

ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА

УДК 616.–006

Периодическое научное издание. Выходит дважды в год

Основан в 2006 году
2/2015 том 13

Учредитель: РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН (лаборатория иммунологии гемопоэза)

ГЛАВНЫЕ РЕДАКТОРА Н.Н. ТУПИЦЫН, G. JANOSSY
Ответственный секретарь А.В. Моженкова

Редакционная коллегия:

З.Г. Кадагидзе (зам. главного редактора)
Е.Г. Турнянская (Москва)
Е.В. Артамонова (Москва)
Ж. Брошь (Франция)
Дж. Вижденес (Франция)
Л.Ю. Гривцова (Москва)
Дж. Джаносси (Великобритания)
И.С. Долгополов (Москва)
Т.Н. Заботина (Москва)
А.М. Ковригина (Москва)
А.М. Копылов (Москва)
Л.В. Мазурок (Курган)
А.А. Михайлова (Москва)
Д.Ш. Османов (Москва)
А.И. Павловская (Москва)
С.В. Петров (Казань)
Б.В. Пинегин (Москва)
А.В. Попа (Москва)
Н.А. Пробатова (Москва)
Р.М. Рамазанова (Казakhstan)
И.Н. Серебрякова (Москва)
Г.С. Тумян (Москва)
С.А. Тюляндин (Москва)
А.В. Филатов (Москва)
М.А. Френкель (Москва)
С.А. Шинкарев (Липецк)
Е.Н. Шолохова (Москва)
А.А. Ярилин (Москва)

Адрес редакции: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24
Тел./факс: +7(499)324-90-69
E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru, www.ronc.ru/imhaemo_hi

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору за соблюдением законодательства в сфере массовых коммуникаций и охране культурного наследия.

Свидетельство ПИ № ФС 77-23551 от 06.03.2006
Свидетельство Эл № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Подписано в печать 31.12.2015. Формат 60×90/8.
Бумага офсетная. Гарнитура «Times New Roman».
Печать офсетная.
Уч.-изд. листов 7. Тираж 1000 экз.
Подписной индекс № 36915
Отпечатано в типографии «ПРАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА»
Тираж 1000 экз.

При перепечатке материалов ссылка на
«Иммунологию гемопоэза» обязательна
Издательская группа РОНЦ
Координатор: Е.Г. Турнянская. Макет: Б.Б. Крюков

Н.ЕМАТОПОИЭСИС IMMUNOLOGY

UDK 616.–006

Semi-annual scientific oncoimmunological periodicals

Founded in 2006
2/2015 vol. 13

Founder: State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center
affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Russian
Federation (H/Ematopoiesis Immunology Laboratory)
EDITORS-IN-CHIEF N.N.TUPITSYN, G. JANOSSY
Executive secretary A.V. Mozhenkova

Editorial Board:

Z.G. Kadagidze (Deputy Editor-in-Chief)
E.G. Tumianskaia (Moscow)
E.V. Artamonova (Moscow)
J. Brochier (France)
G. Wijdenes (France)
L.U. Grivtsova (Moscow)
G. Janossy (UK)
I.S. Dolgoplov (Moscow)
T.N. Zabolina (Moscow)
A. M. Kovrigina (Moscow)
A.M. Kopilov (Moscow)
L.V. Mazurok (Kurgan)
A.A. Mikhailova (Moscow)
D.Ch. Osmanov (Moscow)
A.I. Pavlovskaja (Moscow)
S. V. Petrov (Kazan)
B.V. Pinegin (Moscow)
A.V. Pupa (Moscow)
N.A. Probatova (Moscow)
R.M. Ramazanova (Kazakhstan)
I.N. Serebrakova (Moscow)
G.S. Tumian (Moscow)
S.A. Tuliandin (Moscow)
A.V. Filatov (Moscow)
M.A. Frenkel (Moscow)
S.A. Shinkarev (Lipetz)
E.N. Sholokhova (Moscow)
A.A. Iarilin (Moscow)

Address of Editorial Office: 24, Kashirskoye sh., Moscow, Russian
Federation, 115478. Tel/fax: +7(499)324-90-69
E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru
www.ronc.ru/imhaemo_hi

The journal is registered at the Federal Agency of Press and Mass-media of Russian Federation.

License № ФС 77-23551 от 06.03.2006
License № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Zip-code № 36915
Published «PRACTICAL MEDICINE»
Print run 1000 copies

No reproduction is permitted without reference to Journal
Haematopoiesis immunolog
Coordinator: E.G. Turnyanskaya. Design: B.B. Krukov

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Н.Н. Тупицын</i> ПОЛИОКСИДОНИЙ В ОНКОЛОГИИ (ОТ РЕДАКТОРА)	4
<i>Ж.-Ф. Росси</i> КАК ПОВЫСИТЬ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК-ЭФФЕКТОРОВ В ИММУНОТЕРАПИИ РАКА?	6
<i>Иванова А.С., Пучкова Н.Г., Некрасов А.В., Гурковская Я.И., Апрятина В.А., Паценков М.В., Дагиль Ю.А., Мастернак Т.Б., Пинегин Б.В., Абрамова М.А.</i> МЕХАНИЗМЫ АДЬЮВАНТНЫХ ЭФФЕКТОВ ПОЛИОКСИДОНИЯ.....	30
<i>Н.А. Козлов</i> ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕЧЕБНОГО ПАТОМОРФОЗА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ ИММУНОТЕРАПИИ ПОЛИОКСИДОНИЕМ	93
ПРОГРАММА 12-Й МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА»	98
ПРОГРАММА 13-Й МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА»	103

CONTENTS

N. N. Tupitsyn

POLYOXIDONIUM IN ONCOLOGY5

*A.S. Ivanova, N.G. Puchkova, A.V. Nekrasov, Ya.I. Gurkovskaya, V.A .Apyatina,
M.V. Paschenkov, Yu.A. Dagil, T.B. Masternak, B.V. Pinegin, M.A.Abramova.*

POLYOXIDONIUM ADJUVANT EFFECT MECHANISMS31

ПОЛИОКСИДНИЙ В ОНКОЛОГИИ (ОТ РЕДАКТОРА)

Второй номер журнала «Иммунология гемопоэза» за 2015 год посвящен в основном иммунологическим проблемам. Приводится русский вариант статьи Ж.-Ф. Росси по иммунотерапии. Центральная публикация журнала — обзор детальной характеристики отечественного иммуномодулятора и адъюванта — полиоксидония (на русском и английском языках). Продолжая тему использования этого препарата в онкологии, приводим статью Н.А. Козлова по иммуногистохимической характеристике лечебного патоморфоза рака молочной железы после иммунотерапии полиоксидонием (клиническая характеристика данного случая дана в нашем журнале (№1, 2015)). Описанный случай полного патоморфоза опухоли на фоне лечения полиоксидонием стал предметом серьезных дискуссий. Приводимая иммуноморфологическая картина патоморфоза необычна, она не соответствует ни одному из иммунных или воспалительных процессов в молочной железе. Иммунофенотип элементов макрофагальной природы (CD68+CD163—) наиболее соответствует макрофагам светлых центров фолликулов лимфатических узлов (tangible-body macrophages), поглощающих продукты апоптотического распада огромного количества центробластов, гибнущих в процессе гипермутаций и селекции специфических клонов. Объяснения механизма действия полиоксидония при раке молочной железы следует, по-видимому, искать в индукции гуморального иммунитета против опухоль-ассоциированных антигенов. Этому механизму противоопухолевой защиты в настоящее время уделяется особое внимание.

В июне 2015 г. в Рыбинске (Ярославская область, Россия) при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15–04–20339 Г) успешно проведена 12-я Международная конференция «Иммунология гемопоэза», программа которой приведена в данном журнале, материалы представлены на сайте www.imhaemo.ru.

В настоящее время начата подготовка к следующей 13-й конференции «Иммунология гемопоэза», которая пройдет в Будапеште 3–4 июня 2016 года. Предварительная программа представлена в данном номере журнала.

