, IIIA – в 12 % случаев, IIIB – в 21 %, IIIC – в 8 %. Инfiltrативно-протоковый рак молочной железы диагностирован у 67 % больных ($n = 55$), инfiltrативно-дольковый – в 22 % случаев ($n = 18$), другие виды составили 11,0 % ($n = 9$). Изучена частота иммунофенотипов в зависимости от клинических и морфологических характеристик рака молочной железы.

Результаты. При раке молочной железы HLA-бинегативный иммунофенотип (отсутствие экспрессии обеих детерминант HLA I, II) являлся преобладающим. Высокая частота данного фенотипа наблюдалась при стадии T4 в сравнении с HLA-I⁺/HLA-DR⁺-фенотипом – 100 и 0 % соответственно ($p = 0,042$). При размерах первичной опухоли, соответствующих стадии T4, также наблюдался иммунофенотип HLA-I⁺/HLA-DR⁻. Отмечено, что частота встречаемости этого иммунофенотипа при IIIA стадии была выше в сравнении с HLA-I⁺/HLA-DR⁺-фенотипом – 60 и 40 % ($p = 0,01$). При опухолях, имеющих HLA-DR-негативный иммунофенотип, чаще наблюдались поражения лимфатических узлов, отсутствие экспрессии рецепторов к эстрогену. Опухоли с HLA-бинегативным иммунофенотипом в сравнении с группой опухолей с HLA-I⁺/HLA-DR⁺-фенотипом в 80 % наблюдений были рецептор-отрицательными ($p = 0,022$); аналогичные данные получены для HLA-I⁺/HLA-DR⁻-иммунофенотипа ($p = 0,037$).

Заключение. По результатам анализа HLA-иммунофенотипов рака молочной железы HLA-бинегативный иммунофенотип оказался преобладающим. Вторым по частоте являлся иммунофенотип с отсутствием экспрессии молекул HLA-DR. Выявлена связь HLA-иммунофенотипов со стадией опухолевого процесса, размером первичной опухоли, статусом экспрессии рецепторов к эстрогену.

Ключевые слова: HLA-I, HLA-DR, иммунофенотип, рак молочной железы, иммунофлуоресценция, криостатные срезы

Для цитирования: Чулкова С.В., Шолохова Е.Н., Поддубная И.В. и др. HLA-мономорфные детерминанты первичной опухоли у больных раком молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(2):56–66. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-56-66

HLA-monomorphic determinants of the primary tumor in breast cancer patients

Svetlana V. Chulkova^{1,2}, Elena N. Sholokhova¹, Irina V. Poddubnaya³, Ivan S. Stylyidi^{1,2}, Nikolay N. Tupitsyn¹

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

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1a Ostrovityanova St., 117997 Moscow, Russia;

³Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 Barrikadnaya St., 125993 Moscow, Russia

Contacts: Svetlana Vasilievna Chulkova chulkova@mail.ru

Background. Molecules of the major histocompatibility complex in cancer are currently being widely studied, and their clinical significance is still the subject of controversy. It is reported that they might have an important predictive value in the effectiveness of immunotherapy. The study of the expression HLA molecules status in breast cancer provides a deeper understanding of the biological properties of the tumor, in particular to identify the features of its immunological phenotype, which may further influence on breast cancer therapy.

Aim. To evaluate the frequency of HLA-immunophenotypes in breast cancer and their relationship with the clinical and morphological features of the primary tumor.

Materials and methods. This study included 82 patients with breast cancer who received treatment at the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia. Immunophenotyping of the primary tumor was performed by immunofluorescence on cryostat sections. The reaction was evaluated using a ZEISS AxioScope 5 luminescent microscope (Zeiss AG, Germany). The study was dominated by patients with stage IIB – 54 %, stage IIA was detected in 5 % of cases, IIIA – in 12 % of cases, IIIB – in 21 % of cases, IIIC – 8 %. Infiltrative ductal breast cancer was diagnosed in 67 % of patients ($n = 55$), infiltrative-lobular – in 22 % of cases ($n = 18$), other types – in 11 % ($n = 9$). The frequency of immunophenotypes was studied depending on the clinical and morphological characteristics of breast cancer.

Results. It was found that in the group as a whole, the HLA-binegative immunophenotype of breast cancer was predominant. It dominated at stage T4 compared to the HLA-I⁺/HLA-DR⁺ phenotype (100 and 0 %), $p = 0.042$. At the same time, it should be noted that in T4 primary tumor the HLA-I⁺/HLA-DR⁻ immunophenotype was also observed. The relationship this immunophenotype was noted with the stage: frequency at stage IIIA was higher than the HLA-I⁺/HLA-DR⁺ phenotype, 60 and 40 %, $p = 0.01$. Both HLA-DR-negative immunophenotypes were characterized by a high incidence of lymph node involvement and the absence of estrogen receptor expression. 80 % of receptor-negative tumors were noted in HLA-binegative immunophenotype compared to phenotype HLA-I⁺/HLA-DR⁺, $p = 0.022$; the similar data were obtained for the HLA-I⁺/HLA-DR⁻ immunophenotype ($p = 0.037$).

Conclusion. HLA immunophenotypes analysis of breast cancer revealed the HLA-binegative immunophenotype of breast cancer was predominant. The second most common immunophenotype was the absence of expression of HLA-DR molecules. The association of HLA-immunophenotypes with the stage of the tumor process, the size of the primary tumor, and the expression status of estrogen receptors was revealed.

Keywords: HLA-I, HLA-DR, immunophenotype, breast cancer, immunofluorescence

For citation: Chulkova S.V., Sholokhova E.N., Poddubnaya I.V. et al. HLA-monomorphic determinants of the primary tumor in breast cancer patients. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022; 21(2):56–66. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-56-66

Введение

Рак молочной железы (PMЖ) – самая распространенная злокачественная опухоль у женщин. В структуре онкологической заболеваемости она прочно удерживает лидирующее место. По статистическим данным, в 2020 г. было зарегистрировано 2261419 новых случаев PMЖ [1]. Современные методы диагностики и лечения благодаря достижениям молекулярной биологии позволили преодолеть некоторые трудности и улучшить показатели выживаемости данной категории больных. Однако смертность от PMЖ остается высокой [2]. Ежегодно в мире регистрируется почти 700 тыс. летальных исходов этой болезни [3]. Поэтому на сегодняшний день остается актуальным усовершенствование существующих и поиск новых лечебных подходов при PMЖ.

В исследованиях PMЖ широкое распространение получило изучение молекулярно-биологических характеристик опухоли, которые имеют важное значение при выборе вида лечения и тесно связаны с про-

гнозом заболевания. В связи с этим неослабевающий интерес удерживают иммунологические маркеры, к числу которых относятся молекулы главного комплекса гистосовместимости: HLA I и II классов (HLA-I, HLA-II) [4, 5].

Молекулы HLA являются примитивными рецепторами, которые в норме экспрессируются всеми ядродержащими клетками организма. Они специализируются на распознавании и представлении собственных и чужеродных пептидов [6]. Молекулы HLA, экспонируя на клеточной мембране пептидные фрагменты, опосредуют T-клеточный противоопухолевый ответ [7].

Установлено, что при многих видах рака имеются изменения в экспрессии молекул HLA, приводящие к эффективному уклонению опухоли от цитотоксической атаки иммунными клетками, что влечет за собой ее прогрессирование [8–10]. По мнению исследователей, выраженность экспрессии, а порой утрата экспрессии молекул HLA-I, в зависимости

от вида опухоли могут быть ассоциированы с гистологическим типом опухоли, степенью ее злокачественности, ответом на лечение, выживаемостью [11, 12].

В связи с этим молекулы HLA широко и детально изучаются, в том числе при РМЖ, а их клиническая значимость до сих пор вызывает полемику. Сообщается, что они могут иметь важное предиктивное значение в эффективности иммунотерапии. Этому посвящены несколько экспериментальных и клинических исследований, в которых анализируется влияние экспрессии молекул HLA-I и HLA-II на эффективность анти-PD-1/PD-L1-терапии [13–17].

В лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России проведено несколько научных исследований по изучению молекул HLA при раке [18–22]. Одной из крупных работ является исследование Е.В. Артамоновой, в котором показано наличие взаимосвязи экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II классов клетками РМЖ между собой [19]. Выявлены ассоциации экспрессии мономорфных HLA-детерминант с выраженностью интратуморальных иммунных реакций. Снижение экспрессии молекул HLA клетками РМЖ сопровождается достоверным снижением инфильтрации опухоли по большинству субпопуляций иммунокомпетентных клеток, была выявлена корреляция инфильтрации с прогнозом. На основании полученных результатов автором предложена концепция, согласно которой мономорфные HLA-детерминанты опосредованно, через иммунные реакции, влияют на прогноз заболевания [19]. В свою очередь, особый интерес представляет изучение HLA-иммунофенотипов опухоли, поскольку они могут представлять собой различные опухолевые клоны и отличаться характером интратуморальных реакций. В дальнейшем это может оказать влияние на направленность лечебных подходов, эффективность лекарственной терапии.

Материалы и методы

Материалом данного исследования послужили образцы опухолевой ткани. В исследование были включены 82 больные РМЖ, которые прошли обследование и получали лечение в условиях ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2002–2005 гг. Возраст больных варьировал от 27 до 77 лет, средний возраст составил $53,7 \pm 10,3$ года. У 46 % пациенток репродуктивная функция была сохранена, 48 % пациенток находились в состоянии менопаузы, 4 % – перименопаузы, 2 % – постменопаузы. Диагноз РМЖ был установлен на основании клинических, рентгенологических и морфологических данных. Всем пациенткам выполнено хирурги-

ческое пособие: в объеме мастэктомии – 79,3 % ($n = 65$), резекции молочной железы – 20,7 % ($n = 17$). Лекарственное лечение в неoadьювантном режиме проведено у 62,2 % пациенток ($n = 51$), в адьювантном режиме – у 37,8 % ($n = 31$). Лучевая терапия проведена в 45,1 % случаев ($n = 37$), гормонотерапия – в 50,0 % ($n = 41$). Согласно клинической классификации и международной системе TNM (7-е издание) установлена распространенность опухолевого процесса. По стадиям заболевания больные распределились следующим образом: ПА стадия – 5 % случаев, ПВ стадия – 54 %, ПША стадия – 12 %, ПШВ стадия – 21 %, ПШС стадия – 8 % (табл. 1).

Таблица 1. Распределение больных в зависимости от стадии рака молочной железы

Table 1. Distribution of patients depending on the stage of breast cancer

Стадия Stage	<i>n</i>	%
ПА	4	5,0
ПВ	44	54,0
ПША	10	12,0
ПШВ	17	21,0
ПШС	7	8,0
<i>Всего</i> <i>Total</i>	82	100

В большинстве случаев размер первичной опухоли соответствовал категории T2 – 72 % ($n = 59$), реже отмечалась стадия T4 – 22 % ($n = 18$), стадия T1 определена у 2,4 % больных ($n = 2$), а T3 – у 3,6 % ($n = 3$). Метастатическое поражение лимфатических узлов (N+) наблюдалось почти у всех больных, что составило 95 % ($n = 78$): N1 – 68,9 % ($n = 54$), N2 – 20,7 % ($n = 17$), N3 – 8,5 % ($n = 7$). Чаще всего степень дифференцировки опухоли соответствовала G₂ (76,5 %, $n = 52$).

В соответствии с данными патоморфологического исследования, в большинстве случаев диагностирован инфильтративно-протоковый РМЖ – 67 % больных ($n = 55$), инфильтративно-дольковый рак отмечен в 22 % случаев ($n = 18$), другие виды составили 11,0 % ($n = 9$) (рис. 1).

Экспрессия опухолевыми клетками рецепторов к эстрогену наблюдалась в 34 % случаев ($n = 28$), рецепторов к прогестерону – в 35 % ($n = 29$) (табл. 2).

Иммунофенотипирование первичной опухоли выполнено на криостатных срезах в лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России методом иммуногистохимии (иммунофлуоресцентного окрашивания).

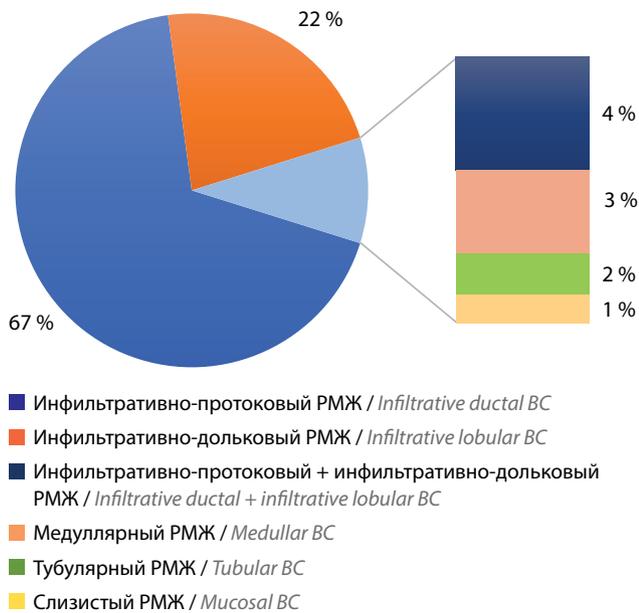


Рис. 1. Распределение больных в зависимости от гистологического типа рака молочной железы (РМЖ)

Fig. 1. Distribution of patients depending on the histological type of breast cancer (BC)

Срезы опухоли помещали на предметные стекла, фиксировали ацетоном («ПанЭко», Россия) в течение 10 мин при температуре 4 °С. Затем отмывали в среде 199 (pH 7,2–7,4) («ПанЭко», Россия), наносили моноклональные антитела (HLA-ABC, clone: W6/32, HLA-DR, clone: LN3) (Becton Dickinson, США) и инкубировали в течение 30 мин. После отмывания наносили F(ab)2-фрагменты антивидовых IgG1, меченные FITC (clone: M1-14D12) (Becton Dickinson, США). По окончании инкубации препараты отмывали и консервировали 50 % раствором глицерина («ПанЭко», Россия).

Таблица 2. Распределение больных в зависимости от рецепторного статуса рака молочной железы

Table 2. Distribution of patients depending on the receptor status of breast cancer

Рецепторный статус Receptor status	n	%
РЭ ⁻ ER ⁻	54	65,9
РЭ ⁺ ER ⁺	28	34,1
РП ⁻ PR ⁻	53	64,6
РП ⁺ PR ⁺	29	35,4

Примечание. РЭ – рецепторы к эстрогену; РП – рецепторы к прогестерону.

Note. ER – estrogen receptor; PR – progesterone receptors.

Учет реакции выполняли на люминесцентном микроскопе ZEISS Axioscope 5 (Zeiss AG, Германия). Положительными считали клетки, имеющие мембранное свечение (в виде кольца, сегмента, полукольца) разной степени интенсивности (от слабой до выраженной), а также клетки с цитоплазматическим свечением. Реакция клеток в контроле отсутствовала. Оценку экспрессии опухолевыми клетками молекул главного комплекса гистосовместимости HLA-I, HLA-DR проводили полуколичественным методом, предложенным Hammerling и соавт. (1987).

Выделяли 3 типа взаимодействия антител с опухолевыми клетками: мозаичный тип – антиген экспрессируется частью опухолевых клеток (10–80 %); мономорфный тип – экспрессия антигена наблюдается более чем на 80 % опухолевых клеток; при экспрессии антигена менее чем 10 % опухолевых клеток реакция расценивалась как отрицательная. Указанные виды взаимодействия антител с опухолевыми клетками представлены на рис. 2.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета IBM SPSS Statistics v.21. Осуществляли анализ корреляционных связей по Пирсону или Спирмену, подсчет распределения частот по категориям с непрерывными и дискретными переменными (критерий Фишера и χ^2 по Пирсону). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты анализа экспрессии молекул HLA-I, HLA-DR клетками РМЖ представлены на рис. 3.