Н.Н. Тулицын

POLYOXIDONIUM IN ONCOLOGY

The second issue of *The Haemopoiesis Immunology*, 2015, is mainly devoted to Immunology problems. We present J.-F. Rossi's paper on immunotherapy (in Russian). The journal's central event is publication of a detailed review of polyoxidonium, a Russian immunomodulator and adjuvant (both in Russian and English). N.A. Kozlov's presentation on immunohistochemical characterization of breast cancer therapeutic pathomorphosis after polyoxidonium immunotherapy describes the use of this drug in oncology (clinical characterization of the presented case was given in № 1, 2015). The described case of complete tumor pathomorphosis aroused serious discussion. The presented pathomorphosis immunomorphology is unusual and does not correspond to any of immune or inflammatory processes in the breast. The immunophenotype of macrophagal elements (CD68+CD163–) most closely resembles tangible-body macrophages that swallow up apoptotic decay products of a great number of centroblasts dying as a result of hypermutations and selection of specific clones. It seems that explanation of mechanism of the polyoxidonium effect in breast cancer may involve induction of humoral immunity against tumor-associated antigens. This mechanism of antitumor activity is currently in the focus of attention.

The 12th Haemopoiesis Immunology International Conference was held successfully in June 2015 in the Rybinsk city (Yaroslavl Region, Russia) with financial support of the RFBR (grant 15–04–20339 G) and you may find its program at www.imhaemo.ru.

We are starting preparatory activities for the next 13th Haemopoiesis Immunology Conference to be held in Budapest on June 3–4, 2016. This journal issue presents its preliminary program.

N. N. Tupitsyn

Жан-Франсуа Росси

КАК ПОВЫСИТЬ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК-ЭФФЕКТОРОВ В ИММУНОТЕРАПИИ РАКА?

Отделение гематологии, Монпелье, Франция

Ключевые слова: иммунотерапия, NK, Т-клетки, дендритные клетки, вакцинация, рак.

Список сокращений

CAR — химерный антигенный рецептор

DC — дендритные клетки

IFN — интерферон

IL — интерлейкин

KIR — Ig-подобные рецепторы клеток-киллеров

NK — естественные киллеры

NKT — Т-лимфоциты с активностью естественных киллеров

TNF — фактор некроза опухолей

Рост раковых клеток обусловлен нарушением функции иммунного надзора. Одним из основных инструментов лечения рака в настоящее время служит иммунотерапия, причем этот метод становится все более эффективным благодаря более углубленному пониманию явлений фундаментальной иммунологии. Были открыты иммунные клетки-эффекторы, цитокины, хемокины и медиаторы иммунных сигналов — от воспалительных до инфекционных процессов и процессов уничтожения раковых клеток. Созданы условия для получения новых эффективных инструментов и разработки оптимальных стратегий иммунотерапии. Пример важнейшего клинического успеха — применение моноклональных антител, особенно при В-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях, в лечении которых применяют ритуксимаб — антитело к CD20. Позднее был разработан механизм подавления контрольных точек иммунитета в микроокружении опухоли, в том числе с использованием таких средств ограничения иммунного подавления, как анти-PD1, анти-CTLA-4, анти-PDL1, анти-PDL2 или анти-VISTA. Цель данного подхода — установить контроль, т. е. уничтожить раковые клетки (этот показатель оценивают как длительность ремиссии при отсутствии или незначительной токсичности), что приводит к увеличению общей продолжительности жизни больного. Эффект достигается за счет увеличения числа и стимуляции функциональной способности кле-

ток-эффекторов иммунитета, в том числе естественных киллеров (NK), NKT и цитотоксических Т-клеток, а также подавления функциональной активности клеток-супрессоров иммунитета. В данном обзоре обсуждается роль различных иммунных клеток-эффекторов и способы повышения их клинической эффективности.

Введение

В начале XX в. Пауль Эрлих разработал концепцию защиты организма человека от рака иммунной системой [1]. В период с 1940 до начала 1960-х гг. Бернет с коллегами выдвинули концепцию «свой–чужой» в иммунологии и развили идею об иммунологическом надзоре за раком [2–4]. В XIX в. немецкие ученые опубликовали сообщения о значительной регрессии злокачественных опухолей у пациентов со стрептококковой инфекцией. Эти сообщения послужили основой для систематического изучения лихорадки и инфекций в качестве иммунотерапии, предложенной Уильямом Коли [5]. Так родилась иммунотерапия. Необычайно интенсивное развитие исследований в области иммунологии привело к тому, что клиницисты стали использовать эффективные препараты на основе иммунных клеток, которые активизировались *ex vivo*, а также инструменты, которые усиливали их активность или подавляли специфические контрольные точки иммунитета. В начале 1980-х гг. клиницисты использовали цитокины, участвующие в экспансии аутологичных иммунных клеток, в частности Т-лимфоцитов [6, 7]. Это было время интерлейкина-2 (IL) и интерферонов (IFN) [8]. Аутологичные клетки-киллеры, активированные лимфоцитами, выделяли из лимфоцитов периферической крови, культивировали и затем повторно вводили в организм [9]. Так возникла адоптивная клеточная терапия, основную роль в разработке которой сыграл Стив Розенберг из Национального института рака в Бетесде, шт. Мэриленд, США. Ткань, окружающая раковые клетки, может содержать иммунные клетки, обладающие противоопухолевой активностью. Это дает возможность взять образец этой ткани и выделить Т-инфильтрирующие лимфоциты, атакующие раковые клетки. Т-инфильтрирующие лимфоциты, считавшиеся антиген-специфическими Т-лимфоцитами, культивировали в лабораторных условиях и затем вводили пациенту [9–11]. Однако действие различных иммуносупрессивных механизмов приводило к снижению клинической активности. В целях повышения эффективности и увеличения продолжительности ремиссии применяли различные дополнительные методы для обеднения эндогенных иммунных клеток, с тем чтобы введенные Т-клетки могли осуществлять специфический контроль за опухолью. Специфический противоопухолевый эффект был обусловлен специфическим распознаванием опухолевых антигенов, которые активизи-

ровали специфические Т-лимфоциты. Были разработаны методы вакцинации для усиления представления опухолевых антигенов антиген-представляющими клетками и повышения активности специфических цитотоксических Т-лимфоцитов [12]. Дальнейший прогресс обеспечили генетически модифицированные Т-лимфоциты, эффективность которых повышалась посредством Т-клеточного рецептора (T-CR) или связывания с опухолевой клеткой через химерный антигенный рецептор (CAR) [12]. Помимо специфических цитотоксических Т-лимфоцитов непосредственное или опосредованное участие в уничтожении раковых клеток могут принимать и другие клетки, в том числе $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, которые используют Т-клеточный рецептор и дополнительные активирующие рецепторы для формирования ответа на лиганды, индуцированные стрессом, и инфекцию; к ним относятся НК-клетки, НКТ-клетки, нейтрофилы, макрофаги и тучные клетки. В данном обзоре рассматриваются механизмы нарушения функции иммунного надзора при раке и обсуждаются различные способы повышения клинической противоопухолевой активности посредством клеток-эффекторов иммунитета.

Нарушение функции иммунного надзора при раке

Иммунологический надзор за злокачественной опухолью представляет своего рода механизм «контроля качества», отражающий способность иммунной системы улавливать нарушения клеточной регуляции и отвечать на них путем активации стрессовой реакции для восстановления гомеостаза. Эта гипотеза была впервые сформулирована Эрлихом в 1909 г. и развивалась в XX в. по мере углубления знаний об иммунной системе, в том числе механизме распознавания опухоль-ассоциированных антигенов, а также выявления патологических последствий ее неэффективности (табл. 1). В недавно опубликованной работе Corthay привел ряд наблюдений, которые обосновывают роль иммунной системы в защите организма от развития злокачественных опухолей: 1) повышение риска онкологических заболеваний у пациентов с первичным иммунодефицитом, подавлением иммунитета после трансплантации и инфекцией вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1); 2) наличие инфильтрата иммунных клеток в первичных опухолях человека, что служит независимым прогностическим фактором для выживаемости; 3) наличие мутаций в генах, кодирующих белки, специфически распознаваемые адаптивной иммунной системой с целью не допустить разрушения иммунитета; 4) элиминация клеток, испытывающих стресс, или предзлокачественных клеток лимфоцитами, имеющими рецептор NKG2D; 5) перспективность стратегии иммунотерапии путем блокирования молекул контрольных точек иммунитета CTLA-4, PD-1, PD-L1 и 2 [14–16]. Кроме того, иммунная система подавляется в качественном и количественном плане

Таблица 1

Механизмы снижения функции иммунного надзора при онкологических заболеваниях

Аномалии раковых клеток	• Экспрессия опухоль-ассоциированного антигена: – Низкая экспрессия или отсутствие экспрессии антигенов на поверхности раковых клеток (эпигенетический контроль, протеосомные аномалии или мутации, метаболические изменения) – Аномалии экспрессии комплекса HLA I (мутация, аномальный процесс представления антигенов) • Продукция цитокинов: – TGF-β – TH2-ответ • Иммунопротеасомные аномалии • Отрицательные регуляторы иммунных контрольных точек • Мутации белков, контролирующих адаптивную иммунную систему
Измененные иммунные клетки	• Изменение отношения эффективности за счет количественного сокращения в результате: – Химиотерапии – Сопутствующих заболеваний • Изменение отношения эффективности за счет усиления подавления иммунитета в результате: – Т-регуляторных клеток – Нарушения лицензирования NK – Нейтрофилов (IL17-продуцирующих T$\gamma\delta$) • Эпигенетический контроль иммунного ответа • Полиморфизмы
Состояние хозяина	• Аутоиммунные заболевания (синдром Шегрена—Гужеро и др.) • Инфекционные процессы (EBV, CMV и др.) • Воспалительные процессы (IL6 и др.) • Генетические и эпигенетические состояния • Иммунное старение

стандартными цитотоксическими препаратами. Обход иммунитета представляет собой сложное явление, поддерживаемое изменениями раковых клеток и их микроокружения, которые приводят к снижению способности распознавать раковые клетки иммунными инфильтрирующими клетками. В реализации этого феномена задействованы несколько механизмов, таких как изменение экспрессии и презентации опухоль-ассоциированных антигенов, продукция различных молекул, усиливающих регуляторное/ингибирующее окружение антиген-представляющих клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов. Таким образом, наличие Т-регуляторных клеток в опухоли, снижение активности комплекса HLA-1 на поверхности раковых клеток, а также секреция различных цитокинов, модифицирующих клеточную активность, коррелируют с неблагоприятным прогнозом или метастазированием [17–22]. Эти изменения обусловлены рядом факторов, в том числе изменением эпигенетических меток в опухолевых клетках, которые контролируют генную экспрессию; следовательно, эпигеномные структуры могут представлять новые биомаркеры как для прогрессирования, так и контроля злокачественной опухоли [23]. Существует несколько препаратов, модифицирующих эпигенетический контроль, в том числе гипометилирующие средства и ингибиторы деацетилаз гистонов. Они в основном применяются в лечении предлейкозных состояний, но в настоящее время также исследуются в качестве модификаторов иммунного ответа при раке, в частности для процессинга и представления антигенов [23–25]. Для контроля и уничтожения раковых клеток критическое значение имеет число клеток-эффекторов. В условиях *in vitro* для уничтожения одной раковой клетки требуется десять цитотоксических Т-лимфоцитов, однако всего одной НК-клетки достаточно для уничтожения десяти раковых клеток. Еще одним из основных факторов эффективности служит возможность доступа иммунных клеток-эффекторов к раковым клеткам и их микроокружению.

Использование $\gamma\delta$ Т-клеток в иммунотерапии

$\gamma\delta$ Т-клетки представляют небольшое подмножество (10 %) лимфоцитов периферической крови, в котором доминирует субпопуляция V γ 9V δ 2 Т-лимфоцитов, способная распознавать эндогенный пул изопентилпирофосфата. $\gamma\delta$ -Т-клетки участвуют в формировании противовирусного и противоопухолевого иммунного ответа, а также модуляции иммунного ответа [26]. В проведенном недавно клиническом исследовании, включающем стимуляцию $\gamma\delta$ -Т-клеток *in vivo* в целях иммунотерапии, наблюдалась неожиданно высокая экспансия НК-клеток [27]. Таким образом, $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты взаимодействуют со всеми другими типами иммунных клеток, в том числе $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитами, регулирующими IL-17 $\gamma\delta$ -Т-клетки, В-лимфоцитами для продукции иммуноглобулинов

(Ig), участвуют в амплификации и активации NK-клеток, моноцитов/макрофагов и дендритных клеток (DC), гранулоцитов и мезенхимальных/стромальных клеток [28]. Аналогично NK-лимфоцитам, $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты реагируют на стимуляцию лигандами, индуцированными стрессом и/или инфекцией, такими как молекулы, родственные классу I МНС, последовательности, родственной полипептиду класса I МНС (MIC), A/B и семейство ULBP. Обычно эти лиганды проявляют низкую активность и не экспрессируются, но стимулируются в присутствии стресса или инфекции и затем активируют $\gamma\delta$ -Т-клетки путем связывания с активирующим рецептором NKG2D, экспрессированным на этих клетках, или за счет прямого распознавания [29]. Кроме того, $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты также экспрессируют клеточные образ-распознающие рецепторы, такие как Toll-подобные рецепторы, которые модулируют их активацию. V γ 9V δ 2 Т-лимфоциты проявляют свою активность путем TCR-независимого распознавания непептидных фосфорилированных антигенов, которые называются фосфоантигенами и продуцируются многими бактериями или являются продуктом метаболического пути мевалонат-изопреноидов [30]. Эти $\gamma\delta$ -Т-клетки обладают способностью проявлять цитотоксическую активность в отношении инфицированных или трансформированных клеток и продуцировать провоспалительные цитокины, в том числе TNF- α , IL-17 и γ -IFN, стимулируя, таким образом, TH1-ответ, особенно после активации фосфоантигенов [31]. Аналогично NK-клеткам, $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты также экспрессируют рецептор CD16 (FC γ RIII), который активируется после распознавания фосфоантигенов, что приводит к ADCC [32]. Помимо фосфоантигенов, способностью активировать $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты также обладают некоторые другие молекулы, в том числе бромогидринпирофосфат, 4-гидрокси-3-метил-бут-2-энилпирофосфат, моноэтилпирофосфат, дополнительные лиганды, например азот-содержащие бисфосфонаты, алкиламины, молекулы, секретируемые симбиотическими бактериями или молекулами, присутствующими в растительных продуктах — чае, вине, яблоках и грибах [33]. В последнее время механизм активации был показан более четко в результате идентификации мембранно-ассоциированных молекул, экспрессированных на клетках-мишенях, таких как B7-родственные бутирофилиновые молекулы CD277/BTN3A [34]. Поступление Т-инфильтрирующих лимфоцитов к опухоли ассоциируется с потенциалом противоопухолевого ответа. Опухолевые клетки и их микроокружение активно участвуют в инфильтрации за счет секреции цитокинов. Интересно отметить, что V δ 1, V γ 9V δ 2 Т-лимфоциты экспрессируют рецепторы цитокинов CCR5, CCR5 и CXCR3 соответственно [35]. Кроме того, V γ 9V δ 2 Т-лимфоциты экспрессируют другие рецепторы, такие как рецептор NKP1A, молекулы адгезии тромбоцит-эндотелиальных клеток, LFA-1, L-селектин и CD44v6 [34, 36]. Аккумуляция метаболитов мевалоната в некоторых раковых клетках приводит к активации V γ 9V δ 2 Т-лимфоцитов — ситуации,

которая не наблюдается в нормальных клетках. Кроме того, иммунный ответ может модулироваться за счет влияния на метаболический путь мевалоната различных препаратов, в том числе статинов и бисфосфонатов.

Противоопухолевый эффект $V\gamma 9V\delta 2$ Т-лимфоцитов показан на ряде злокачественных опухолей, в частности лимфоидных. Для усиления эффекта $V\gamma 9V\delta 2$ Т-лимфоцитов в иммунотерапии рака применяют две стратегии, в том числе адоптивный перенос клеток после экспансии *in vitro* и терапевтическая активация *in vivo* $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов фосфоантигенами или аминокислотными бисфосфонатами с ИЛ-2 в низких дозах. Проведен метаанализ 13 клинических исследований с участием больных метастатическим раком [37]. Больным с солидными опухолями в основном назначали адоптивную клеточную терапию, а больным гемобластозами вводили $\gamma\delta$ Т-лимфоциты после лекарственной экспансии. В группе адоптивной терапии анализировали дополнительные переменные, относящиеся к источнику клеток, типу экспансии и типу клинического исследования (I фаза, I/II фаза с разными дозами клеток). При солидных опухолях сравнительный анализ эффективности со стандартными режимами терапии показал клиническое преимущество у больных почечноклеточным раком и раком простаты поздних стадий [38]. В группе гемобластозов наблюдалось существенное варьирование степени экспансии у больных множественной миеломой, неходжкинской лимфомой и хроническим лимфоцитарным лейкозом. Было предложено несколько объяснений этого наблюдения, включая число Т-регуляторных клеток, способность $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов реагировать на фосфоантигены, роль TGF- β , который, как известно, снижает экспрессию NKG2D на лимфоцитах [38], а также роль регуляторных $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов [39].