Хорошо известно, что молекулы HLA-I могут утрачиваться при РМЖ в 7–56 % случаев. В нашем исследовании при изучении экспрессии молекул HLA-I установлено следующее. Почти в половине исследуемых образцов (46,0 %, $n = 37$) HLA-детерминанты I класса утрачивались. Мономорфная экспрессия молекул HLA-I выявлена в 42,0 % случаев ($n = 34$), а в 12,2 % случаев ($n = 10$) наблюдали мозаичный тип реакции.

Несколько иная картина наблюдалась в отношении экспрессии молекулы HLA-DR. HLA-DR обнаруживались нами на клетках РМЖ гораздо реже. Мономорфная экспрессия HLA-DR-антигена отмечена в 10 % наблюдений ($n = 8$). Мозаично экспрессировали данный антиген опухолевые клетки в 12,0 % образцов ($n = 9$). Антигеннегативные опухоли встречались в большинстве изученных образцов, что составило 78,0 % ($n = 64$).

Таким образом, частота экспрессии молекул HLA-I и HLA-II различалась. Почти в половине случаев молекулы HLA-I утрачиваются, а экспрессия наблюдается в 54 % случаев. Экспрессия молекул HLA-II установлена в 22,0 % образцов. Как видим, большинство анализируемых опухолей характеризовались

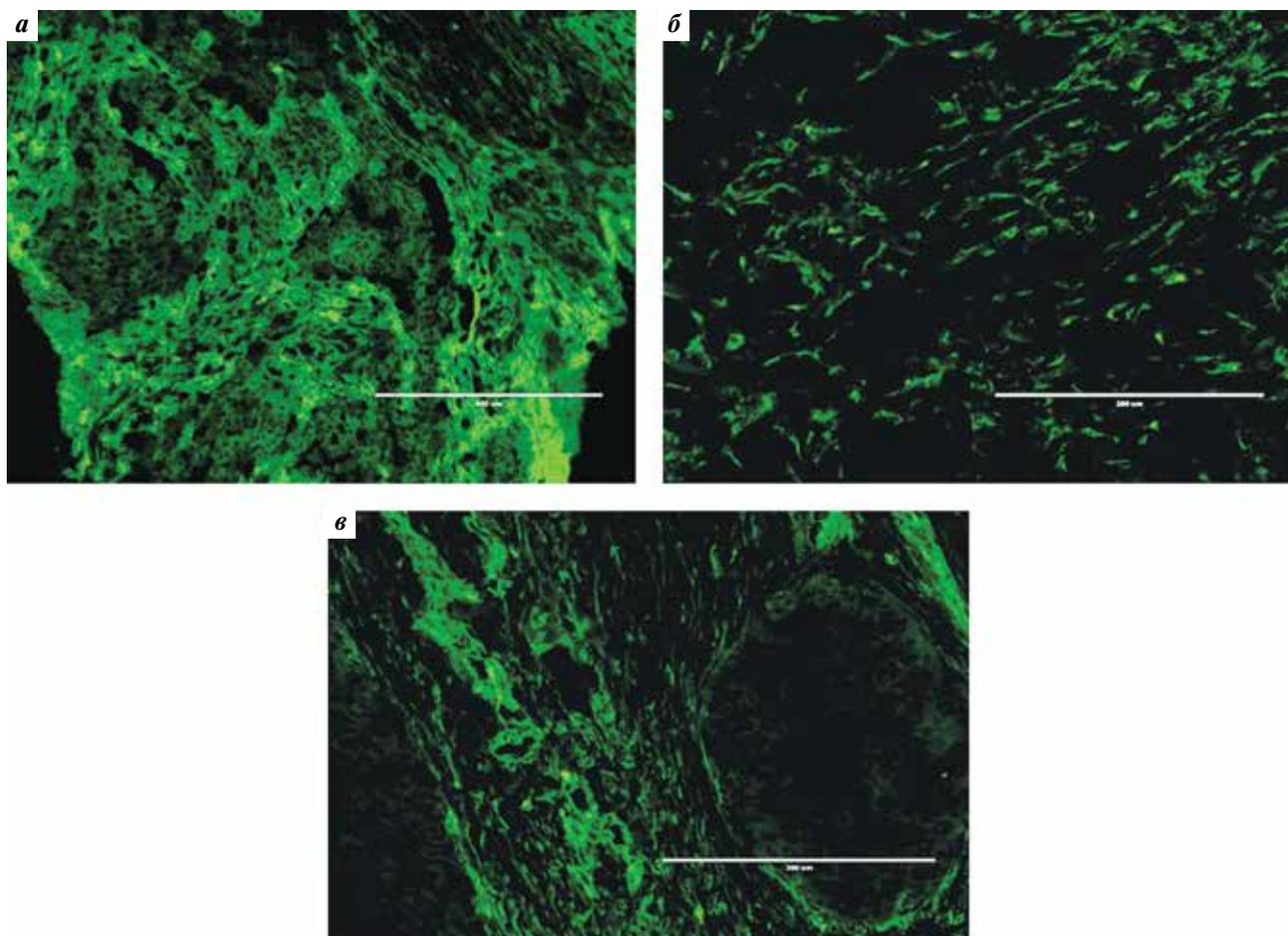


Рис. 2. Типы экспрессии изучаемого антигена опухолевыми клетками: а – мономорфный тип реакции; б – мозаичный тип реакции; в – отрицательная реакция. Иммунофлуоресцентный анализ. $\times 400$

Fig. 2. Types of expression of the studied antigen by tumor cells: а – monomorphic type of reaction; б – mosaic type of reaction; в – negative reaction. Immunofluorescence analysis. $\times 400$

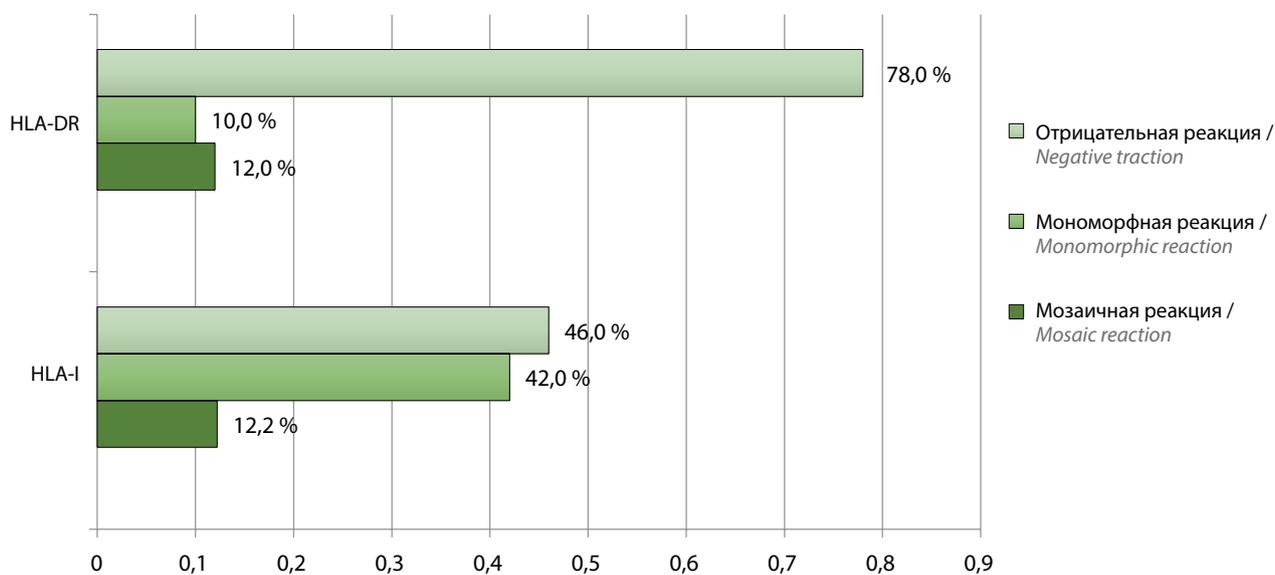


Рис. 3. Экспрессия опухолевыми клетками молекул HLA-I, HLA-DR

Fig. 3. Expression of HLA-I, HLA-DR molecules by tumor cells

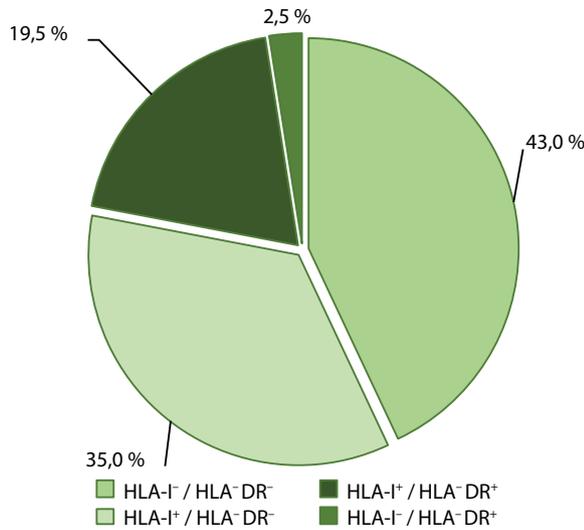


Рис. 4. Частота HLA-иммунофенотипических вариантов рака молочной железы

Fig. 4. Frequency of HLA-immunophenotypic variants of breast cancer

отсутствием экспрессии HLA-II. Полученные результаты согласуются с данными литературы [18, 19].

При этом следует отметить, что, по данным отдельных источников, экспрессия молекул HLA-I при РМЖ может наблюдаться чаще [11, 12]. Этому может быть несколько объяснений. Во-первых, это может быть обусловлено разной шкалой оценки реакции. Во-вторых, полученные результаты могут отличаться ввиду особенностей выборки: биологические типы опухоли, морфологические характеристики. Интересно, что в работе В. V. Sinn и соавт. высокая частота положительных случаев наблюдалась преимущественно за счет 2 молекулярных подтипов РМЖ. Авторы указывают, что наиболее часто экспрессия наблюдалась при HR⁻/HER2⁻ и HR⁻/HER2⁺-опухолях, а также при низкой дифференцировке (G₃) [12].

Анализ частоты иммунофенотипов показал следующее. Преобладающим вариантом иммунофенотипа РМЖ был HLA-I⁻/HLA-DR⁻, что составило 43 % (n = 35) (рис. 4). В группе HLA-I-негативных опухолей всего в 2,5 % случаев (n = 2) имела экспрессия HLA-DR (не мономорфная). Эти данные демонстрируют формирование HLA-негативного пула опухолевых клеток, которые, утрачивая молекулы главного комплекса гистосовместимости, избегают атаки Т-цитотоксических лимфоцитов и таким образом приобретают преимущество в выживании. Такое антигенное упрощение опухоли хорошо изучено и документировано. В данном исследовании процент таких опухолей составляет почти половину выборки.

Имунофенотип HLA-I⁺/HLA-DR⁻ встречался в 35 % случаев (n = 28). Отсутствие утраты антигена

HLA-I в 19,5 % случаев сопровождалось экспрессией молекул HLA-DR, что показывает некоторую синхронность в экспрессии антигенов гистосовместимости I и II классов на клетках РМЖ. Необходимо отметить, что в 7 случаях в группе фенотипа HLA-I⁺/HLA-DR⁻ отсутствовала мономорфная экспрессия HLA-I опухолевыми клетками, иными словами, часть клеток опухолей уже утрачивает данную детерминанту.

Анализ взаимосвязи экспрессии опухолевыми клетками антигенов HLA-I с экспрессией молекул HLA-DR показал, что снижение экспрессии молекул HLA-I сопровождается потерей экспрессии HLA-II (61,8; 77,8; 94,6 %) (табл. 3). В HLA-I-негативной группе опухолевые клетки в 94,6 % случаев не экспрессируют HLA-II. При сохранной экспрессии (мономорфной реакции) антигенных детерминант HLA-I в 20,6 % случаев молекулы HLA-II выражено экспрессируются на поверхности опухолевых клеток. При этом HLA-II в 17,6 % образцов экспрессируются мозаично. Напротив, в HLA-I-негативной группе мозаичный тип реакции HLA-II отмечается только в 5,4 % наблюдений. Признаки достоверно взаимосвязаны. Корреляционный анализ по Спирмену показал среднюю положительную корреляцию данных признаков: 0,388 (p = 0,000).

Таблица 3. Взаимосвязь экспрессии опухолевыми клетками антигенов HLA-I с экспрессией молекул HLA-DR (p = 0,004)

Table 3. The relationship between the expression of HLA-I antigens by tumor cells and the expression of HLA-DR (p = 0.004)

Антиген Antigen		HLA-DR ⁻	HLA-DR ^{-/+}	HLA-DR ⁺	Всего Total
HLA-I ⁻	n	35	2	0	37
	%	94,6	5,4	0,0	100
HLA-I ^{-/+}	n	7	1	1	9
	%	77,8	11,1	11,1	100
HLA-I ⁺	n	21	6	7	34
	%	61,8	17,6	20,6	100
Всего Total	n	63	9	8	80
	%	78,8	11,2	10,0	100

Далее в работе были проанализированы взаимосвязи клинических и морфологических характеристик опухоли с различными видами иммунофенотипа РМЖ. Интересно было сопоставить группу опухолей, утративших экспрессию обеих HLA-детерминант с группой, в которой оба маркера экспрессировались

опухолевыми клетками. При сравнении иммунофенотипов HLA-I⁻/HLA-DR⁻ и HLA-I⁺/HLA-DR⁺ не обнаружено достоверных связей с возрастом, стадией, количеством пораженных лимфатических узлов, гистологическим видом опухоли, степенью дифференцировки. При этом следует отметить, что прослеживалась отчетливая тенденция увеличения встречаемости бинегативного фенотипа при нарастании количества пораженных лимфатических узлов. При стадиях N0, N1, N2 частота фенотипа HLA-I⁻/HLA-DR⁻ составляла 33,3; 68,6; 88,9 % соответственно, однако при N3 этот показатель составил 50 %, достоверности не достигнуто. Необходимо отметить, что более ранние работы лаборатории указывают на существование взаимосвязи статуса лимфатических узлов с экспрессией молекул HLA-DR [19].

Не отмечено связи с размером первичной опухоли (T), однако углубленный анализ в пределах групп со стадиями T2 и T4, которые были наиболее многочисленны, позволил установить, что частота иммунофенотипа HLA-I⁻/HLA-DR⁻ выше при стадии T4 (табл. 4). Как видно из таблицы, частота бинегативного иммунофенотипа при стадии T2 составляла 64,3 %, тогда как при стадии T4 – 100 % ($p = 0,042$). Фенотип HLA-I⁺/HLA-DR⁺ при стадии T4 не наблюдался ни в одном случае. Иными словами, иммунофенотип HLA-I⁻/HLA-DR⁻ при больших размерах опухоли встречается достоверно чаще, чем HLA-I⁺/HLA-DR⁺-фенотип. Разумеется, количество случаев при стадии T4 невелико, и необходимо продолжить накопление материала.