Одно из первых клинических исследований при гемобластозах было опубликовано M. Wilhelm et al., которые отметили хорошую переносимость и высокую частоту эффекта при использовании памидроната и ИЛ-2 в низких дозах [40]. Наша группа показала возможность получения и амплификации *ex vivo* $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов за счет использования бисфосфонатов и ИЛ-2, а также мы обнаружили, что эти клетки способны убивать клетки человеческой миеломы *in vitro* и свежие клетки, полученные у больных множественной миеломой [41]. Мы также провели многоцентровое клиническое исследование II фазы с участием 44 больных рецидивирующей или рефрактерной/рецидивирующей фолликулярной лимфомой (42 и личные данные). Больные получали комбинированную терапию, включающую бромгидринпирофосфат (IPH1101 [InnatePharmaInc., Марсель, Франция]) 750 мг/м² 3 раза в день каждые 3 нед., ИЛ-2 в низких дозах (8 ММЕ ежедневно в течение 5 дней, каждые 3 нед.) и ритуксимаб (375 мг/м² 4 раза в неделю). Клинические характеристики больных были стандартными, медиана возраста составляла 59 лет (39–74 года), 47 % имели низкий индекс FLIPI (47 %), 27 % — низкий или высокий индекс FLIPI, медиана времени после

последней терапии — 19,1 мес. Большинство больных, которым проводили анализ на полиморфизм FcγRIIIa, были носителями F/F. На биологическом уровне у большинства больных выявлялась селективная амплификация CD16+γδТ-лимфоцитов с определенной гетерогенностью, однако пик был зарегистрирован после первого цикла терапии (рис. 1). Амплификация Т-регуляторных клеток не наблюдалась, но отмечалась тенденция к небольшому увеличению числа клеток после третьего цикла лечения. Частота объективного эффекта составила 50 % (местный исследователь — 52,6 %; независимая оценка — 47,4 %), частота полной ремиссии — 26,3 % (рис. 2). На фоне монотерапии ритуксимабом время до максимального эффекта оказалось несколько увеличенным — до 12 мес. после окончания терапии (рис. 3). Максимальные уровни частоты объективного эффекта и частоты полной ремиссии наблюдались у больных с низкими значениями индекса FLIPI (соответственно 57,1 и 33,3 %). Переносимость была отличной, нежелательные явления в основном не превосходили I или II степени, причем в большинстве случаев токсичность была обусловлена введением IL-2. Не выявлено корреляции между биологической активностью и клинической эффективностью, включая максимальное увеличение числа γδТ-лимфоцитов, число γδТ-лимфоцитов до начала терапии, активацию этих клеток, Т-регуляторных клеток, профиль или число циркулирующих цитокинов, исключение составляла максимальная концентрация ритуксимаба на 86-й день, как сообщалось ранее [43]. Синергизм γδТ-лимфоцитов и ритуксимаба также наблюдался и при использовании других новых поколений моноклональных антител к CD20 [44]. Ритуксимаб в режиме монотерапии показал более низкие значения частоты объективного эффекта и менее продолжительный период ремиссии, чем в комбинации с иммунотерапией, в частности с амплификацией γδТ-лимфоцитов при поздних стадиях заболевания [45].

γδТ-лимфоциты — важные клетки, осуществляющие контроль за раковыми клетками и их уничтожение. Помимо свойства пластичности, они обладают способностью взаимодействовать с другими иммунными клетками, в частности NK и DC, имеющими сходные системы формирования ответа, такие как Toll-подобные рецепторы, NKG2D, CD16 и другие рецепторы. На клиническом уровне это значит, что помимо комбинирования с моноклональными антителами может представлять интерес добавление других молекул, например агонистов Toll-подобных рецепторов, либо создание культуральной системы для смешивания этих эффекторных клеток [29, 38, 45–47].

Применение NK-лимфоцитов в иммунотерапии

NK-лимфоциты были впервые идентифицированы в 1975 г. как уникальное подмножество лимфоцитов, отличающееся морфологически и функцио-

нально как от В-, так и Т-лимфоцитов. Для понимания их биологии и функций потребовалось много времени. NK-лимфоциты определяются как CD3⁺CD56⁺-лимфоциты с различными циркулирующими подмножествами, в частности включающими субпопуляции CD56^{bright} и CD56^{dim}. Приблизительно 90 % циркулирующих NK и NK селезенки относятся к подмножеству CD56^{dim}CD16⁺ и проявляют цитотоксическую активность при взаимодействии с клетками-мишенями [48]. В то же время лимфоузлы и миндалины в основном содержат подмножество CD56^{bright}CD16⁻, которое продуцирует цитокины, такие как IFN- γ , в ответ на стимуляцию IL-2, IL-15 и IL-18 [48]. NK-лимфоциты быстро уничтожают клетки-мишени независимо от предшествующей иммунизации или МНС-рестрикции, что позволяет использовать активацию этих клеток в целях иммунотерапии. Этот процесс активации регулируется механизмом балансировки между ингибирующими и активирующими сигналами от различных рецепторов, в том числе рецепторов цитотоксичности NK, рецепторов лектина С-типа (NKG2A/B, NKG2C, NKG2D, NKG2F) и Ig-подобных рецепторов клеток-киллеров (KIR) [48]. Сложность обусловлена тем, что как ингибирующие, так и активирующие молекулы могут принадлежать к одному и тому же семейству. Дело в том, что эти множества активирующих и стохастически экспрессированных ингибирующих рецепторов контролируют различные этапы процесса цитотоксического лимфоцит-опосредованного уничтожения клеток-мишеней, в том числе связывание NK-лимфоцитов с клетками-мишенями, поляризацию литических гранул в направлении клеток-мишеней и дегрануляцию [49, 50]. В доставке сигналов к NK-клеткам существует определенная иерархия, в том числе предварительное соединение NK-клеток с молекулами МНС I класса посредством ингибирующих рецепторов — ситуация, зависящая от числа вовлеченных в процесс ингибирующих рецепторов и прочности связи с МНС, и затем усиление ответа на последующие активирующие стимулы посредством процесса, который называют лицензированием NK-клеток [51–52]. Несмотря на то что NK-клетки функционируют как клетки врожденного иммунитета, появляется все больше данных, указывающих, что они в процессе развития проходят обучение и отбор, а также увеличиваются в количестве в определенных стрессовых ситуациях и могут генерировать долгоживущие клетки памяти [53].

Поскольку NK-клетки играют важную роль в механизмах защиты от инфекций и рака, разрабатываются терапевтические стратегии, использующие определенные иммунные модуляторы, *ex vivo* амплификацию аутологичных NK-клеток и инъекции аллогенных амплифицированных и активированных *in vivo* NK-клеток при помощи цитокинов, таких как IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 и IFN- γ [54, 55]. В результате такой стимуляции клетки становятся лимфокин-активированными или цитокин-активированными клетками-кил-

лерами, если добавить к культуре IFN- γ за 24 ч до стимуляции антителами к CD3 плюс IL-2 [56, 57]. Цитотоксичная активность цитокин-активированных клеток-киллеров более чем в 70 раз превышает активность лимфокин-активированных киллеров [57, 58]. Для лизиса опухолевых клеток требуется 2×10^{11} лимфокин-активированных киллеров и всего $0,5\text{--}5 \times 10^{10}$ цитокин-активированных клеток-киллеров [57]. Цитокин-активированные клетки-киллеры представляют собой смесь Т-, NKT- и NK-клеток, все из которых экспрессируют также CD16, CD45RA, CR7, CD27, CD28 и другие разнообразные маркеры.

Для получения большинства NK-клеток необходимо удалить Т-клетки. В связи с тем что применение аллогенных Т-клеток ассоциируется с реакцией «трансплантат против хозяина», для ограничения этого осложнения максимальное число Т-клеток не должно превышать $1 \times 10^3/\text{кг}$ [59, 60]. Целью ранних исследований была амплификация и активация противоопухолевой активности аутологичных NK-клеток. Для того чтобы ограничить экспансию Т-регуляторных клеток в лимфокин-активированных киллерах, необходимо осуществить адоптивный перенос *ex vivo* амплифицированных чистых NK-клеток. В лечении острого миелоидного лейкоза и множественной миеломы был применен альтернативный терапевтический подход с использованием моноклональных антител к KIR, которые блокируют NK-клетки, экспрессирующие ингибирующие рецепторы, специфичные для MHC-1 [61]. Впервые KIR-мисматч был проанализирован у больных, перенесших аллотрансплантацию; результаты показали повышение выживаемости, снижение вероятности инфекций, снижение числа случаев реакции «трансплантат против хозяина» и рецидивов у больных с этой характеристикой независимо от других факторов [62, 63]. Аллогенные NK-клетки с KIR-мисматч демонстрируют повышенную противоопухолевую активность, особенно при остром миелоидном лейкозе [60, 64]. При условии минимальной контаминации Т- и В-клеток переносимость была отличной. Клиническая эффективность отмечена при различных гемобластозах и солидных опухолях [54].

В целях упрощения процедуры культивируют клеточные линии NK. Среди NK-клеточных линий с активностью против злокачественных опухолей регистрацию FDA получила линия NKG2, показавшая потенциал для противоопухолевой эффективности и безопасность применения. Как следствие, клеточную линию NKG2 стали использовать в качестве платформы для исследований противоопухолевой иммунотерапии на основе NK-клеток [54].

Остаются нерешенными вопросы относительно происхождения NK-клеток, используемых в качестве лекарственных препаратов (из периферической или пуповинной крови), способа амплификации и активации, доступности локализации опухоли и числа клеток, необходимых для уничтожения опухолевых клеток — параметров, определяющих биологическую эффек-

тивность терапевтической стратегии. В последнее время было показано, что НК-клетки из пуповинной крови представляют разные субпопуляции, в том числе клетки-предшественники, которые можно стимулировать и амплифицировать для проведения клинических исследований [65, 66]. Мисматч-KIR-лиганд главным образом обусловлен лигандами четырех форм KIR: KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1 и KIR3DL2 [67]. Адоптивную инфузионную терапию НК проводили у больных острым миелоидным лейкозом, неходжкинской лимфомой и пациентов с солидными опухолями молочной железы, яичников, легкого и толстой кишки [68]. В настоящее время в разных странах мира осуществляется ряд программ. Селекцию НК можно проводить при помощи селекционных систем клинического класса, например очистительных колонок. Амплификацию обычно проводят при помощи различных цитокинов: IL-2 и/или IL-15, IL-18 и IFN. Активацию НК-клеток можно выполнять различными способами, в частности с использованием клеточной линии K562 или EBV-лимфобластоидных клеточных линий [69, 70 и личные данные].

Применение прямой и непрямой активации цитотоксических Т-клеток в иммунотерапии

Опухолеспецифичные CD8 цитотоксические Т-лимфоциты генерируются в результате повторной стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови опухоль-ассоциированными антигенами, экспрессирующими антиген-представляющие клетки, например DC, и некоторыми цитокинами, в том числе IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 и IL-21 [71]. Идентифицированы опухоль-ассоциированные антигены, причем некоторые из них применяются в программах вакцинации [72]. DC представляют собой популяцию клеток, отличающихся высокой степенью гетерогенности, выраженной пластичностью, но имеющих общие морфологические особенности. Созревание моноцитов до DC обусловлено несколькими механизмами, в том числе действием цитокинов; этот процесс включает представление антигена и участие нескольких типов клеток, играющих центральную роль в коммуникации между клетками, в частности Т-клеток [73]. Аутологичные зрелые DC могут быть получены *ex vivo* при обработке опухоль-ассоциированных антигенов или клеточными лизатами. Кратко процесс выглядит следующим образом: методом афереза получают мононуклеарные клетки периферической крови, культивируют сначала в присутствии GM-CSF и IL-4 или IL-13 в течение 5–7 дней, затем на втором этапе культивирования добавляют белки или лизаты опухолевых клеток, РНК, апоптотические клетки или опухоль-ассоциированные антигены, после чего добавляют TNF- α , CD40L или агонистичные моноклональные антитела к CD40 плюс Poly-IC и культивируют еще 2 дня, как показано на рис. 4 [74].

Активация DC приводит к повышению экспрессии молекул класса I и II MHC, CD63, CD80, CD86, CCR7 и снижению экспрессии молекул CD14, а также секреции мириадом цитокинов и хемокинов, в том числе IFN, TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-10 IL-12 и IL-23, способных управлять иммунным ответом. Для производства терапевтических вакцин, зарегистрированных FDA (Sipuleucel-T), используют альтернативный подход: аутологичные моноклеарные клетки периферической крови инкубируют с белком слияния GN-CSF кислой фосфатазы простаты, который запускает процесс созревания моноцитов до DC. В ходе рандомизированного исследования показано, что этот терапевтический подход обеспечивает повышение медианы выживаемости на 4,1 мес. при раке простаты, резистентном к кастрации, по сравнению с контрольной группой [75]. Levy et al. провели расширенные исследования, начиная с идиотипической вакцинации в комбинации с иммунными адьювантами — гемоцианином морского моллюска фиссуреллии и GM-CSF или с DC с идиотипической нагрузкой [76, 77]. Проведено несколько исследований III фазы, в том числе по оценке ритуксимаба, которые показали увеличение периода контроля минимального остаточного заболевания [78]. Мы провели исследование II фазы по оценке терапии на основе DC, нагруженных лизатом опухолевых клеток, у больных фолликулярной лимфомой в период рецидива. Лечение получили 11 больных, из них у 2 была зарегистрирована полная ремиссия до вакцинации и у 2 после программы вакцинации (рис. 5). Мы установили также, что в качестве индикатора иммунного ответа можно использовать данные позитронной эмиссионной томографии с [18F] фтордезоксиглюкозой (через 15 дней после вакцинации) [79]. После более 30 лет клинических исследований DC в качестве медиатора вакцинационной терапии при раке клинические результаты оказались неутешительными: частота объективного эффекта составила всего 15 % [80]. Помимо ограниченной клинической эффективности, главное неудобство терапии на основе DC состоит в персонализированном характере метода, что создает проблемы для широкого применения. В связи с этим новый интересный подход, который может объединить преимущества физиологического окружения, представляют активация DC *in vivo* или амплификация активности этих клеток. Данный подход включает также применение иммунных адьювантов, способствующих доставке антигенов — минеральных солей, эмульсий и липосом или иммуностимуляторов, таких как лиганды Toll-подобных рецепторов (особенно агонисты TLR 7/8, например семейство имидазохинолинов [81]), цитокинов, сапонинов, бактериальных экзотоксинов и экзосом [82–86]. Также предметом дискуссии остается место инъекции, однако показано, что при введении в кожу DC, нагруженных *ex vivo*, а также при использовании стратегий на основе DC, активированных *in vivo*, наблюдается усиление иммунного ответа [84]. Изучается эффективность миграции DC к лимфоузлам, которую связывают со степенью зрелости DC и экспрессией CCR7 [87].

На основе всех этих молекул, модифицирующих микроокружение в организме хозяина, создаются новые терапевтические подходы. Первым таким подходом в данном контексте служит лимфодеплеция. Лимфодеплецию можно индуцировать облучением всего тела, немиелоаблативной химиотерапией в качестве дополнительного метода при аллогенной трансплантации, либо, в другом контексте, использованием низкодозной химиотерапии циклофосфамидом, 5-фторурацилом, флударабином, гемцитабином, бортезомибом, со-рафенибом и сунитинибом. В последнее время была показана возможность деплеции Т-регуляторных клеток в результате применения ингибитора фосфоинозитид-3-киназы- δ (PI3K Δ) [88]. Этот препарат обладает преимуществом деплеции Т-регуляторных клеток и клеток-супрессоров из миелоидных клеток. Опухоль-ассоциированные миелоидные клеточные субпопуляции включают клетки-супрессоры из миелоидных клеток на разных этапах дифференцировки, например нейтрофилы, незрелые DC, макрофаги и тучные клетки — все эти клетки продуцируют медиаторы, способные ограничивать иммунный контроль [89]. Разработаны и другие терапевтические стратегии, в том числе с использованием молекул, направленных на Т-регуляторные клетки: анти-CD25, анти-Foxp3, анти-CTLA4, ингибиторы STAT3, регулирующие экспрессию TGF- β и IL-10, или ингибиторы индолеамин-2,3-диоксигеназы [71, 90].