Таблица 4. Результаты анализа взаимосвязей фенотипов HLA-I⁻/HLA-DR⁻ и HLA-I⁺/HLA-DR⁺ с размером опухоли (T) ($p = 0,042$)

Table 4. Results of the analysis of the relationship of HLA-I⁻/HLA-DR⁻ and HLA-I⁺/HLA-DR⁺ phenotypes with tumor size (T) ($p = 0.042$)

Категория T Category T		HLA-I ⁻ / HLA-DR ⁻	HLA-I ⁺ / HLA-DR ⁺	Всего Total
T2	n	27	15	42
	%	64,3	35,7	100
T4	n	5	0	5
	%	100	0,0	100
Всего Total	n	32	15	47
	%	68,1	31,9	100

При изучении рецепторного статуса установлено, что при HLA-бинегативном иммунофенотипе опухолевые клетки преимущественно не экспрессировали рецепторы к эстрогену (табл. 5). Как видно из таблицы, 80 % рецептор-отрицательных опухолей имели фенотип HLA-I⁻/HLA-DR⁻, тогда как HLA-I⁺/

HLA-DR⁺ – лишь 19,6 %. Признаки достоверно связаны ($p = 0,022$). Можно предположить, что в результате сложных молекулярно-биологических изменений отсутствие экспрессии обеих молекул HLA пептидного комплекса на клетках РМЖ сопровождается отсутствием рецепторов к стероидным гормонам, по типу нелюминального рака, который, как известно, отличается более агрессивным течением, более частым поражением лимфатических узлов, большими размерами опухолевого узла [23]. Действительно, в нашем исследовании мы наблюдали, что именно при увеличении встречаемости HLA-бинегативного фенотипа отмечается нарастание количества пораженных лимфатических узлов. Несмотря на то что достоверной связи N⁺-статуса с фенотипом HLA-I⁻/HLA-DR⁻ в нашей работе не выявлено, подтверждением предположения могут служить результаты работы Е.В. Артамоновой, в которой установлено, что при отсутствии молекул HLA-DR на опухолевых клетках метастазы в регионарных лимфатических узлах выявляются достоверно чаще, чем при наличии таковых [19].

Таблица 5. Результаты сравнения фенотипов HLA-I⁻/HLA-DR⁻ и HLA-I⁺/HLA-DR⁺ в зависимости от рецепторного статуса опухоли ($p = 0,022$)

Table 5. Results of comparison of HLA-I⁻/HLA-DR⁻ and HLA-I⁺/HLA-DR⁺ phenotypes depending on the receptor status of the tumor ($p = 0.022$)

Статус рецепторов Receptors status		HLA-I ⁻ / HLA-DR ⁻	HLA-I ⁺ / HLA-DR ⁺	Всего Total
РЭ ⁻ ER ⁻	n	25	6	31
	%	80,6	19,4	100
РЭ ⁺ ER ⁺	n	10	10	20
	%	50,0	50,0	100
Всего Total	n	35	16	51
	%	68,6	31,4	100

Примечание. Здесь и в табл. 9: РЭ – рецепторы к эстрогену.
Note. Here and in table 9: ER – estrogen receptor.

Следующим предметом сравнения стали группы опухолей с отсутствием экспрессии обеих молекул главного комплекса гистосовместимости и отсутствием экспрессии одного из антигенов. Нами выполнен анализ наиболее многочисленной группы с HLA-I⁺/HLA-DR⁻-фенотипом. Связи с возрастом, стадией, индексом N, рецепторным статусом опухоли не отмечено.

Оценив частоту обозначенных иммунофенотипов в пределах групп со стадиями T2 и T4, мы обнаружили следующую закономерность (табл. 6). При стадии T2 иммунофенотип HLA-I⁻/HLA-DR⁻ встречался в 65,9 % наблюдений, тогда как HLA-I⁺/HLA-DR⁻ –

в 34,1 % наблюдений. Ситуация менялась при стадии Т4: преобладал фенотип с отсутствием только молекулы HLA-DR, что составило 72,2 % ($p = 0,006$). Установлена невысокая положительная корреляция (по Спирмену): 0,367 ($p = 0,003$). Интерпретация полученных данных несколько затруднительна. Поскольку, на первый взгляд, при оценке статуса экспрессии антигенных детерминант, опосредующих иммунный ответ, ожидаемо, что опухоли, не экспрессирующие обе детерминанты, возможно, более адаптивны и агрессивны и могут иметь больший размер узла. Как мы видим, это выглядит не совсем так. Возможно, дальнейшие исследования помогут прояснить эти результаты.

Таблица 6. Результаты сравнения фенотипов HLA-I⁻/HLA-DR⁻ и HLA-I⁺/HLA-DR⁻ в зависимости от размера опухоли (Т) ($p = 0,006$)

Table 6. Results of comparison of HLA-I⁻/HLA-DR⁻ and HLA-I⁺/HLA-DR⁻ phenotypes depending on tumor size (T) ($p = 0.006$)

Категория Т Category T		HLA-I ⁻ / HLA-DR ⁻	HLA-I ⁺ / HLA-DR ⁻	Всего Total
Т2	n	27	14	41
	%	65,9	34,1	100
Т4	n	5	13	18
	%	27,8	72,2	100
Всего Total	n	32	27	59
	%	54,2	45,8	100

Достоверных различий между анализируемыми иммунофенотипами в зависимости от гистологического вида опухоли не наблюдалось. Вместе с тем следует отметить, что при протоковой карциноме оба фенотипа встречались почти с равной частотой (51,2 и 48,8 %), а при инфильтративно-дольковом раке фенотип HLA-I⁻/HLA-DR⁻ преобладал (69,2 и 30,8 %). Признаки не были достоверно связаны, поэтому любая трактовка, разумеется, должна быть осторожной.

Интересным оказалось сравнение группы HLA-I⁺/HLA-DR⁻ с группой, в которой оба антигена экспрессированы. Установлена достоверная взаимосвязь со стадией заболевания, которая заключалась в следующем. Как видно из табл. 7, при более ранней стадии частота фенотипа HLA-I⁺/HLA-DR⁻ была меньше, чем при более распространенной стадии РМЖ. Так, при IIА стадии она составляла 33,3 %, тогда как при IIIА – 60,0 %. Иная картина получена в отношении фенотипа HLA-I⁺/HLA-DR⁺, встречаемость которого при IIА стадии составила 66,7 %, при IIIА – 40,0 %. Разумеется, в некоторых группах число случаев невелико, и, несмотря на достоверность, следует продолжить накопление материала.

Таблица 7. Результаты сравнения фенотипов HLA-I⁻/HLA-DR⁻ и HLA-I⁺/HLA-DR⁺ в зависимости от стадии заболевания ($p = 0,01$)

Table 7. Results of comparison of HLA-I⁻/HLA-DR⁻ and HLA-I⁺/HLA-DR⁺ phenotypes depending on the stage ($p = 0.01$)

Стадия Stage		HLA-I ⁻ / HLA-DR ⁻	HLA-I ⁺ / HLA-DR ⁺	Всего Total
IIА	n	1	2	3
	%	33,3	66,7	100
IIВ	n	9	9	18
	%	50,0	50,0	100
IIIА	n	3	2	5
	%	60,0	40,0	100
IIIВ	n	12	0	12
	%	100	0,0	100
IIIС	n	3	2	5
	%	60,0	40,0	100
Всего Total	n	28	15	43
	%	65,1	34,9	100

Также необходимо отметить, что, как указано выше, при сравнении HLA-бинегативного иммунофенотипа (HLA-I⁻/HLA-DR⁻) с HLA-I⁺/HLA-DR⁻ фенотипом выявлена корреляция признака с размером опухоли: при Т4 преобладал фенотип с отсутствием экспрессии только антигена HLA-DR. Это косвенно может подтверждать, что при более распространенных стадиях действительно HLA-I⁺/HLA-DR⁻ фенотип наблюдается чаще.

Дальнейшее сравнение анализируемых фенотипов показало, что при стадии Т4 в 100,0 % случаев наблюдается фенотип HLA-I⁺/HLA-DR⁻, при стадии Т2 оба фенотипа встречались одинаково часто (табл. 8).

Анализ рецепторного статуса опухоли выявил, что иммунофенотип с отсутствием экспрессии одного из антигенов (HLA-I⁺/HLA-DR⁻) встречается чаще в группе опухолей, не экспрессирующих рецепторы к эстрогену, в отличие от HLA-I⁺/HLA-DR⁺ фенотипа: 80,0 % против 20,0 % ($p = 0,037$) (табл. 9). Эти данные почти полностью повторяют результаты, полученные при сравнении HLA-бинегативных опухолей с группой опухолей, экспрессирующих оба антигена. Не обнаруживалось связи с рецепторами к прогестерону.

Суммируя результаты проведенного в данной работе анализа, следует констатировать, что HLA-иммунофенотип с отсутствием экспрессии обеих молекул главного комплекса гистосовместимости клетками РМЖ в анализируемой выборке является

преобладающим. Данный фенотип доминировал при стадии Т4 в сравнении с HLA-I⁺/HLA-DR⁺-фенотипом. Вместе с тем следует отметить, что при размерах первичной опухоли более 5 см также наблюдался фенотип HLA-I⁺/HLA-DR⁻ (взаимосвязь которого отмечена со стадией), и он встречался чаще, нежели HLA-I⁺/HLA-DR⁺-фенотип.

Таблица 8. Результаты сравнения фенотипов HLA-I⁺/HLA-DR⁻ и HLA-I⁺/HLA-DR⁺ в зависимости от размера опухоли (Т) ($p = 0,0001$)

Table 8. Results of comparison of HLA-I⁺/HLA-DR⁻ and HLA-I⁺/HLA-DR⁺ phenotypes depending on tumor size (T) ($p = 0.0001$)

Категория Т Category T		HLA-I ⁺ / HLA-DR ⁻	HLA-I ⁺ / HLA-DR ⁺	Всего Total
Т2	n	14	14	28
	%	50,0	50,0	100
Т4	n	13	0	13
	%	100	0,0	100
Всего Total	n	27	14	41
	%	65,9	34,1	100

Таблица 9. Результаты сравнения фенотипов HLA-I⁺/HLA-DR⁻ и HLA-I⁺/HLA-DR⁺ в зависимости от рецепторного статуса опухоли ($p = 0,037$)

Table 9. Results of comparison of HLA-I⁺/HLA-DR⁻ and HLA-I⁺/HLA-DR⁺ phenotypes depending on the receptor status of the tumor ($p = 0.037$)

Статус рецепторов Receptors status		HLA-I ⁺ / HLA-DR ⁻	HLA-I ⁺ / HLA-DR ⁺	Всего Total
РЭ ⁻ ER ⁻	n	20	5	25
	%	80,0	20,0	100
РЭ ⁺ ER ⁺	n	8	10	18
	%	44,4	55,6	100
Всего Total	n	28	15	43
	%	65,1	34,9	100

Таким образом, значительное число опухолей уже на ранних этапах развития характеризуются отсутствием экспрессии одной или обеих детерминант HLA пептидного комплекса. Роль молекул HLA-DR на раковых клетках во многом сходна с ролью молекул HLA-I с точки зрения опосредования взаимодействия опухоли с иммунной системой. Поэтому вполне ожидаемо, что опухоли с иммунофенотипами HLA-I⁺/HLA-DR⁻, HLA-I⁺/HLA-DR⁺ могут иметь слабую степень лимфоидной инфильтрации, особен-

но активированными Т-клетками. В более ранних работах нашей лаборатории Д.А. Буровым и соавт. детально описано, что именно HLA-DR-негативные опухоли характеризовались сниженным содержанием интралимфоцитарных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺) [21]. В то же время в группах с HLA-DR-положительными фенотипами установлено, что экспрессия молекул гистосовместимости II класса при РМЖ достоверно коррелирует с увеличением инфильтрации опухоли [19, 24].

Следует обратить внимание, что оба HLA-DR-негативных иммунофенотипа характеризовались частым метастатическим поражением лимфатических узлов и нередким отсутствием экспрессии рецепторов к стероидным гормонам. Известно, что HLA-I, HLA-DR-негативные опухоли имеют более плохой прогноз и ответ на лечение, что обсуждается в работе М.Л. Axelrod и соавт. [25]. Поэтому клиническое значение иммунофенотипа HLA-I⁺/HLA-DR⁻ видится вполне очевидным. Опухолевые клетки с таким фенотипом могут составлять особый клон, резистентный к проводимой терапии, в частности иммунотерапии. Об этом могут свидетельствовать несколько экспериментальных и клинических исследований, в которых обсуждается влияние экспрессии молекул HLA-I и HLA-DR на эффективность анти-PD-1/PD-L1-иммунотерапии; в частности, экспрессия HLA-DR клетками рака может предсказывать высокую вероятность ответа на анти-PD-1/PD-L1-терапию [13–17, 25].

Заключение

В работе выполнен анализ HLA-иммунофенотипов при РМЖ, изучена их связь с клинико-морфологическими характеристиками опухоли. Согласно результатам исследования, HLA-бинегативный иммунофенотип РМЖ являлся преобладающим. При стадии Т4 он выявлялся чаще в сравнении с HLA-I⁺/HLA-DR⁺-фенотипом. Вместе с тем следует отметить, что при размерах первичной опухоли, соответствующих Т4, также наблюдался иммунофенотип HLA-I⁺/HLA-DR⁻, взаимосвязь которого отмечена со стадией. Его частота при распространенной стадии была выше, нежели HLA-I⁺/HLA-DR⁺-фенотипа. Оба HLA-DR-негативных иммунофенотипа характеризовались высокой частотой поражения лимфатических узлов, нередким отсутствием экспрессии рецепторов к стероидным гормонам. Полученные данные, по-видимому, могут указывать на то, что опухоли с подобным иммунофенотипом обладают высоким злокачественным потенциалом, что, безусловно, крайне важно принимать во внимание при планировании лекарственного лечения, и особенно иммунотерапии.

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

- Global cancer statistics. IARC, 2020. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>
- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660
- McCormack V., McKenzie F., Foerster M. et al. Breast cancer survival and survival gap apportionment in sub-Saharan Africa (ABC-DO): a prospective cohort study. *Lancet Glob Health* 2020;8(9):e1203–12. DOI: 10.1016/S2214-109X(20)30261-8
- Sabbatino F., Liguori L., Polcaro G. et al. Role of human leukocyte antigen system as a predictive biomarker for checkpoint-based immunotherapy in cancer patients. *Int J Mol Sci* 2020;21(19):7295. DOI: 10.3390/ijms21197295
- Shukla A., Cloutier M., Santharam A.M. et al. The MHC class-I transactivator NLRC5: implications to cancer immunology and potential applications to cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2021;22(4):1964. DOI: 10.3390/ijms22041964
- Trowsdale J., Knight J.C. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genom Hum Genet* 2013;14:301–23. DOI: 10.1146/annurev-genom-091212-153455
- Blum J.S., Wearsch P.A., Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 2013;31:443–73. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-095910
- Cabrera T., Maleno I., Collado A. et al. Analysis of HLA class I alterations in tumors: choosing a strategy based on known patterns of underlying molecular mechanisms. *Tissue Antigens* 2007;69(Suppl S1):264–8. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2006.00777.x
- Cai L., Michelakos T., Yamada T. et al. Defective HLA class I antigen processing machinery in cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2018;67(6):999–1009. DOI: 10.1007/s00262-018-2131-2
- Garrido F., Algarra I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 2001;83:117–58. DOI: 10.1016/s0065-230x(01)83005-0
- Pedersen M.H., Hood B.L., Beck H.C. et al. Downregulation of antigen presentation-associated pathway proteins is linked to poor outcome in triple-negative breast cancer patient tumors. *Oncoimmunology* 2017;6(5):e1305531. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1305531
- Sinn B.V., Weber K.E., Schmitt W.D. et al. Human leucocyte antigen class I in hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer: association with response and survival after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2019;21(1):142. DOI: 10.1186/s13058-019-1231-z
- Webb E.S., Liu P., Baleeiro R. et al. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. *J Biomed Res* 2018;32(5):317–26. DOI: 10.7555/JBR.31.20160168
- Kametani Y., Ohno Y., Ohshima S. et al. Humanized mice as an effective evaluation system for peptide vaccines and immune checkpoint inhibitors. *Int J Mol Sci* 2019;20(24):6337. DOI: 10.3390/ijms20246337
- Ashizawa T., Iizuka A., Nonomura C. et al. Antitumor effect of programmed death-1 (PD-1) blockade in humanized the NOG-MHC double knockout mouse. *Clin Cancer Res* 2017;23(1):149–58. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0122
- Gettinger S., Choi J., Hastings K. et al. Impaired HLA class I antigen processing and presentation as a mechanism of acquired resistance to immune checkpoint inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov* 2017;7(12):1420–35. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0593
- Rodig S.J., Gusenleitner D., Jackson D.G. et al. MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma. *Sci Transl Med* 2018;10(450):eaar3342. DOI: 10.1126/scitranslmed.aar3342
- Енгай Д.А., Поддубная И.В., Тупицын Н.Н., Мечетнер Е.В. Клинико-иммунологическое значение экспрессии MDR1/PGP 170 при раке молочной железы. *Опухоли репродуктивной системы* 2008;3:41–3.
- Yengay D.A., Poddubnaya I.V., Tupitsyn N.N., Mechetner E.B. Clinical and immunological significance of MDR1/PGP 170 in breast cancer. *Опухоли женской репродуктивной системы = Tumors of female reproductive system* 2008;3:41–3. (In Russ.).
- Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования опухолевых клеток в диагностике и прогнозе рака молочной железы. *Иммунология гемопоэза* 2009;6(1):8–52.
- Artamonova E.V. The role of tumor cell immunophenotyping in the diagnosis and prognosis of breast cancer. *Immunologiya gemopoeza = Immunology of hematopoiesis* 2009;6(1):8–52. (In Russ.).
- Субботина А.В., Лetyagin В.П., Тупицын Н.Н. и др. Роль иммунофенотипирования рака молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии. *Иммунология гемопоэза* 2009;6(1):52–79.
- Subbotina A.V., Letyagin V.P., Tupitsyn N.N. et al. The role of breast cancer immunophenotyping in the process of neoadjuvant chemotherapy. *Immunologiya gemopoeza = Immunology of hematopoiesis* 2009;6(1):52–79. (In Russ.).
- Буров Д.А., Безнос О.А., Воротников И.К. и др. Клиническое значение экспрессии молекул гистосовместимости на клетках рака молочной железы. *Иммунология гемопоэза* 2016;14(2):33–53.
- Burov D.A., Beznos O.A., Vorotnikov I.K. et al. Clinical significance of histocompatibility molecules expression in breast cancer cells. *Immunologiya gemopoeza = Immunology of hematopoiesis* 2016;14(2):33–53. (In Russ.).
- Рябчиков Д.А., Безнос О.А., Дудина И.А. и др. Диссеминированные опухолевые клетки у пациентов с люминальным раком молочной железы. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(1):53–7. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57
- Ryabchikov D.A., Beznos O.A., Dudina I.A. et al. Disseminated tumor cells in patients with luminal breast cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(1):53–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57
- Cardoso F., Spence D., Mertz S. et al. Global analysis of advanced/metastatic breast cancer: decade report (2005–2015). *Breast* 2018;39:131–8. DOI: 10.1016/j.breast.2018.03.002
- Park I.A., Hwang S.-H., Song I.H. et al. Expression of the MHC class II in triple-negative breast cancer is associated with tumor-infiltrating lymphocytes and interferon signaling. *PLoS One* 2017;12(8):e0182786. DOI: 10.1371/journal.pone.0182786
- Axelrod M.L., Cook R.S., Johnson D.B., Balko J.M. Biological consequences of MHC-II expression by tumor cells in cancer. *Clin Cancer Res* 2019;25(8):2392–402. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3200