Аналогично культивированию DC, применение специфических цитотоксических Т-лимфоцитов также является персонализированной терапией, представляющей существенные неудобства и требующей совершенствования направленного воздействия на раковые клетки. По этой причине проводятся многочисленные исследования терапевтической эффективности генетически модифицированных Т-лимфоцитов из периферической крови при раке. Цель такого подхода определяется как повышение способности распознавать опухолевые антигены и/или avidности связи с ними. Разработаны две модификации: химерные антигенные рецепторы Т-клеток (CAR-T) и TcR-модифицированные Т-клетки. Клетки CAR-T были разработаны для воздействия на антигены, экспрессированные на поверхности раковых клеток независимо от процессинга и представления HLA [91]. Эта стратегия также обладает способностью обходить препятствие Т-клеточного ответа, в частности в контексте снижения функции иммунного надзора. Функция клеток CAR-T состоит в создании генетического конструктора, кодирующего антиген-связывающий участок моноклональных антител и внутриклеточные компоненты Т-клеточного рецептора, активирующие сигнал после связывания с поверхностными антигенами. Первое поколение состоит из антиген-связывающих областей тяжелых и легких цепей антител, которые сливаются с внутриклеточной сигнальной областью CD3- ζ . Второе поколение добавляет внутрисигнальную область ко-стимулирующей молекулы, а третье поколение объединяет разные сигнальные области

CD3- ζ и ко-стимулирующих молекул, в результате чего повышается avidность Т-клеток к антигенам [92]. Интересно отметить, что стратегия CAR-T ассоциируется с предварительным клиническим эффектом при гемобластозах, включая острый миелоидный лейкоз, за счет воздействия на CD123, цепь IL3-R α [93], хронический лимфоцитарный лейкоз и острый пре-В-лимфобластный лейкоз с CD19 [94, 95]. У 1 больного, получавшего лечение, вскоре развился рецидив со снижением экспрессии CD19 на опухолевых клетках. Это наблюдение наводит ученых на мысль о целесообразности создания разнообразных конструкторов опухолевых антигенов с целью снижения риска рецидива при антиген-отрицательных вариантах опухоли [92]. Применение CAR-T при солидных опухолях находится в начальной стадии; сначала CAR-T индуцировали ко-стимулирующими молекулами, объединяющими CD28 и 4-1BB, для воздействия на ERBB2 у 1 больного раком толстой кишки. К сожалению, больной умер от мультиорганной недостаточности, обусловленной синдромом высвобождения цитокинов [96]. Это драматическое событие можно было предотвратить индукцией апоптоза Т-клеток, например, каспазой-9. Клетки CAR-T также можно подавлять, накапливая иммуносупрессивные клетки в опухолевом микроокружении за счет использования комбинированных подходов.

Концепция TcR-модификации основана на способности генетической модификации лимфоцитов из периферической крови с целью индукции экспрессии TcR, конкретно направленных против нужного антигена, что позволяет таким химерным TcR-T-клеткам атаковать опухолевые клетки в контексте представления антигенных пептидов с MHC-рестрикцией. Эта методология была впервые применена с антигеном MART-1 в лечении меланомы, однако эффект наблюдался реже (13 %), чем при использовании Т-инфильтрирующих лимфоцитов (51–72 %) [92]. Стратегии с применением CAR-T исследовали несколько фармацевтических компаний, исследования показали активность, в частности, при CD19-положительных гемобластозах [9].

В фазах доклинических и ранних клинических исследований проводится изучение клеток CAR-NK; используют перенаправленные человеческие NK-клетки и клеточную линию NK-92 против CD19, CD20, CD38, CD138, CD244, HER2, GD2, EPCAM, CS1, LMAN1 [97–99].

Применение других клеток-эффекторов и мультиподходов

В настоящее время иммунотерапия вступает в новую эру высокой клинической эффективности, однако для решения этой задачи необходимо применять стратегию мультиподходов. Она предусматривает применение альтернативных клеток-эффекторов для активизации клеток, которые могут влиять на другие клетки-эффекторы, либо применение дополнительных молекул,

повышающих их эффективность или снижающих активность иммуносупрессорных клеток.

НКТ-клетки представляют субпопуляцию лимфоцитов с фенотипическими свойствами как Т-, так и НК-клеток, которые выполняют разнообразные функции, что делает эти клетки привлекательными для использования в иммунотерапии. В этой популяции имеется подмножество клеток, которые называют инвариантными НКТ-клетками (iNKT); эти клетки активизируются гликолипидными антигенами, которые представляет CD1d — молекула, присутствующая на поверхности клеток. Эти клетки являются активными клетками-эффекторами, обладающими цитотоксической активностью, и секретируют цитокины, такие как Th1-, Th2- и Th17-подобные ответы, в частности цитокин γ -цепи или CD132 (т.е. IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21-R). Разработан ряд препаратов для активизации этих молекул посредством молекулы CD1d, в том числе синтетические аналоги α -галактозилцерамидов [100, 101].

Иммунная система обладает определенной избыточностью и демонстрирует разнообразные взаимодействия. Добавление большого количества клеток-эффекторов может привести к усилению взаимодействий с другими членами этой сложной системы. Цель комбинированных стратегий состоит в том, чтобы усилить специфическое распознавание, повысить цитотоксическую активность либо снизить иммуносупрессивный эффект. Экспрессия опухоле-ассоциированных антигенов или молекул класса I MHC на поверхности раковых клеток может быть усилена путем эпигенетической модуляции или воздействия на метаболические пути [23, 102]. Распознавание раковых клеток клетками иммунитета потенциально усиливается путем генетической модификации лекарственных клеток, таких как CAR-T и CAR-NK. Усиление иммунной активности опосредовано кооперацией иммунных клеток. Так, подмножество CD56^{bright}CD16^{dim/-} NK-клеток, присутствующих в лимфоузлах, проявляет хелперную активность при продукции IFN- γ , что может привести к усилению эффекта других клеток. Большое значение для иммунотерапии имеет взаимодействие (crosstalk) клеток [103]. Комбинирование моноклональных антител с определенными цитокинами, активирующими DC, может представлять процесс вакцинации *in vivo*, что подтверждается отложенным ответом, наблюдаемым в некоторых клинических исследованиях. Так, например, мы наблюдали прогрессирующее снижение опухолевой массы в течение одного года у пациента, получавшего комбинацию GM-CSF и ритуксимаба, несмотря на то что у этого больного была зарегистрирована краткосрочная ремиссия после монотерапии ритуксимабом [104, личные данные]. Это наблюдение дает основания считать, что ритуксимаб способен усиливать апоптоз опухолевых клеток и GM-CSF участвует в производстве зрелых DC *in vivo*, что может приводить к увеличению продолжительности периода контроля заболевания.

Иммунный ответ может быть усилен в результате блокировки контрольных точек иммунитета, таких как молекулы CTLA-4, PD-1 и их лиганды PD-L1 или PD-L2; Т-клеточный иммуноглобулин и белок 3, содержащий муциновую область (Tim-3); ген-3 активации лимфоцитов (LAG-3) и в последнее время супрессор активации Т-клеток, содержащий V-Ig-домен (VISTA); или родственная карциноэмбриональному антигену молекула-6 клеточной адгезии при меланоме или множественной миеломе [12, 105, 106]. Экспрессия этих маркеров Т-инфильтрирующих лимфоцитов, в частности Т-регуляторных клеток, приводит к снижению чувствительности иммунного контроля за раковыми клетками. Эти молекулы крайне привлекательны как мишени для изменения иммунной толерантности, в частности при противоопухолевой терапии. Моноклональное антитело к CTLA-4 ипилимумаб (Bristol-Myers Squibb) зарегистрировано FDA в марте 2011 г. как средство лечения метастатической меланомы [107], продолжают исследования при солидных опухолях и гемобластозах [108, 109] других молекул (MDX-1106 и CT-011 или пидилизумаб — антитело к PD-1; MDX-1105 — антитело к PD-L1, другие молекулы анти-Tim-3, LAG-3 и VISTA).

Иммунотерапия вступает в новую эру, причем не только в области лечения рака, но также в лечении заболеваний, связанных с изменением иммунитета (рис. 6). Слишком много препаратов, слишком много инструментов, слишком много терапевтических стратегий должны вернуться назад к основам иммунной системы. Что такое иммунные клетки-эффекторы? Как усилить их функцию, не повышая токсичность? Что такое доступность мишеней и как определить оптимальное биоклиническое соотношение эффективности? Назрела необходимость нового мышления.