Вклад авторов

С.В. Чулкова: анализ данных, написание текста рукописи, перевод на английский язык, перевод англоязычных научных источников, оформление рукописи;

Е.Н. Шолохова: получение и анализ данных;

И.В. Поддубная, И.С. Стилиди: анализ рукописи;

Н.Н. Тупицын: разработка дизайна исследования, анализ данных, анализ рукописи.

Authors' contributions

S.V. Chulkova: data analysis, manuscript writing, translation into English, translation of English-language scientific sources, design of the manuscript;

E.N. Sholokhova: data acquisition and analysis;

I.V. Poddubnaya, I.S. Stilidi: analysis of the manuscript;

N.N. Tupitsyn: research design, data analysis, manuscript analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

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

Е.Н. Шолохова / E.N. Sholokhova: <https://orcid.org/0000-0002-1456-1904>

И.В. Поддубная / I.V. Poddubnaya: <https://orcid.org/0000-0002-0995-1801>

И.С. Стилиди / I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>

Н.Н. Тупицын / <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All the patients signed informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 29.03.2022. Принята к публикации: 16.05.2022.

Article submitted: 29.03.2022. Accepted for publication: 16.05.2022.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-2-67-72>

Влияние поздних лучевых осложнений на качество жизни и отдаленную выживаемость пациентов, получавших облучение органов малого таза

О. В. Корытов

ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А. М. Гранова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 70

Контакты: Олег Витальевич Корытов olegkorytov@mail.ru

Введение. Лучевая терапия – один из основных способов лечения местно-распространенного рака прямой кишки, шейки матки и предстательной железы. Вследствие подведения высоких суммарных доз у пациентов возникают лучевые повреждения.

Цель исследования – определение частоты поздних лучевых повреждений, их влияния на общую выживаемость и качество жизни больных.

Материалы и методы. В исследование были включены 759 больных в возрасте 27–88 лет (324 мужчины и 435 женщин), получавших лечение в лечебных учреждениях Санкт-Петербурга и Ленинградской области; из них с диагнозом рака прямой кишки – 257 человек, рака шейки матки – 327, рака предстательной железы – 175. Облучение проводилось на линейных ускорителях и брахитерапевтических аппаратах. Качество жизни пациентов оценивали по опросным листам на основе опросного листа QLQ-30.

Результаты. По результатам исследования, общая токсичность составила 35,01 % у больных раком шейки матки, 10,4 % у больных раком прямой кишки и 7,6 % у больных раком предстательной железы. Общая 5- и 10-летняя выживаемость у пациентов с поздними осложнениями составила соответственно 46,3 и 16,5 % против 66,5 и 33,4 % у пациентов без поздних осложнений ($p = 0,001$). У пациентов с диагнозом рака прямой кишки качество жизни было достоверно выше, чем в других группах ($p < 0,05$). Через 3–5 нед после окончания лучевой терапии больные сообщали о существенном ухудшении качества жизни.

Заключение. Поздние лучевые повреждения являются важным прогностическим фактором, влияющим на отдаленную выживаемость больных с диагнозами рака прямой кишки, шейки матки и предстательной железы. Доказано снижение качества жизни у пациентов, получавших облучение органов малого таза, через 3–5 нед после окончания лучевой терапии.

Ключевые слова: лучевая терапия, поздние лучевые осложнения, рак прямой кишки, рак шейки матки, рак предстательной железы

Для цитирования: Корытов О. В. Влияние поздних лучевых осложнений на качество жизни и отдаленную выживаемость пациентов, получавших облучение органов малого таза. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(2):67–72. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-67-72

Influence of late radiation complications on long-term survival of patients treated with irradiation of the pelvic organs

Oleg V. Korytov

Academician A. M. Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, Ministry of Health of Russia; 70 Leningradskaya St., Settlement Peschanyy, Saint Petersburg, Russia

Contacts: Oleg Vitallyevich Korytov olegkorytov@mail.ru

Background. Radiation therapy is one of the main treatments for locally advanced cancers of the rectum, cervix, and prostate. As a result of summing up high total doses, radiation damage occurs in patients.

Aim. To determine the frequency of late radiation injuries in patients, their impact on overall survival and quality of life.

Materials and methods. The study included 759 patients who received treatment in medical facilities in St. Petersburg and the Leningrad Region, of which 324 were men and 435 were women aged 27–88 years, with a diagnosis of rectal cancer – 257, cervical cancer – 327, prostate cancer – 175 patients. Irradiation was carried out on linear accelerators and brachytherapy devices. The quality of life of patients was assessed by questionnaires based on QLQ-30.

Results. The overall toxicity was 35.01 % in patients with cervical cancer, 10.4 % in patients with rectal cancer and 7.6 % in patients with prostate cancer. Overall long-term 5 and 10 years survival in patients with late complications was 46.3 and 16.5 % versus 66.5 and 33.4 % in patients without late complications ($p = 0.001$). In patients diagnosed with rectal cancer, it was significantly higher than in other groups ($p < 0.05$). 3–5 weeks after the end of radiation therapy, patients reported a significant deterioration in the quality of life.

Conclusion. Late radiation damage is an important prognostic factor influencing long-term survival in patients diagnosed with cancer of the rectum, cervix and prostate. A decrease in the quality of life in patients who received irradiation of the pelvic organs 3–5 weeks after the end of radiation therapy has been proven.

Keywords: radiation therapy, late complications of radiation therapy, rectal cancer, cervical cancer, prostate cancer

For citation: Korytov O.V. Influence of late radiation complications on long-term survival of patients treated with irradiation of the pelvic organs. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2022;21(2): 67–72. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-67-72

Введение

Лучевая терапия за последние 100 лет заняла одно из ведущих мест в лечении онкологических больных. В настоящее время показатели отдаленной выживаемости пациентов, страдающих от основных злокачественных новообразований, улучшаются медленно, несмотря на значительные затраты на совершенствование аппаратуры и внедрение новых технологий. Заболеваемость злокачественными новообразованиями органов малого таза составляет: рак прямой кишки (РПК) – 4,1 %, рак шейки матки (РШМ) – 5,1 %, рак предстательной железы (РПЖ) – 17,8 % от общего количества заболевших [1]. В лучевой терапии в качестве первичного лечения или этапа в комбинированном лечении нуждаются более 40 % пациентов [2, 3]. При этом лучевые реакции и поздние осложнения остаются важными факторами, требующими подробного изучения.

Цель исследования – определение частоты поздних лучевых повреждений, изучение их влияния на отдаленную общую выживаемость и качество жизни больных РШМ, РПК и РПЖ.

Материалы и методы

В исследование были включены 759 пациентов с диагнозами РПК, РШМ, РПЖ, получавших лучевую терапию на органы малого таза в четырех медицинских учреждениях Санкт-Петербурга и Ленинградской области. С целью регистрации информации была создана база данных с помощью программы MS Excel 2009. Методы и методология исследования основаны на анализе базы данных пациентов, включенных в исследование. Статистическая обработка данных проводилась при помощи программы Statistica 10. Отдаленные результаты оценивались с по-

мощью критерия «выживаемость» по методу Каплана–Майера. В качестве порогового значения уровня значимости статистических критериев принято $p < 0,05$ (вероятность нулевой гипотезы меньше 95 %).

Из 759 пациентов, включенных в исследование, было 324 мужчины и 435 женщин. Возраст пациентов варьировал от 27 до 88 лет. По локализации опухоли пациенты распределились следующим образом: РПК – 257, РШМ – 327, РПЖ – 175. Местно-распространенный рак стадии Т3–4 у пациентов с РПК составил 96,49 % случаев, с РШМ – 34,31 %, с РПЖ – 62,56 %.

Дистанционную лучевую терапию получили 256 (99,61 %) пациентов с диагнозом РПК, 123 (37,85 %) пациента с диагнозом РШМ и 175 (100 %) пациентов с диагнозом РПЖ. Сочетанную лучевую терапию получил 1 (0,39 %) пациент с РПК и 202 (62,15 %) пациентки с РШМ. Облучение проводилось на линейных ускорителях с энергией фотонов 5 и 6 МэВ, брахитерапевтический компонент – на аппаратах VEBIG MultiSource.

Облучение осуществлялось фиксированными разовыми дозами: 2 Гр – 387 пациентов, 3 Гр – 16, 5 Гр – 27, другие дозы – 9. Остальные пациенты получали динамическое фракционирование: больные с диагнозом РПК – 4 фракции по 4 Гр, 5 фракций по 3 Гр, 7 фракций по 2 Гр; больные с диагнозом РПЖ – 16 фракций по 2,5 Гр (локорегионарный этап), 6 фракций по 3 Гр (локальный этап).

Поздние осложнения лучевой терапии диагностированы у 128 из 759 пациентов в период от 4 до 42 мес (медиана 7 мес).

Качество жизни пациентов в процессе лучевой терапии и после ее окончания оценивалось по данным еженедельных опросных листов и опросов (для

исключения aberrаций памяти пациенты еженедельно заполняли опросные листы в процессе лечения). Оценка результатов проводилась по 10-балльной шкале на основе модифицированного опросного листа QLQ-30 (Cancer Quality of Life Questionnaire Core 30, опросник для оценки качества жизни онкологических больных).

Качество жизни пациентов через 1 год и более после окончания лучевой терапии оценивали по таким же опросным листам.

Результаты

Общая поздняя токсичность оказалась наибольшей у пациентов с диагнозом РШМ – 35,01 %, у больных с диагнозом РПК и РПЖ варьировала в пределах 8–10 %. Это объяснимо с точки зрения применявшихся суммарных очаговых доз (СОД): у больных с диагнозом РПК – 50 Гр; при диагнозе РШМ СОД доводилась до 80 Гр с использованием дистанционного и брахитерапевтического компонента; при диагнозе РПЖ применялась только дистанционная лучевая терапия до СОД 75 Гр. Из числа поздних осложнений чаще диагностировали доставлявшие наибольший дискомфорт радиоиндуцированный цистит – 14,5 %, радиоиндуцированный проктит – 12,3 %, фиброз тазовой клетчатки – 7,6 % (см. таблицу).

Частота поздних лучевых осложнений, %
Frequency of late complications of radiation therapy, %

Осложнение Complication	Рак прямой кишки Colon cancer	Рак шейки матки Cervical cancer	Рак предстательной железы Prostate cancer
Цистит Cystitis	2,3	9,8	3,4
Проктит Proctitis	0	8,9	2,9
Атония мочевого пузыря Atony of the bladder	4,6	0,31	0,3
Фиброз тазовой клетчатки Pelvic fibrosis	0	7	0,6
Свищи и язвы Fistulas and ulcers	0,8	0,3	0
Прочие Other	4,7	11,7	0,4

Анализ возможного влияния поздних лучевых повреждений на отдаленную общую выживаемость продемонстрировал достоверное отличие 5- и 10-летней общей выживаемости.

Наблюдение за 759 пациентами в течение 10 лет показало, что общая 5- и 10-летняя выживаемость

пациентов, у которых диагностированы поздние лучевые осложнения, составила соответственно 46,3 и 16,5 % против 66,5 и 33,4 % у пациентов, завершивших лучевую терапию без поздних осложнений ($p = 0,001$) (рис. 1).

При диагнозе РПК 5-летняя выживаемость больных с поздними осложнениями составила 81,7 % против 79,9 % без осложнений, 10-летняя выживаемость – соответственно 71,5 % против 67,8 % ($p = 0,67$) (рис. 2).

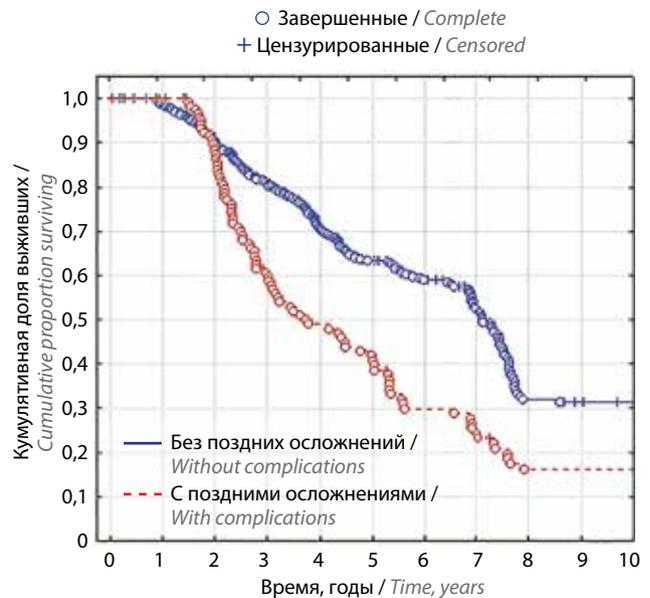


Рис. 1. Общая выживаемость пациентов с учетом наличия поздних лучевых осложнений

Fig. 1. Overall survival of patients depending on late complications presence

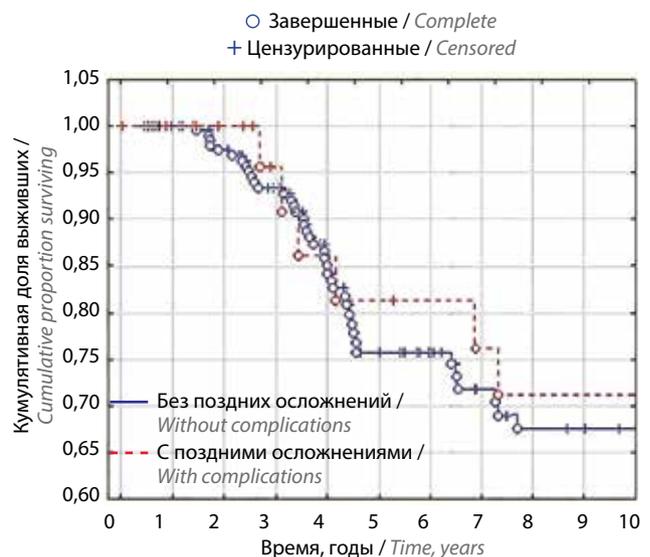


Рис. 2. Общая выживаемость пациентов с раком прямой кишки с учетом наличия поздних осложнений

Fig. 2. Overall survival of rectal cancer patients depending on late complications presence

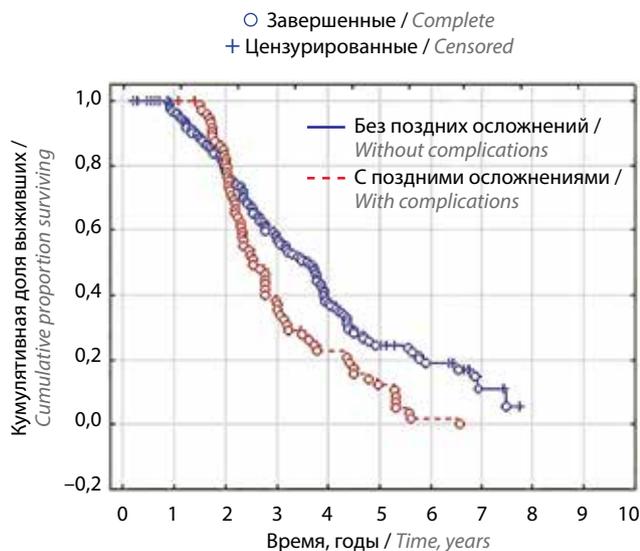


Рис. 3. Общая выживаемость пациентов с раком шейки матки с учетом наличия поздних осложнений

Fig. 3. Overall survival of cervical cancer patients depending on late complications presence

Пятилетняя общая выживаемость пациентов с РШМ с поздними осложнениями составила 27,8 % против 50,8 % без осложнений, 8-летняя выживаемость – соответственно 0 % против 6,5 % ($p = 0,06$) (рис. 3).

Пятилетняя общая выживаемость пациентов с РПЖ с поздними осложнениями составила 95 % против 95,3 % без осложнений, 9-летняя выживаемость – 0 % против 8,5 % ($p = 0,008$) (рис. 4).

По результатам анализа заполненных опросных листов выяснилось, что надиром в качестве жизни наибольшее число пациентов обозначили 3–4-ю неделю лучевой терапии, когда накопленная СОД уже приводила к появлению реакций, но эффект от лечения еще не проявлялся.

Пациенты с диагнозом РПК оценивали качество жизни в процессе лучевой терапии достоверно выше, чем пациенты с диагнозами РШМ и РПЖ ($p < 0,05$). Средняя оценка для РПК составила 8,5 балла, для РШМ – 7,7 балла, а для РПЖ – 7,6 балла. Через 3–5 нед после окончания лучевой терапии больные указывали на существенное снижение качества жизни.

Анализ результатов опросов пациентов, проведенных через 1 год и более, показал, что только у больных с диагнозом РШМ качество жизни не сравнялось с начальным уровнем, его оценка составила 8,05 балла, тогда как у больных РПК – 8,41 балла, РПЖ – 8,8 балла ($p < 0,05$).

Обсуждение

Анализ полученных данных показал, что у пациентов с диагнозами РПК, РШМ, РПЖ, получавших

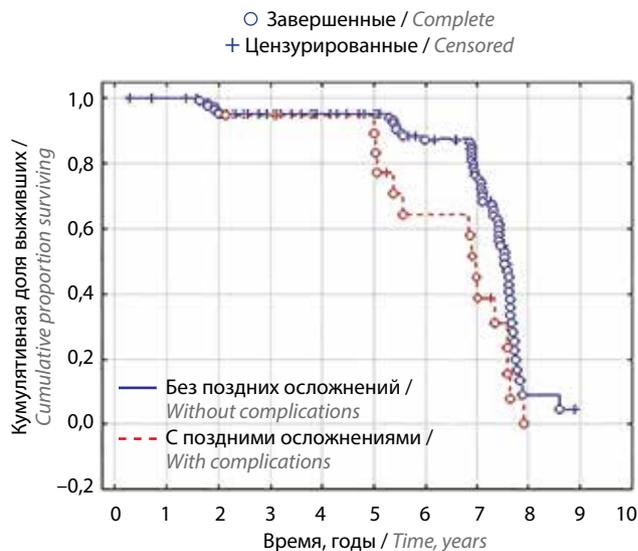


Рис. 4. Общая выживаемость пациентов с раком предстательной железы с учетом наличия поздних осложнений

Fig. 4. Overall survival of prostate cancer patients depending on late complications presence

лучевую терапию органов малого таза, поздние лучевые осложнения – важный предиктивный фактор, влияющий на отдаленную выживаемость. Большинство публикаций по данной теме описывают частоту лучевых поражений, являющихся следствием 3D-конформной лучевой терапии либо иных методик лучевой терапии в сравнении с ней [4–6].

В нашем исследовании наблюдались преимущественно поздние осложнения I–II степени, редко – III степени. Более тяжелые осложнения составили незначительную часть.

Сравнение эффектов конвенционального облучения с иными технологиями предпринимается для достижения лучших показателей общей и безрецидивной выживаемости, однако эффективность лечения злокачественных новообразований основных локализаций повысилась незначительно, затраты на совершенствование методик лечения опухолей растут непропорционально приросту выживаемости, при этом сократить количество побочных эффектов не удастся, а в некоторых случаях их частота растет [7–11].

Высказывается мнение, что современные методы лечения злокачественных новообразований достигли границ своих возможностей по контролю опухоли, а их токсичность продолжает нарастать. Следует также учитывать, что число пациентов, переживших лечение, с каждым годом увеличивается и уже превышает число страдающих от многих широко исследуемых неонкологических заболеваний [12–14].

Качество жизни пациентов с диагнозами РПК, РШМ, РПЖ, получавших лучевую терапию, достоверно

ухудшается через 3–4 нед после окончания лечения, и только через год и более, по результатам опросов пациентов, у больных РПК и РПЖ восстанавливается, а у больных РШМ приближается к исходному уровню, но не достигает его. Полученные нами данные в основном совпадают с результатами других авторов [15, 16]. Несмотря на незначительную долю поздних повреждений IV степени, для пациентов с данной патологией ее наличие приводило к мучительным последствиям, инвалидизации и катастрофическому снижению качества жизни [17–19].

Заключение

Таким образом, поздние лучевые повреждения являются важным фактором, снижающим отдаленную выживаемость, наряду с общеизвестными – стадией, своевременным началом лечения и т. д.

Качество жизни пациентов с диагнозами РПК, РШМ и РПЖ, получавших лучевую терапию на область малого таза, существенно снижается к 3–5-й неделе после окончания лучевой терапии. Улучшения качества жизни следует ожидать по истечении 1 года и более, при этом оно может полностью не восстановиться.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020. 239 с. State of oncological care to the population of Russia in 2019. Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starchinskiy, A.O. Shakhzadova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2020. 239 p. (In Russ.).
2. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394–424. DOI: 10.3322/caac.21492
3. Huh J.W., Tanksley J., Chino J. et al. Long-term consequences of pelvic irradiation: toxicities, challenges, and therapeutic opportunities with pharmacologic mitigators. *Clin Cancer Res* 2020;26(13):3079–90. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-2744
4. Исаев И.Г., Гулиев Ф.А., Акперов К.С., Алиева Н.Р. Анализ частоты осложнений лучевой терапии у пациентов с раком предстательной железы. *Казанский медицинский журнал* 2017;98(5):680–6. DOI: 10.17750/KMJ2017-680
Isaev I.G., Guliev F.A., Akperov K.S., Alieva N.R. Analysis of the frequency of complications of radiation therapy in patients with prostate cancer. *Kazanskiy medicinskiy zhurnal = Kazan medical journal* 2017;98(5):680–6. (In Russ.). DOI: 10.17750/KMJ2017-680
5. Lin Y., Chen K., Lu Z. et al. Intensity-modulated radiation therapy for definitive treatment of cervical cancer: a meta-analysis. *Radiat Oncol* 2018;13(1):177. DOI: 10.1186/s13014-018-1126-7
6. Oscarsson N., Müller B., Rosén A. et al. Radiation-induced cystitis treated with hyperbaric oxygen therapy (RICH-ART): a randomised, controlled, phase 2–3 trial. *Lancet Oncol* 2019;20(11):1602–14. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30494-2
7. Жаринов Г.М., Некласова Н.Ю. Дистанционная лучевая терапия – история, достижения, перспективы. *Практическая онкология* 2016;17(1):41–52.
Zharinov G.M., Neklasova N.Yu. Remote radiotherapy – history, achievements, prospects. *Prakticheskaya onkologiya = Practical oncology* 2016;17(1):41–52. (In Russ.).
8. Рак прямой кишки и анального канала. Перспективы комбинированного лечения. Руководство для врачей. Под ред. Ю.А. Барсукова. М.: Специальное издательство медицинских книг, 2019. 860 с.
Cancer of the rectum and anal canal. Prospects of combined treatment. A guide for doctors. Ed. by Yu.A. Barsukov Moscow: Special'noe izdatel'stvo meditsinskih knig, 2019. 860 p. (In Russ.).
9. Aluwini S., Pos F., Schimmel E. et al. Hypofractionated versus conventionally fractionated radiotherapy for patients with prostate cancer (HYPRO): late toxicity results from a randomised, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016;17(4):464–74. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00567-7
10. Jin J., Tang Y., Hu C. et al. Multicenter, randomized, phase III trial of short-term radiotherapy plus chemotherapy versus long-term chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer (STELLAR). *J Clin Oncol* 2022;40(15):1681–92. DOI: 10.1200/JCO.21.01667
11. Lawrie T.A., Green J.T., Beresford M. et al. Interventions to reduce acute and late adverse gastrointestinal effects of pelvic radiotherapy for primary pelvic cancers. *Cochrane Database Syst Rev* 2018;1(1):CD012529. DOI: 10.1002/14651858.CD012529.pub2
12. Wang W., Zhang F., Hu K. et al. Image-guided, intensity-modulated radiation therapy in definitive radiotherapy for 1433 patients with cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2018;151:444–8.
13. Pan H.Y., Jiang J., Hoffman K.E. et al. Comparative toxicities and cost of intensity-modulated radiotherapy, proton radiation, and stereotactic body radiotherapy among younger men with prostate cancer. *J Clin Oncol* 2018;36(18):1823–30. DOI: 10.1200/JCO.2017.75.5371
14. Parry M.G., Nossiter J., Cowling T.E. et al. Toxicity of pelvic lymph node irradiation with intensity modulated radiation therapy for high-risk and locally advanced prostate cancer: a national population-based study using patient-reported outcomes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2020;108(5):1196–1203. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2020.07.031
15. Yuan Y., You J., Wang W., Li X. Long-term follow-up of volumetric modulated arc therapy in definitive radiotherapy for cervical cancer: A single-center retrospective experience. *Radiation Medicine and Protection* 2020;1(2):81–7. DOI: 10.1016/j.radmp.2020.04.002
16. Zelga P., Tchórzewski M., Zelga M. et al. Radiation-induced rectovaginal fistulas in locally advanced gynaecological malignancies-new patients, old problem? *Langenbecks Arch Surg* 2017;402(7):1079–88. DOI: 10.1007/s00423-016-1539-4
17. Васильев Л.А., Костюк И.П., Иванов С.А., Каприн А.Д. Современная классификация постлучевых свищей органов малого таза. *Онкоурология* 2019;15(2):118–23. DOI: 10.17650/1726-9776-2019-15-2-118-123
Vasiliev L.A., Kostyuk I.P., Ivanov S.A., Kaprin A.D. Modern classification of post-radial fistulas of the pelvic organs. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2019;15(2):118–23. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2019-15-2-118-123
18. Ma J.L., Hennessey D.B., Newell B.P. et al. Radiotherapy-related complications presenting to a urology department: a more common problem than previously thought? *BJU Int* 2018;121(Suppl 3):28–32. DOI: 10.1111/bju.14145
19. Abramowitz D.J., Warner J.N. Clinical management of radiation cystitis: a narrative review. *AME Med J* 2021;6:8. DOI: 10.21037/amj-20-169

ORCID автора / ORCID of author

О.В. Корытов / O.V. Korytov: <https://orcid.org/0000-0002-7472-9676>

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The author declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено без спонсорской поддержки.
Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Compliance with patient rights and principles of bioethics. All the patients signed informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 29.04.2022. Принята к публикации: 16.05.2022.
Article submitted: 29.04.2022. Accepted for publication: 16.05.2022.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-2-73-81>

Особенности активности ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы в солидных опухолях

Е.М. Бакурова¹, И.В. Василенко¹, Ю.Д. Турсунова¹, Н.М. Добаева², Б.Г. Борзенко¹, В.Н. Ельский¹

¹ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького»; 83003 Донецк, пр-кт Ильича, 16;
²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет»; Россия, 344022 Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

Контакты: Елена Михайловна Бакурова 32023@mail.ru

Введение. Сольдные опухоли, формируя агрессивный фенотип, приобретают способность к инвазии и метастазированию, устойчивость к апоптозу. При этом их пролиферативная активность снижается, активируется ангиогенез. Роль триггерных молекул этих процессов могут играть тканевые метаболиты – 2-дезоксид-Д-рибоза и ее фосфорилированная форма (2-д-Д-Риб-1-Ф), а также пероксид водорода (H_2O_2).

Цель исследования – изучить особенности активности ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы в эпителиальных опухолях различной локализации.

Материалы и методы. Спектрофотометрически в гомогенатах опухолей были исследованы особенности активности ферментов метаболизма нуклеозидов (тимидинфосфорилазы, аденозиндезаминазы) и ферментов антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). Параллельно проводили сравнительное морфологическое исследование тканей опухолей, иммуногистохимически определяли особенности экспрессии эпителиальных и мезенхимальных маркеров, маркера эндотелиоцитов.

Результаты. В карциномах немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), в солидных опухолях желудка и кишечника (аденокарциномах желудка и кишечника, далее – КЖК) установлено повышение активности тимидинфосфорилазы в среднем в 1,8 раза ($p = 0,002$) и аденозиндезаминазы (для НМРЛ в 1,7 раза, для КЖК в 1,9 раза; $p = 0,001$). Достоверных изменений активности СОД в опухолях не выявлено. Активность ГПО имела тенденцию к снижению в среднем в 1,3 раза ($p = 0,01$ для НМРЛ, $p = 0,02$ для КЖК). Кластерный анализ особенностей ферментативной активности исследуемых опухолей выявил ее неоднородность. На основании его результатов в каждой локализации были выделены по 2 кластера (или подгруппы). Во 2-х подгруппах НМРЛ и КЖК активность СОД в опухолях была выше, чем в контроле. При этом повышения активности ГПО в них не установлено. В этих же подгруппах наблюдалась тенденция к максимальному повышению фосфорилазной активности тимидинфосфорилазы ($p = 0,045$ для НМРЛ, $p = 0,049$ для КЖК). Следовательно, в опухолях НМРЛ и КЖК, выделенных во 2-е подгруппы, как H_2O_2 , так и 2-д-Д-Риб-1-Ф могли формироваться более интенсивно. Важно отметить, что именно в этих подгруппах чаще выявляли морфологические признаки опухолевой агрессии (снижение или утрату экспрессии маркера клеточно-клеточной адгезии, экспрессию мезенхимальных маркеров, активный ангиогенез).