Литература

1. Ehrlich P. Über den jetzigen stand der Karzinomforschung. Ned Tijdschr Geneekd 1909, 5: 273–90.
2. Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The process of control. Br Med J 1957, 1: 779–86.
3. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. Prog Exp Tumor Res 1970, 13: 1–27.
4. Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. Yale J Biol Med 1982, 55: 329–33.
5. Cooley W. The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the streptococcus erysepelas and the bacillus prodigiosus). Proc R Soc Med 1910, 3(Surg Sect): 1–48.
6. Yoshimoto T, Morishima N, Okumura M, Chiba Y, Xu M, Mizuguchi, J. Interleukins and cancer immunotherapy. Immunotherapy 2009, 5: 825–844.

7. Akdis M, Burgler S, Crameri R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Ouaked N, Schaffartzik A, Van De Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2011, 127: 701–721.
8. Anestakis D, Petanidis S, Kalyvas S, Nday CM, Tsave O, Kioseoglou E, Sa-lifoglou A. Mechanisms and applications of interleukins in cancer immuno-therapy. *Int J Mol Sci* 2015, 16: 1691–1710.
9. Humphries C. Adoptive cell therapy. Honing that killer instinct. *Nature* 2013, 504: S13–15.
10. Stavrou D, Bilzer T, Anzil AP, Hulten M, Kaldrymidou E. Reactivity of tu-mor-infiltrating lymphocytes against syngeneic glioma target cells. *Antican-cer Res* 1981, 1: 125–34.
11. Rosenberg SA. Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer-what clinicians need to know. *Nature Rev Clin Oncol* 2011, 8: 577–85.
12. Makkouk A, Weiner G. Cancer Immunotherapy and breaking immune tole-rance: new approaches to an old challenge. *Cancer Res* 2015, 75: 5–10.
13. Figueroa JA, Reidy A, Mirandola L, Trotter K, Suvorava N, Figueroa A, Konala V, Aulakh A, Littlefield L, Grizzi F, Rahman RL, Jenkins M, Mus-grove B, Radhi S, D'Cunha N, D'Cunha LN, Hemomath PL, Cobos E, Chi-riva-Internati M. Chimeric antigen receptor engineering: a right step in the evolution of adoptive cellular immunotherapy. *Int Rev Immunol* 2015, 34: 154–87.
14. Corthay A. Does the immune system naturally protect against cancer? *Front Immunol* 2014, 5: 1–8.
15. Freeman-Keller M, Weber J. Anti-programmed death receptor 1 immunothe-rapy in melanoma: rationale, evidence and clinical potential. *Ther Adv Med oncol* 2015, 7: 12–21.
16. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99: 12293–97.
17. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypic and functional specialization of FOXP3 regulatory T cells. *Natur Rev Immunol* 2011, 11: 119–30.
18. Saifi M, Maran A, Raynaud P, Picot MC, Quittet P, Cartron G, Rossi JF, Costes V. High ratio of interfollicular CD8/FOXP3-positive regulatory T cells is associated with a high FLIPI index and poor overall survival in folli-cular lymphoma. *Exp Ther Med* 2010, 1: 933–38.
19. Yu X, Li H, Ren X. Interaction between regulatory T cells and cancer stem cells. *Int J Cancer* 2012, 131: 1491–8.

20. *Aptsiauri N, Cabrera T, Mendez R, Garcia-Lora A, Ruiz-Cabello F, Garrido F.* Role of altered of HLA class I molecules in cancer progression. *Adv Exp Med Biol* 2007, 601: 123–31.
21. *Leone P, Shin EC, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V.* MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 2013, 105: 1172–87.
22. *Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau C, Versteegen NJM, Ciampricotti M, Hawinkels LJAC, Jonkers J, de Visser KE.* IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* 2015, Mar 30. doi:10.1038/nature14282.
23. *Heninger E, Krueger TEG, Lang JM.* Augmenting antitumor immune responses with epigenetic modifying agents. *Front Immunol* 2015, 6: 29.
24. *Kortenhorst MS, Wissing MD, Rodriguez R, Katchap SK, Jans JJ, Van der Groep P, Verheul HM, Gupta A, Aiyetan PO, van der Wall E, Carducci MA, Diest PJ, Marchionni L.* Analysis of the genomic response of human prostate cancer cells to histone deacetylase inhibitors. *Epigenetics* 2013, 8: 907–20.
25. *Trumpfheller C, Longhi MP, Caskey M, Idoyaga J, Bozacco L, Keler T, Scheisinger SJ, Steinman RM.* Dendritic cell-targeted protein vaccines : a novel approach to induce T-cell immunity. *J Intern Med* 2012, 271: 183–92.
26. *Bukowski JF, Morita CT, Brenner MB.* Human $\gamma\delta$ T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immunity* 1999, 11: 57–65.
27. *Kunzmann V, Smetak M, Kimmel B, Weigang-koehler K, Goebeler M, Birkman J, Becker J, Schmidt-Wolf IG, Einsele H, Wilhem M.* Tumor-promoting versus tumor-antagonizing rôles of $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy: results from a prospective phase I/II trial. *J Immunother* 2012, 35: 205–13.
28. *He Y, Wu K, Hu Y, Sheng L, Tie R, Wang B, Huang H.* $\gamma\delta$ T cell and other immune cells crosstalk in cellular immunity. *J Immunol Res* 2014, 2014: 960252
29. *Lafont V, Sanchez F, Laprevotte E, Michaud HA, Gros L, Eliaou JF, Bonnefoy N.* Plasticity of $\gamma\delta$ T-cells: impact on the anti-tumor response. *Front Immunol* 2014, 5:622.
30. *Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G.* Human T cell receptor gamma delta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* 2003, 197: 163–8.
31. *Dunne MR, Mangan BA, Madrigal-Estebas I, Doherty DG.* Preferential Th1 cytokine profile of phosphoantigen-stimulated human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Mediators Inflamm* 2010, 2010: 704941.
32. *Lafont V, Liautard J, Liautard JP, Favero J.* Production of TNF-alpha by human V gammaV delta 2 T cells via engagement of Fc gamma RIII, the

- low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen. *J Immunol* 2001, 166: 7190–9.
33. *Gogoi D, Chiplunkar SV.* Targeting gamma delta T cells for cancer immunotherapy: bench to bedside. *Indian J Med Res* 2013, 138: 755–61.
 34. *Harly C, Peigné CM, Scotet E.* Molecules and mechanisms implicated in the peculiar antigenic activation process of human V γ 9V δ 2 T cells. *Front Immunol* 2015, 5: 657.
 35. *Kabelitz D, Wesch D.* Features and functions of gamma delta T lymphocytes: focus on chemokines and their receptors. *Crit Rev Immunol* 2003, 23: 339–70.
 36. *Thomas ML, Badwe RA, Deshpande RK, Samant UC, Chiplunkar SV.* Role of adhesion molecules in recruitment of Vdelta 1 cells from the peripheral blood to the tumor tissue of oesophageal cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2001, 50: 218–25.
 37. *Buccheri S, Guggino G, Caccamo N, Li Donni P, Dieli F.* Efficacy and safety of $\gamma\delta$ cell-based tumor immunotherapy: a meta-analysis. *J Biol Regul Homeost Agents* 2014, 28: 81–90.
 38. *Poggi A, Zocchi MR.* $\gamma\delta$ lymphocytes as a first line of immune defense: old and new ways of antigen recognition and implication for cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2014, 5: 575.
 39. *Wesch D, Peters C, Siegers GM.* Human gamma delta T regulatory cells in cancer: fact or fiction. *Front Immunol* 2014, 5: 598.
 40. *Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, Reimer P, Weissinger F, Ruediger T, Tony HP.* Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003, 102: 200–6.
 41. *Burjandzé M, Condomines M, Reme T, Quittet P, Latry P, Lugagne C, Romagne F, Morel Y, Rossi JF, Klein B, Lu ZY.* In vitro expansion of gamma delta T cells with anti-myeloma cell activity by Phosphostim and IL-2 in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007, 139: 206–16.
 42. *Rossi JF.* A phase I/II study of IPH1101, gamma delta T cell agonist in combination with rituximab re-treatment in patients with low-grade follicular lymphoma. *EHA* 2010.
 43. *Golay J, Semenzato G, Rambaldi A, Foa R, Gaidano G, Gamba E, Pane F, Pinto A, Specchia G, Zaja F, Regazzi M.* Lessons for the clinic from rituximab pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Mabs* 2013, 5: 826–37.
 44. *Braza M, Klein B, Fiol G, Rossi JF.* $\gamma\delta$ T-cell killing of primary follicular lymphoma cells is dramatically potentiated by GA101, a type II glycoengineered anti-CD20 monoclonal antibody. *Haematologica* 2011, 96: 400–7.
 45. *Davis TA, White CA, Grillo-Lopez AJ, Velasquez WS, Link B, Maloney DG, Williams ME, Mohrbacher A, Weaver R, Dowden S, Levy R.* Single-agent