Заключение. Эпителиальные опухоли изученных локализаций с индивидуальной высокой активностью тимидинфосфорилазы и СОД, и низкой активностью ГПО способны продуцировать как 2-д-Д-Риб-1-Ф, так и H_2O_2 . Это способствует кумулированию их эффектов по общим сигнальным путям, участвующим в опухолевой прогрессии.

Ключевые слова: тимидинфосфорилаза, аденозиндезаминаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза, карцинома

Для цитирования: Бакурова Е.М., Василенко И.В., Турсунова Ю.Д. и др. Особенности активности ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы в солидных опухолях. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(2):73–81. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-73-81

The features of enzymes activity to nucleoside and antioxidant systems in solid tumors

Elena M. Bakurova¹, Inna V. Vasilenko¹, Yulia D. Tursunova¹, Natalya M. Dobaeva², Berta G. Borzenko¹, Viktor N. Yelsky¹

¹M. Gorky Donetsk National Medical University; 16 Ilyicha Ave., Donetsk 83003;

²Rostov State Medical University; 29 Nakhichevan Lane, Rostov-on-Don 344022, Russia

Contacts: Elena Mikhailovna Bakurova 32023@mail.ru

Background. Solid tumors can create their aggressive properties. There are characterized by the invasion and metastatic activity, the resistance of the tumor clone to apoptosis. These pathways triggering may be realized both by 2-deoxy-D-ribose and its phosphorylated form (2-d-D-Rib-1-P), and by hydrogen peroxide.

Aim. To investigate the peculiarities of enzymes activity to nucleoside metabolism and antioxidant system in epithelial tumors of different localization.

Materials and methods. The features of the thymidine phosphorylase, adenosine deaminase, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPO) activity were studied in tumor homogenates. The visually no transformed tissues of the surgical resection edges were used as a control. Enzymes activity was determined by spectrophotometrical and morphological features were examined by the immunohistochemical methods in tissues of non-small cell lung cancer (NSCLC), samples of gastric and colon carcinomas (GCC).

Results. Thymidine phosphorylase activity and adenosine deaminase activity in various malignant tumors were increased in comparison to the control. Respectively, thymidine phosphorylase activity was higher than by 1.8 times ($p = 0.002$ for NSCLC, $p = 0.001$ for GCC). An increase of adenosine deaminase activity was revealed both in tissues of NSCLC (more than 1.7 times) and in GCC (by 1.9 times, $p = 0.001$). No significant changes in SOD activity were detected in the tumors. GPO activity tended to decrease by an average of 1.3 times ($p = 0.01$ for NSCLC, $p = 0.02$ for GCC). A cluster analysis of the enzymatic activity features of the studied NSCLC tumors, as well as GCC, revealed their metabolic heterogeneity. According to its results, tumors of different localization were distinguished into 2 clusters. Common feature to their second clusters was an increase the SOD activity. It was accompanied by increase of thymidine phosphorylase activity ($p = 0.045$ for NSCLC, $p = 0.049$ for GCC). Therefore, both hydrogen peroxide and 2-d-D-Rib-1-P could be formed in them more intensively. It is important to note that morphological indicators of tumor aggression (decreased or lost expression of cell-cell adhesion marker, expression of mesenchymal markers, active angiogenesis) were detected more frequently in these subgroups.

Conclusion. The obtained results reveal that individual features of the enzymes activity in epithelial tumors may be available source of 2-d-D-Rib-1-P and hydrogen peroxide generation in human cancer cells. In the case of individual higher tumor activity of thymidine phosphorylase and SOD and low GPO activity the metabolic stimulation of tumor progression may be occur.

Keywords: thymidine phosphorylase, adenosine deaminase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, tumor

For citation: Bakurova E.M., Vasilenko I.V., Tursunova Yu.D. et al. The features of enzymes activity to nucleoside and antioxidant systems in solid tumors. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(2):73–81. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-73-81

Введение

Индивидуальные химио- и радиочувствительность опухоли зависят от ее структурных особенностей. Карциномы различных локализаций могут приобретать агрессивные свойства, вырабатывая резистентность к апоптозу, усиливая ангиогенез, увеличивая подвижность и миграционную активность опухолевых клеток [1]. Эти свойства во многом связаны с реализацией опухолью эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [1, 2]. Стоит отметить, что в его инициации могут участвовать активные формы кислорода (АФК) [3]. Так, пероксид водорода (H_2O_2) и супероксид анион (O_2^-) стимулируют главные компоненты неоваскулогенеза – прогениторные эндотелиальные клетки [4]. АФК способны активировать ряд онкогенов, участвовать в трансдукции их сигналов, связанных с пролиферацией, выживаемостью, инвазивностью [3, 5]. Они играют важную роль не только в инициации и промоции опухолевого роста, но и в его прогрессии [5].

Известно, что продукцию АФК могут обеспечить эндогенные метаболиты [5], в том числе 2-де-

зоксид-D-рибоза и ее фосфорилированная форма [6, 7]. Причем она и сама обладает рядом проангиогенных эффектов [4, 8]. Эта альдопентоза образуется в результате катаболизма нуклеозидов, например при деградации дезокситимидина и дезоксиаденозина, запускаемой тимидинфосфорилазой (ТФ) и аденозиндеаминазой (АДА) [9, 10]. В настоящее время ТФ идентифицирована как ангиогенный фактор (platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF). Также она имеет антиапоптозные и пропролиферативные эффекты [8, 9]. ТФ реализует их за счет своей ферментативной активности. Различают 2 вида активности ТФ. Установлено, что *in vivo* она продуцирует дезокситимидин, преимущественно за счет своей альтернативной трансферазной активности (условно – ТФ анаболическая, ТФан) [9, 11]. В обратной фосфорилазной реакции *in vivo* фермент обеспечивает именно катаболизм дезоксинуклеозида до тимина и 2-дезоксид-D-рибозо-1-фосфата (2-d-D-Риб-1-Ф). Мы условно обозначили эту активность как катаболическую (ТФк). Формирующаяся затем 2-дезоксид-D-рибоза (2-d-D-Риб) реализует эффекты ТФ,

активируя интегриновый сигнальный путь p70/s6 киназы. Интересно, что H_2O_2 и 2-д-Д-Риб могут стимулировать одинаковые факторы транскрипции, например ядерный фактор каппа В (nuclear factor kappa B, NF- κ B), отвечающие за устойчивость клетки к апоптозу, запускающие процессы ангиогенеза [4, 6].

Наряду с ферментами обмена нуклеозидов нами изучались особенности активности супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). Они непосредственно участвуют в инактивации $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 [5, 7, 12].

Цель исследования – сравнительное изучение активности ферментов метаболизма нуклеозидов и ферментов антиоксидантной системы в опухолях эпителиального гистогенеза различной локализации.

Данный подход поможет исследовать взаимосвязи между усилением прооксидантных процессов и продукцией 2-д-Д-Риб-1-Ф, опосредующих опухолевую прогрессию.

Материалы и методы

Нами исследованы 25 случаев немелкоклеточного рака легких (НМРЛ). По уровню инвазии (классификации TNM) опухоли соответствовали стадиям T2N0–2M0 и T3N0–2M0. По гистологическому строению это были 13 случаев плоскоклеточного рака, 10 аденокарцином, 2 случая нейроэндокринных опухолей. По степени дифференцировки (согласно классификации Всемирной организации здравоохранения, 1973) преобладали карциномы G₁ и G₂ степени.

Рак желудка изучен в 10 случаях, из них 8 – рак кишечного типа, 2 – смешанного типа; преимущественно T3N0–xM0 стадии, G₁ и G₂ степени дифференцировки. Рак кишечника изучен в 12 случаях, соответствовавших стадии T3N0–xM0.

Неoadьювантная терапия опухолей, включенных в исследование, не проводилась.

Группу больных с НМРЛ составили мужчины ($n = 19$) и женщины ($n = 6$) в возрасте от 54 до 73 лет (средний возраст – 62,6 года). Среди больных раком желудка и кишечника были мужчины ($n = 7$) и женщины ($n = 15$) в возрасте от 58 до 75 лет (средний возраст – 65,8 года).

Активность ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы изучали в сопоставлении с индивидуальным контролем в гомогенатах тканей НМРЛ, солидных опухолей желудка и кишечника (аденокарцином желудка и кишечника, далее – КЖК). В качестве контроля использовали визуально нетрансформированные ткани края резекции, удаленные от опухолевого узла не менее чем на 1 см [13].

Виды активности ТФ определяли спектрофотометрически при λ 300 и 267 нм по изменениям оптической плотности тимина (дезокситимидина) [11]. Активность АДА исследовали по снижению оптической

плотности аденозина при 265 нм [10]. Активность СОД регистрировали на 480 нм по торможению самопроизвольного окисления адреналина в щелочной среде [10]. За 1 условную единицу активности СОД принимали активность, замедляющую ее самоокисление в 2 раза. Активность ГПО оценивали по изменению содержания восстановленного глутатиона, определяя его конъюгаты с 2-нитро-5-тиобензоатом [10].

Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась с помощью лицензионных программ MedStat (Альфа) и Statistica 5.5 (StatSoft). Для проверки распределения на нормальность применялся критерий У-Шапиро–Уилка. Данные, не подчинявшиеся закону нормального распределения, представлены в виде медианы (Me) и интервала между 25-м и 75-м перцентилями (1-й и 3-й квартили (Q₁; Q₃)). Различия между 3 и более группами устанавливали с помощью критерия множественных сравнений Краскела–Уоллиса (H). Для сравнения 2 независимых выборок использовали U-критерий Манна–Уитни. Корреляционную взаимосвязь между признаками анализировали, рассчитывая ранговый коэффициент корреляции Спирмена (ρ).

Параллельно с биохимическими проводили сравнительное патоморфологическое исследование тканей опухолей по общепринятым методикам, включавшим фиксацию материала, окраску срезов гематоксилином и эозином. В этом же материале иммуногистохимически определяли ряд маркеров (эпителиальные (панцитокератин AE1/AE3, цитокератин 18), клеточно-клеточной адгезии (E-кадгерин)), а также регистрировали появление экспрессии мезенхимальных маркеров (виментина, α -актина гладких мышц) [2]. Особенности пролиферации клеток опухоли оценивали по уровням экспрессии Ki-67, интенсивность ангиогенеза – по экспрессии сосудистого маркера CD34 [2]. Использовали систему визуализации EnVision FLEX (Dako, Дания).

Результаты и обсуждение

Анализ особенностей ферментативной активности в нетрансформированных тканях края резекции (контрольные образцы) проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни (табл. 1). В образцах слизистой оболочки желудка при сравнении с образцами слизистой кишечника достоверных различий в активности изучаемых ферментов не выявлено. Далее объединили их в одну группу и сопоставили с особенностями обмена в легочной ткани. Установили, что в нетрансформированных тканях легкого активность ТФк в 1,3 раза ($p = 0,003$) и ГПО в 1,5 раза ($p = 0,003$) выше, чем в образцах слизистой желудка и кишечника.

При исследовании взаимосвязей ферментативной активности лишь для ТФан и АДА установлена прямая связь ($\rho = 0,340$; $p < 0,024$) как в образцах

Таблица 1. Активность ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы в образцах немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), карцином желудка и кишечника (КЖК) (нмоль/мин · мг), Me (Q₁; Q₃)

Table 1. The antioxidant system and nucleoside metabolism enzymes activity in samples of non-small cell lung cancer (NSCLC), of gastric or colon cancer (GCC) (nmol/min · mg), Me (Q₁; Q₃)

Локализация Localisation	ТФк TP		АДА ADA		СОД SOD		ГПО GPO	
	Контроль Control	Опухоль Tumor	Контроль Control	Опухоль Tumor	Контроль Control	Опухоль Tumor	Контроль Control	Опухоль Tumor
НМРЛ (n = 25) NSCLC (n = 25)	96,1 (78,9; 29,4)	171,1** (120,2; 211,9)	122,3 (103,2; 149,1)	202,3** (181,1; 231,1)	1,0 (0,8; 1,1)	0,9 (0,7; 1,4)	3,4 (2,3; 5,1)	2,9* (1,9; 4,2)
КЖК (n = 22) GCC (n = 22)	71,6 (62,7; 87,3)	130,1** (99,9; 145,1)	125,6 (107,4; 139,5)	234,4** (164,6; 276,2)	1,1 (0,9; 1,5)	1,3 (1,0; 1,7)	2,2 (1,6; 3,0)	1,6* (1,1; 2,1)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по сравнению с индивидуальным контролем.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ in comparison with individual control.

Примечание. ТФк – тимидинфосфорилаза (катаболическая); АДА – аденозиндеаминаза; СОД – супероксиддисмутаза; ГПО – глутатионпероксидаза.

Note. TP – thymidine phosphorylase; ADA – adenosine deaminase; SOD – superoxide dismutase; GPO – glutathione peroxidase.

слизистых желудка и кишечника, так и в нетрансформированной ткани легкого.

Предполагаем, что изучение особенностей активности ферментов в гомогенате опухоли (см. табл. 1) позволяет оценить суммарный вклад и стромальных компонентов, и самих клеток опухоли в формирование ее метаболитов. В частности, не только опухолевые клетки, но и макрофаги стромы, тромбоциты способны секретировать 2-д-Д-Риб-1-Ф, реализующий проангиогенные паракринные сигналы [4, 8, 9]. Лимфоциты и ассоциированные с опухолью макрофаги участвуют в формировании АФК [7]. Считают, что микроокружение опухоли играет эссенциальную роль как в инициации опухолевого роста, так и в его прогрессии, и в метастазировании [7].

Особенности ферментативной активности в гомогенатах опухолей сопоставляли с их активностью в нетрансформированной ткани края резекции, используя непараметрический Т-критерий Вилкоксона. Выявили, что для опухолей исследуемых локализаций было характерно нарастание активности ферментов обмена нуклеозидов. Так, активность ТФк в гомогенатах и НМРЛ, и КЖК была выше, чем в их индивидуальных контрольных образцах ($p = 0,002$ и $p = 0,001$ соответственно). При этом в гомогенатах НМРЛ она была выше, чем в КЖК ($U = 111,50$; $Z = 3,06$; $p = 0,002$). Наши результаты хорошо согласуются с данными S. Tabata и соавт. об активации катаболизма дезокситимидина в опухолях по сравнению со смежными нетрансформированными тканями [6]. На первый взгляд, это идет вразрез с традиционным мнением об активации синтеза дезокситимидилата по «запасному пути» при опухолевом росте [9]. Тем важнее одновременное исследование всех видов активности ТФ.

Помимо повышения «классической» фосфорилазной активности ТФ в тканях опухолей регистри-

ровали повышение и ее дезоксирибозилтрансферазной активности (так называемой ТФан) более чем в 1,5 раза ($p = 0,002$ и $p = 0,001$ для НМРЛ и КЖК соответственно). Следовательно, альтернативный ресинтез нуклеозида дезокситимидина, являющегося субстратом для тимидинкиназы – маркера пролиферации, создает предпосылки для активации «запасного пути» синтеза дезокситимидилата.

Также выявлено повышение активности ключевого фермента катаболизма аденозина. В тканях НМРЛ она превышала активность в контроле в 1,7 раза ($p = 0,001$), а в КЖК еще значительно – в 1,9 раза ($p = 0,001$). Такая активность АДА ведет к повышению уровней дезоксиинозина в опухоли. Это может способствовать его дальнейшему потреблению в качестве косубстрата ТФан, так как известно о роли дезокси-пуриноклеозидов для трансферазной активности ТФ [9]. Косвенно об этом свидетельствует установленная корреляция активности АДА и ТФан, более выраженная в опухолях по сравнению с контролем ($\rho = 0,704$; $p < 0,001$).

Можно предположить, что выявленное нами повышение видов активности ТФ (фосфорилазной и трансферазной) и АДА может быть универсальным свойством карцином исследуемых локализаций.

В отличие от ферментов обмена нуклеозидов, опухолевая активность ферментов антиоксидантной системы или не отличалась достоверно от контроля (СОД), или снижалась (ГПО). Последнее подтверждает выявленная отрицательная связь особенностей активности ГПО с патологией ($\rho = -0,465$; $p < 0,05$). Причем в КЖК активность ГПО была минимальной по сравнению с НМРЛ ($p = 0,002$). В результате рангового однофакторного анализа Краскела–Уоллиса и медианного теста (χ^2) выявили, что особенности активности ГПО и ТФк в опухолях специфичны

Таблица 2. Активность ферментов антиоксидантной системы и обмена нуклеозидов в образцах немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) согласно кластерному делению на подгруппы по особенностям активности СОД (нмоль/мин · мг), Me (Q_1 ; Q_3)

Table 2. The antioxidant system and nucleoside metabolism enzymes activity in samples of non-small cell lung cancer due to the cluster division into subgroups according to the features of SOD activity (nmol/min · mg), Me (Q_1 ; Q_3)

Фермент Enzyme	НМРЛ (1-я подгруппа) NSCLC (subgroup 1)			НМРЛ (2-я подгруппа) NSCLC (subgroup 2)		
	Контроль Control	Опухоль Tumor	<i>p</i>	Контроль Control	Опухоль Tumor	<i>p</i>
СОД SOD	0,8 (0,7; 0,9)	0,7 (0,6; 0,8)	0,01	1,1 (1,0; 1,4)	1,4 (1,2; 1,5)	0,07
ГПО GPO	5,1 (2,6; 5,9)	3,3 (2,1; 4,0)	0,01	3,0 (1,8; 4,0)	2,2 (1,5; 4,2)	0,29
ТФк TP	94,1 (68,0; 129,4)	160,0 (100,0; 177,1)	0,01	98,0 (78,9; 130,2)	209,8 (110,2; 286,3)	0,01
ТФан TPan	123,0 (95,2; 137,9)	199,5 (96,0; 228,4)	0,02	130,1 (106,7; 158,6)	254,3 (129,0; 341,1)	0,01
АДА ADA	116,3 (89,3; 139,5)	192,5 (153,5; 203,7)	0,01	142,3 (103,2; 165,8)	223,2 (199,1; 287,4)	0,01

Примечание. Здесь и в табл. 3: СОД – супероксиддисмутаза; ГПО – глутатионпероксидаза; ТФк – тимидинфосфорилаза (катаболическая); ТФан – тимидинфосфорилаза (анаболическая); АДА – аденозиндезаминаза.

Note. Here and in table 3: SOD – superoxide dismutase; GPO – glutathione peroxidase; TP – thymidine phosphorylase; TPan – thymidine phosphorylase (anabolic); ADA – adenosine deaminase.

и связаны с локализацией опухоли. Так, для активности ТФк получены значения критериев $H = 9,38$ ($p = 0,002$), $\chi^2 = 9,09$ ($p = 0,003$); для ГПО – $H = 9,31$ ($p = 0,003$), $\chi^2 = 9,09$ ($p = 0,002$). Согласно результатам анализа, для остальных ферментов особенности их активности в карциномах не были связаны с локализацией.

Важно отметить, что повышение активности ТФк на фоне низкой активности ГПО, выявленное в карциномах, может способствовать повышению уровней как 2-д-Д-Риб-1-Ф, так и H_2O_2 . К тому же известно, что 2-д-Д-Риб-1-Ф стимулирует генерацию АФК [4, 6, 7]. Это повышает вероятность активации клеточных программ, связанных с опухолевой прогрессией, запускаемых H_2O_2 и 2-д-Д-Риб-1-Ф [4, 6, 7].

Ранее нами было установлено, что опухоли одного патоморфологического типа и локализации неоднородны по видам активности ТФ и АДА [11]. Была выявлена связь изменений активности ТФан и ТФк с интенсивностью процессов пролиферации и ангиогенеза конкретной опухоли. Так, в НМРЛ установлена прямая положительная связь трансферазной активности (ТФан) с уровнями экспрессии маркера пролиферации Ki-67. Фосфорилазная активность (ТФк) коррелировала с уровнями сосудистого маркера CD34 [11].

В данном исследовании проводился кластерный анализ абсолютных значений ферментативной активности в группах опухолей НМРЛ, а также в группе КЖК. Выявлена ее неоднородность в каждой из

групп. Опухоли одной локализации статистически распределились в 2 кластера. Для корректного их описания были выбраны кластеры активности СОД, чьи абсолютные значения минимальны среди исследованных ферментов (табл. 2, 3). Данные по остальным ферментам соответствовали каждому индивидуальному образцу, отнесенному в конкретный кластер (далее – 1-е и 2-е подгруппы) по активности СОД.

Важно отметить, что прямая сильная связь между увеличением активности ТФан и АДА в опухолях данных локализаций сохранялась и в выделенных подгруппах ($p = 0,740$; $p < 0,001$). В них были выявлены корреляция активности ТФан и ТФк ($p = 0,468$; $p < 0,001$), а также АДА и ТФк ($p = 0,545$; $p < 0,001$). Это также может указывать на кооперативные сдвиги активности ферментов обмена дезоксиаденозина и дезокситимидина, которые могут способствовать и формированию дезокситимидилата (вследствие ресинтеза субстрата для тимидинкиназы), и параллельному повышению уровня 2-д-Д-Риб-1-Ф в опухоли.

Согласно полученным нами результатам, во 2-х подгруппах карцином разных локализаций, характеризовавшихся более высокой активностью СОД, повышения активности ГПО не установлено. Наоборот, во 2-й подгруппе КЖК на фоне максимальной активности СОД ($U = 21,00$; $Z = -2,59$; $p = 0,009$ по сравнению с остальными подгруппами) активность ГПО была минимальной ($U = 14,00$; $Z = -3,05$; $p = 0,002$

Таблица 3. Активность ферментов антиоксидантной системы и обмена нуклеозидов в карциномах желудка и кишечника (КЖК) согласно кластерному делению на подгруппы по особенностям активности СОД (нмоль/мин · мг), Me (Q_1 ; Q_3)

Table 3. The antioxidant system and nucleoside metabolism enzymes activity in gastric or colon cancer (GCC) samples due to the cluster division into subgroups according to the features of SOD activity (nmol/min · mg), Me (Q_1 ; Q_3)

Фермент Enzyme	КЖК (1-я подгруппа) GCC (subgroup 1)			КЖК (2-я подгруппа) GCC (subgroup 2)		
	Контроль Control	Опухоль Tumor	<i>p</i>	Контроль Control	Опухоль Tumor	<i>p</i>
СОД SOD	1,1 (0,8; 1,3)	1,0 (0,6; 1,1)	0,01	1,4 (0,9; 1,6)	1,7 (1,3; 2,3)	0,02
ГПО GPO	2,2 (1,4; 3,0)	1,9 (1,0; 2,2)	0,08	2,2 (1,9; 3,0)	1,5 (1,1; 2,0)	0,08
ТФк TP	62,7 (54,0; 84,3)	123,5 (90,8; 137,3)	0,01	77,0 (68,6; 100,1)	135,3 (119,0; 160,8)	0,01
ТФан TPan	112,7 (103,0; 155,0)	200,9 (140,2; 225,2)	0,01	124,3 (103,0; 144,5)	203,9 (144,5; 279,0)	0,01
АДА ADA	131,1 (97,7; 147,9)	203,7 (133,9; 267,9)	0,01	122,8 (107,4; 133,8)	237,2 (167,4; 335,3)	0,01

по сравнению с 1-й подгруппой КЖК и НМРЛ 1-й и 2-й подгрупп). При этом наблюдалась тенденция к повышению активности ТФк ($U = 30,00$; $Z = -2,00$; $p = 0,045$ для НМРЛ; $U = 30,50$; $Z = -1,97$; $p = 0,049$ для КЖК). В опухолях легких активность АДА во 2-м кластере также была достоверно выше, чем в первом ($U = 24,00$; $Z = -2,40$; $p = 0,017$). Можно предположить, что вследствие выявленных особенностей метаболизма для опухолей 2-х подгрупп были характерны более высокие уровни продукции O_2^- , H_2O_2 и 2-д-D-Риб-1-Ф. Таким образом, кластерный анализ выявил метаболическую неоднородность среди опухолей одной локализации и морфологии.

По результатам дискриминантного анализа наиболее специфичными для выделенных кластеров опухолей одной локализации оказались особенности активности СОД, ТФк, ГПО (для СОД λ Уилкса 0,160; толерантность 0,94; $p < 0,001$; для ТФк, соответственно, $-0,122$; 0,91, $p < 0,001$; для ГПО $-0,160$; 0,94; $p = 0,030$). Следовательно, в НМРЛ, КЖК выявлены подгруппы, характеризовавшиеся дисбалансом активности СОД и ГПО, повышением фосфорилзной активности ТФ без нарастания ее трансферазной активности. Это могло привести к метаболическому стимулированию ангиогенеза, формированию инвазивных свойств опухоли, устойчивости к апоптозу. Например, известно, что H_2O_2 инициирует ассоциацию α - и β -субъединиц фактора, индуцируемого гипоксией (hypoxia-inducible factor, HIF), запуская реализацию его проангиогенных и антиапоптозных эффектов [5]. ТФк, активируя катаболизм дезокситимидина, помимо собственного воздействия на ангиогенез, стимулирует НАДФН₂-оксидазы, форми-

рующие АФК [4, 6]. По мнению S. Tabata и соавт., ТФ способствует активации сигнальных путей, запускаемых H_2O_2 [6]. Так, H_2O_2 активирует ряд чувствительных онкогенов, способствующих опухолевой прогрессии, реализации ЭМП, метастазированию [3, 5]. Эти свойства H_2O_2 позволили W. Li и соавт. считать, что СОД, которая также его продуцирует, может участвовать в развитии ЭМП [12]. При этом опухоль приобретает агрессивные свойства, и традиционные методы лечения становятся неэффективными [14].

Одними из чувствительных к АФК онкогенами, участвующими в программе ЭМП, являются *Snail*-гены. Кодированные *Snail* факторы транскрипции реализуют формирование инвазивных свойств опухоли [14]. Так, вследствие репрессии транскрипции E-кадгерина, ламинина, интегринов мембран нарушаются межклеточные контакты, клеточно-матриксная адгезия [1, 2, 14]. Активация металлопротеиназ обеспечивает протеолиз внеклеточного матрикса, белковых компонентов базальных мембран [5, 6]. Изменения клеточной поляриности и формы сопровождаются экспрессией мезенхимальных маркеров – виментина, α -актина гладких мышц. Клетки приобретают подвижность, способность к инвазии, метастазированию [2]. J. Zeng и соавт. было экспериментально установлено, что H_2O_2 одновременно подавляет экспрессию E-кадгерина и стимулирует экспрессию мезенхимальных маркеров (виментина и N-кадгерина) [3]. Как АФК, так и ТФ стимулируют активность матриксных металлопротеиназ [5, 6].

В данном исследовании, помимо ферментативной активности, были изучены особенности опухолевой экспрессии ряда эпителиальных маркеров,

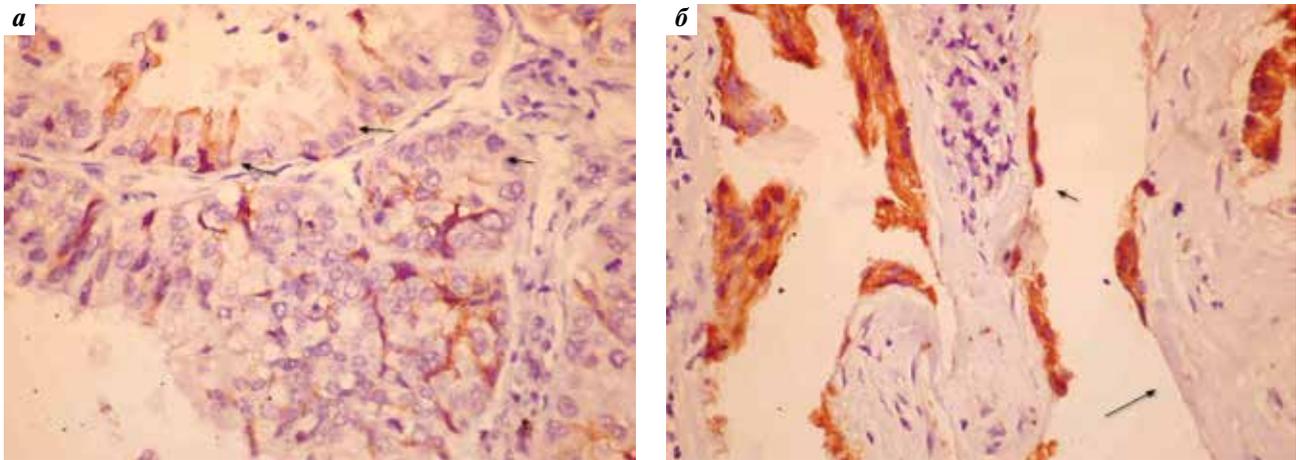


Рис. 1. Немелкоклеточный рак легких (2-я подгруппа, папиллярная аденокарцинома легких): снижение экспрессии E-кадгерина (а); пancyтoкepатина AE1/AE3 (б). Иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител. $\times 400$

Fig. 1. Non-small cell lung cancer (subgroup 2, papillary lung adenocarcinoma): decreased expression of E-cadherin (a), pancytokeratin AE1/AE3 (b). Immunohistochemical staining with antibodies. $\times 400$

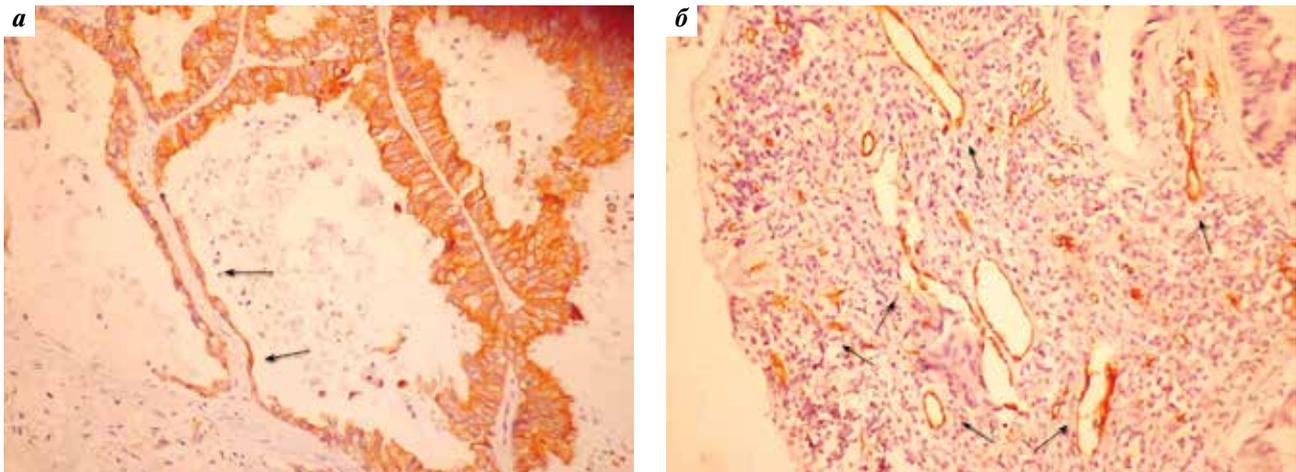


Рис. 2. Немелкоклеточный рак легких (2-я подгруппа, папиллярная аденокарцинома легких): особенности экспрессии цитокератина 18 (а); маркера эндотелиоцитов CD34 (б). Иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител. $\times 200$

Fig. 2. Non-small cell lung cancer (subgroup 2, papillary lung adenocarcinoma): the features of expression of cytokeratin 18 (a); endotheliocyte marker CD34 (b). Immunohistochemical staining with cytokeratin 18 and CD34 antibodies. $\times 200$

Ki-67, маркера эндотелиоцитов CD34 и мезенхимальных маркеров. ЭМП регистрировали по ряду признаков. В частности, наблюдали снижение (или отсутствие) мембранной экспрессии E-кадгерина, появление ее в цитоплазме опухолевых клеток (рис. 1). Также снижалась экспрессия цитокератина AE1/AE3 и цитокератина 18 (см. рис. 1, рис. 2). Некоторые клетки обособливались, вытягивались, приобретали фибробластоподобную форму (см. рис. 2, а). При этом появлялась экспрессия мезенхимальных маркеров (рис. 3).

Отметим, что в 1-й подгруппе НМРЛ ($n = 16$) в 7 (44 %) случаях были выявлены признаки ЭМП. Во 2-й подгруппе НМРЛ ($n = 9$) переход наблюдали во всех образцах (100 %). В 1-й подгруппе КЖК ($n = 11$) ЭМП зарегистрировали в 6 (54 %) случаях, а в их

2-й подгруппе ($n = 10$) переход наблюдали в 8 (80 %) образцах опухолей.

Интенсивность пролиферации варьировала. Среди случаев НМРЛ при наличии ЭМП пролиферативная активность чаще была низкой (экспрессия Ki-67 < 10 % клеток). В образцах без ЭМП она была умеренной (Ki-67 – 20–30 %) и высокой (Ki-67 – 30–40 %), иногда достигая 60 %. При раке желудка кишечного типа, в аденокарциномах кишечника, как правило, интенсивность пролиферации была высокой, экспрессия Ki-67 в среднем составляла 30–50 %, однако при ЭМП ее интенсивность снижалась.

В подавляющем большинстве случаев при ЭМП наблюдали выраженную экспрессию сосудистого

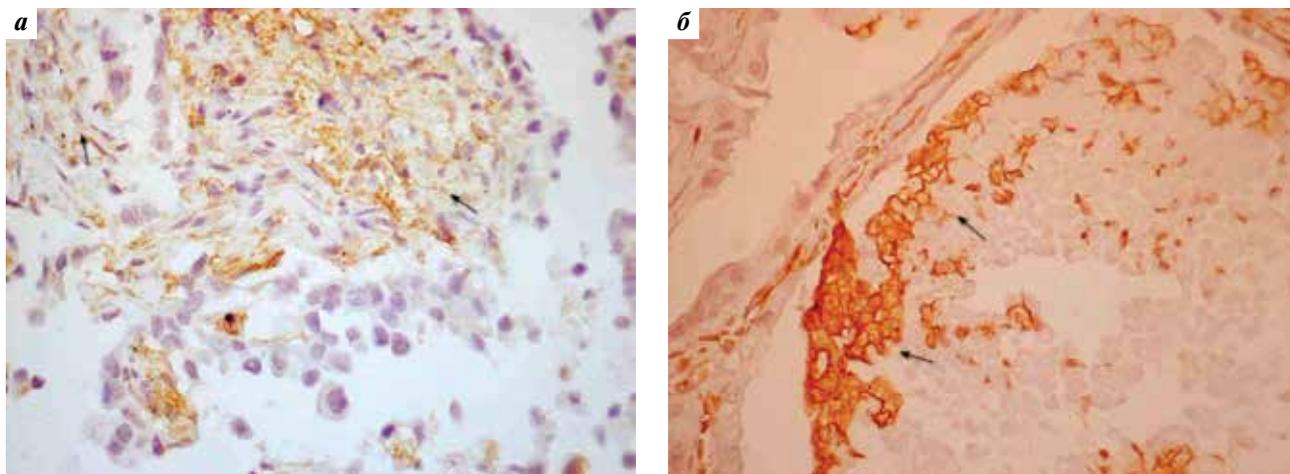


Рис. 3. Немелкоклеточный рак легких (2-я подгруппа, папиллярная аденокарцинома легких). Появление признаков стволовых клеток и экспрессия мезенхимальных маркеров. Иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к D2-40 (а), виментину (б). $\times 400$

Fig. 3. Non-small cell lung cancer (subgroup 2, papillary lung adenocarcinoma). Signs of stem cells and expression of mesenchymal markers. Immunohistochemical staining with antibodies to D2-40 (a), vimentin (b). $\times 400$

маркера CD34 и активацию ангиогенеза как при НМРЛ (см. рис. 2, б), так и в группе КЖК.

Отметим, что ЭМП наблюдался преимущественно в опухолях, распределенных по результатам кластерного анализа во 2-е подгруппы (соответственно, 100 % образцов опухолей, составлявших 2-ю подгруппу НМРЛ, и 80 % из 2-й подгруппы КЖК). Выявленные в них особенности обмена нуклеозидов, а также СОД, ГПО могли способствовать продукции 2-д-Д-Риб-1-Ф, H_2O_2 и развитию их эффектов.

Заключение

В солидных опухолях различной локализации установлено увеличение активности ферментов деградации дезокситимидина и дезоксиаденозина, выявлен дисбаланс ферментов антиоксидантной системы.

Повышение активности ТФ и АДА – универсальное свойство карцином исследованных локализаций. В кооперации оба фермента могут обеспечивать как

продукцию 2-д-Д-Риб-1-Ф, так и ресинтез дезокситимидина. В пользу последнего свидетельствует нарастание силы связи, характеризующей корреляцию трансферазной активности ТФ и АДА в тканях опухоли ($p = 0,740$, $p < 0,001$).

Опухоли одной локализации и патоморфологического типа метаболически неоднородны по активности антиоксидантных ферментов (СОД, ГПО) и фосфорилазной активности ТФ. Нарастание опухолевой фосфорилазной активности ТФ в среднем в 2 раза на фоне повышения активности СОД и низкой активности ГПО могут формировать условия для стимулирования тканевыми метаболитами (H_2O_2 и 2-д-Д-Риб-1-Ф) опухолевой прогрессии. Предполагаем, что индивидуальные метаболические особенности могут непосредственно способствовать активации сигнальных путей, обеспечивающих формирование агрессивных свойств опухоли, в том числе реализующих ЭМП.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Лыжко Н.А. Молекулярно-генетические механизмы инициации, промоции и прогрессии опухолей. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(4):7–17. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-7-17
Lyzhko N.A. Molecular-genetic mechanisms of initiation, promotion and progression of tumors. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2017;16(4):7–17. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-7-17
2. Vasilenko I.V., Kondratyuk R.B., Grekov I.S., Yarkov A.M. Epithelial-mesenchymal transition in main types of gastric carcinoma. Clin Exp Morphol 2021;10(2):13–20. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.13–20
3. Zeng J., Li M., Xu J.-Y. et al. Aberrant ROS mediate cell cycle and motility in colorectal cancer cells through an oncogenic CXCL14 signaling pathway. Front Pharmacol 2021;12:764015. DOI: 10.3389/fphar.2021.764015
4. Vara D., Watt J.M., Fortunato T.M. et al. Direct activation of NADPH oxidase 2 by 2-deoxyribose-1-phosphate triggers nuclear factor kappa B-dependent angiogenesis. Antioxid Redox Signal 2018;28(2):110–30. DOI: 10.1089/ars.2016.6869
5. Kumari S., Badana A.K., G M.M. et al. Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival. Biomark Insights 2018;13:1–9. DOI: 10.1177/1177271918755391
6. Tabata S., Yamamoto M., Goto H. et al. Thymidine catabolism promotes NADPH oxidase-derived reactive oxygen species

- (ROS) signalling in KB and Yumoto cells. *Sci Rep* 2018;8(1):6760. DOI: 10.1038/s41598-018-25189-y
7. Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V., Kardymon O.L. et al. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxid Med Cell Longev* 2019;6175804. DOI: 10.1155/2019/6175804
 8. Furukawa T., Tabata S., Yamamoto M. et al. Thymidine phosphorylase in cancer aggressiveness and chemoresistance. *Pharmacol Res* 2018;132:15–20. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.03.019
 9. Борзенко Б.Г., Федорова А.А., Бакурова Е.М., Богатырева Е.В. Свойства и функции белка TP/PD-ECGF – фермента и фактора ангиогенеза в норме и при неопластической патологии. *Вопросы онкологии* 2021;67(6):746–54. DOI: 10.37469/0507-3758-2021-67-6-746-754
Borzenko B.G., Fedorova A.A., Bakurova E.M., Bogatyreva E.V. Properties and functions of TP/PD-ECGF – enzyme and angiogenic factor in norm and in neoplastic pathology. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology* 2021;67(6):746–54. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2021-67-6-746-754
 10. Zulkov S.A., Borzenko B.G., Shatova O.P. et al. Correlation of nucleotides and carbohydrates metabolism with pro-oxidant and antioxidant systems of erythrocytes depending on age in patients with colorectal cancer. *Exp Oncol* 2014;36(2):117–20.
 11. Бакурова Е.М. Взаимосвязь активности тимидинфосфоорилазы с индивидуальными особенностями пролиферации и ангиогенеза опухолей основных локализаций. *Новообразование* 2017;16(1):69–72.
 12. Li W., Cao L., Han L. et al. Superoxide dismutase promotes the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via activation of the H₂O₂/ERK/NF-κB axis. *Int J Oncol* 2015;46(6):2613–20. DOI: 10.3892/ijo.2015.2938
 13. Волкова Л.В., Шушвал М.С. Морфологическая характеристика выявленных фоновых патологических процессов в слизистой оболочке, прилежащей к опухолевому узлу, при раке желудка кишечного типа. *Клиническая и экспериментальная морфология* 2022;11(1):5–15. DOI: 10.31088/CEM2022.11.1.5-15.
Volkova L.V., Shushval M.S. Morphological characteristics of background pathological processes in the mucous membrane adjacent to the tumor in gastric cancer of the intestinal type. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya = Clinical and experimental morphology* 2022;11(1):5–15. (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.1.5-15
 14. Кондратьев Р.Б., Греков И.С., Ярков А.М. и др. Роль эпителиально-мезенхимальной трансформации в раках различной локализации (часть 1). *Новообразование* 2021;13(2):91–5. Kondratyuk R.B., Grekov I.S., Yarkov A.M. et al. The role of epithelial-mesenchymal transition in carcinomas by different localizations (Part 1). *Novoobrazovanie = Neoplasm* 2021;13(2):91–5. (In Russ.).

Вклад авторов

Е.М. Бакурова: разработка концепции и дизайна исследования, проведение биохимических исследований, обработка их результатов с учетом опухолевой патоморфологии, написание и редактирование текста статьи;

И.В. Василенко: разработка концепции работы, проведение, описание и анализ патоморфологических исследований, критический анализ статьи;

Ю.Д. Турсунова: обработка, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи;

Н.М. Добаева: анализ и интерпретация данных, сопоставление с данными литературы, редактирование статьи;

Б.Г. Борзенко: разработка концепции и дизайна исследования, анализ выявленных корреляций, редактирование и утверждение окончательного варианта статьи;

В.Н. Ельский: анализ рукописи и литературы с внесением ценного интеллектуального содержания.

Authors contributions

E.M. Bakurova: development of the concept and design of the study, biochemical part of the experiment realization, the results processing according to tumor pathomorphology, article writing and editing;

I.V. Vasilenko: conception of the work, realization, description and analysis of pathomorphological studies, article critical revision;

Yu.D. Tursunova: the results processing, its analysis and interpretation, article editing;

N.M. Dobaeva: the results analysis and interpretation in comparison with literature sources, article editing;

B.G. Borzenko: development of the concept and design of the study, analysis of relationships between biochemical and pathomorphological features of tumors, article editing, approval of the final version of the article;

B.N. Yelsky: the results analysis, its integration with other authors results, the valuable intellectual content implementation.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.М. Бакурова / E.M. Bakurova: <https://orcid.org/0000-0002-9004-8838>

Б.Г. Борзенко / B.G. Borzenko: <https://orcid.org/0000-0002-8380-6733>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Работа не нарушает интересы пациентов и не вредит их здоровью, одобрена комиссией по биоэтике ГОО ВПО «ДонНМУ им. М. Горького».

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The patients gave written informed consent to participate in the study. The work does not harm their health, approved by the bioethics committee of the M. Gorky DonNMU.

Статья поступила: 05.05.2022. **Принята к публикации:** 31.05.2022.

Article submitted: 05.05.2022. **Accepted for publication:** 31.05.2022.



К 70-летию Виктора Владимировича НОВИКОВА

To the 70th anniversary of Viktor Vladimirovich NOVIKOV

В мае 2022 года исполнилось 70 лет доктору биологических наук, профессору Виктору Владимировичу Новикову, который долгое время входит в состав редколлегии «Российского биотерапевтического журнала».

Виктор Владимирович Новиков является основоположником научного направления по изучению диагностической, мониторинговой и прогностической роли важной группы биомаркеров – растворимых дифференцировочных молекул клеток иммунной системы. Им разработана концепция регуляторной роли растворимых дифференцировочных молекул в работе глобальной иммунологической сети. В.В. Новиковым и соавт. показано существование различных наноструктурных форм растворимых дифференцировочных молекул в виде олигомерных форм, растворимых комплексов, включающих компоненты рецептор-лигандных взаимодействий. Изменения в наноструктурной составляющей пула растворимых дифференцировочных молекул и растворимых молекул гистосовместимости отражаются на его функциональном состоянии и имеют мониторинговый характер при иммуноопосредованных заболеваниях. Виктором Владимировичем разработаны авторские методы иммуноферментного определения более 20 наименований растворимых дифференцировочных мо-

лекул с помощью полученных профессором А.Ю. Барышниковым моноклональных антител. Получены и обобщены в обзорных статьях и монографиях многочисленные данные о мониторинговой и прогностической роли данных биомаркеров при вирусных инфекциях, хронической обструктивной болезни легких, при тяжелой ожоговой и механической травме, инфаркте миокарда и других заболеваниях. Проведено детальное изучение мониторинговой роли растворимых дифференцировочных молекул и растворимых форм молекул главного комплекса гистосовместимости при онкологических заболеваниях, таких как рак молочной железы, рак тела матки, рак почки и другие. Сформулированы также представления о существовании у тяжелых больных COVID-19 «шторма» растворимых дифференцировочных молекул наряду с хорошо известным цитокиновым «штормом». Получены данные об особенностях транскриптома опухолевых клеток и клеток иммунной системы, разрабатываются новые подходы к созданию вакцин на основе вирусоподобных частиц. Являясь в разные

годы заведующим лаборатории Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, директором Центра молекулярной биологии и биомедицины Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, заведующим и профессором кафедры молекулярной биологии и иммунологии этого же университета, В.В. Новиков на протяжении многих лет активно ведет фундаментальные и прикладные исследования, связанные с поиском, характеристикой и трансляцией в здравоохранение новых молекулярных биомаркеров при иммуноопосредованных заболеваниях.

Под руководством В.В. Новикова защищены 32 кандидатские и докторские диссертации. Виктор Владимирович является почетным работником науки и техники Российской Федерации, имеет общественные награды, дважды лауреат премии города Нижний Новгород в номинации «Наука». Ведет работу в экспертном совете по медико-профилактическим наукам Высшей аттестационной комиссии Российской Федерации.

Редколлегия «Российского биотерапевтического журнала» поздравляет Виктора Владимировича с 70-летием и желает ему здоровья и дальнейших творческих успехов!

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 предоставлены на русском и английском языках.

Пример:

ПУБЛИКАЦИЯ СТАТЬИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

И.И. Иванов¹, П.П. Петров²

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

²ФГБНУ «НИИ по поиску 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. Объем 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.

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

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

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 необходимости 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 обоснование 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 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 подрисуночными 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 подрисуночной 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 (p). 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. Использованные 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 желательнее 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, ГОСты, 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:

Srignley 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 неветро-клеточного 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 автором 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 (Sm. 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 статьи 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@ronc.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 полуротным 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.