- monoclonal antibody efficacy in bulky non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase II trial of rituximab. *J Clin Oncol* 1999, 17: 1851–7.
46. *Deniger DC, Moyes JS, Cooper LJN.* Clinical applications of gamma delta T cells with multivalent immunity. *Front Immunol* 2014, 5: 636.
47. *Braza MS, Klein B.* Antitumor immunotherapy with $\gamma\delta 9V\delta 2$ T lymphocytes: from the bench to the bedside. *Br J Haematol* 2013, 160: 123–32.
48. *Cooper MA, Fehninger TA, Caligiuri MA.* The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001, 22: 633–40.
49. *Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, Bresso V, Frasseti C, Reviron D, Middleton D, Romagné F, Ugolini S, Vivier E.* Human NK education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 2006, 25: 331–42.
50. *Long EO, Sik Kim H, Peterson ME, Rajagopalan S.* Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 2013, 31: 227–58.
51. *Thomas LM, Peterson ME, Long EO.* Cutting edge: NK licensing modulates adhesion to target cells. *J Immunol* 2013, 191: 3981–85.
52. *Ivarsson MA, Michaëlsson J, Fauriat C.* Activating killer cell Ig-like receptors in health and disease. *Front Immunol* 2014, 5: 184.
53. *Rölle A, Pollmann J, Cerwenka A.* Memory of infections: an emerging role for Natural Killer cells. *Plos* 2013, 9: Issue 9, e1003548.
54. *Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tsian Z.* NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol* 2013, 10: 230–52.
55. *Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y.* Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev* 2004, 202: 275–93.
56. *Ochoa AC, Gromo G, Alter BJ, Sondel PM, Bach FH.* Long-term growth of lymphokine-activated killer (LAK) cells: role of anti-CD3, beta-IL 1, interferon-gamma and -beta. *J Immunol* 1987, 138: 2728–2733.
57. *Jiang J, Wu C, Lu B.* Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity. *J Transl Med* 2013, 11: 83.
58. *Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL.* Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med* 1991, 174: 139–49.
59. *Müller S, Schulz A, Reiss U, Schwartz K, Schreiner T, Wiesneth M, Debatin KM, Friedrich W.* Definition of a critical T cell threshold for prevention of GVHD after HLA non-identical PBPC transplantation in children. *Bone Marrow Transplant* 1999, 24: 575–81.
60. *Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, Pui CH, Leung W.* NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010, 28: 955–59.

61. Korde N, Carlsen M, Lee MJ, Minster A, Tan E, Kwok M, Manasanch E, Bhutani M, Tageja N, Roschewski M, Zingone A, Costello R, Mulquin M, Zuchlinski D, Maric I, Calvo KR, Braylan R, Tembhare P, Yuan C, Stetler-Stevenson M, Trepel J, Childs R, Landgren O. A phase II trial of pan-KIR2D blockade with IPH2101 in smoldering multiple myeloma. *Haematologica* 2014, 99: e81.
62. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295: 2097–2100.
63. Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell alloreactivity and haplo-identical hematopoietic transplantation. *Cytotherapy* 2006, 8: 554–8.
64. Ruggeri L, Mancusi A, Perruccio K, Burchielli E, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell alloreactivity for leukemia therapy. *J Immunother* 2005; 28: 175–182.
65. Verneris MR, Miller J. The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood Natural Killer cells. *Br J Haematol* 2009, 147: 185–91.
66. Merindol N, Charrier E, Duval M, Soudeyons H. Complementary and contrasting rôles of NK cells and T cells in pediatric umbilical cord blood transplantation. *J Leuk Biol* 2011, 90: 49–60.
67. Davies JOJ, Stringaris K, Barrett JA, Revzani K. Opportunities and limitations of natural killer cells as adoptive therapy for malignant disease. *Cytotherapy* 2014, 0: 1–14.
68. Liu Y, Wu HW, Shread M, Spoto R, Somanchi SS, Cooper LJN, Lee DA, Seeger RC. Growth and activation of Natural Killer cells ex vivo from children with neuroblastoma for adoptive cell therapy. *Clin Cancer Res* 2013, 19: 2132–43.
69. Koepsell SA, Miller JS, McKenna DH. Natural cells: a review of manufacturing and clinical utility. *Transfusion* 2013, 53: 404–10.
70. Park KU, Jin P, Sabatino M, Feng J, Civini S, Khuu H, Berg M, Childs R, Stroncek D. Gene expression analysis of ex-vivo expanded and freshly isolated NK cells from cancer patients. *J Immunother* 2010, 33: 945–55.
71. Chung DS, Shin HJ, Hong YK. A new hope in immunotherapy for malignant gliomas: adoptive T cell transfer therapy. *J Immunol Res* 2014, 2014: 326545.
72. Tagliamonte M, Petrizzo A, Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L. Antigen-specific vaccines for cancer treatment. *Human Vaccin Immunother* 2014, 10: 3332–46.
73. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of the immunity. *Nature* 1998, 392: 245–52.
74. Tarte K, Fiol G, Rossi JF, Klein B. Extensive characterization of dendritic cells generated in serum-free conditions: regulation of soluble antigen up-

- take, apoptotic tumor cell phagocytosis, chemotaxis and T cell activation during maturation in vitro. *Leukemia* 2000, 14: 2182–92.
75. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, Frohlich MW, Schellhammer PF. Sipuleucel-T immunotherapy for castration resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010, 363: 411–22.
76. Maloney DG. Follicular NHL: from antibodies and vaccines to graft-versus-lymphoma effects. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007, 226–32.
77. Bendandi M. Anti-idiotypic vaccines for human follicular lymphoma. *Leukemia* 2000, 14: 1333–9.
78. Thomas SK, Kwak LW. Lymphoma vaccine therapy: next steps after a positive, controlled phase III clinical trial. *Semin Oncol* 2012, 39: 253–62.
79. Baudard M, Comte F, Conge AM, Mariano-Goulart D, Klein B, Rossi JF. Importance of [18F]fluorodeoxyglucose-positron emission tomography scanning for the monitoring of responses to immunotherapy in follicular lymphoma. *Leuk Lymph* 2007, 43: 381–8.
80. Anguille S, Smits EL, Lion E, van Tendeloo VF, Berneman ZN. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol* 2014, 15: e257–67.
81. Schön MP, Schön M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene* 2008, 27: 190–99.
82. Wimmers F, Schreiber G, Sköld AE, Figdor CG, De Vries IJ. Paradigm shift in dendritic cell-based immunotherapy: from in vitro generated monocyte-derived DCs to naturally circulating DC subsets. *Front Immunol* 2014, 5: 165.
83. Dubensky TW Jr, Reed SG. Adjuvants for cancer vaccines. *Semin Immunol* 2010, 22: 155–61.
84. Ciocca DR, Frayssinet P, Cuellar-Carrion FD. A pilot study with a therapeutic vaccine based on hydroxyapatite ceramic particles and self-antigens in cancer patients. *Cell Stress & Chaperones* 2007, 12: 33–43.
85. Pizzurro GA, Barrio MM. Dendritic cell-based vaccine efficacy: aiming for hot spots. *Front Immunol* 2015, 6: 91.
86. Romagnoli GG, Zelante BB, Toniolo PA, Migliori IK, Barbutto JAM. Dendritic cell-derived exosomes may be a tool for cancer immunotherapy by converting tumor cells into immunogenetics targets. *Front Immunol* 2015, 5: 692.
87. Sanchez-Sanchez N, Riol-Blanco L, Rodriguez-Fernandez JL. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol* 2006, 176: 5153–9.
88. Ali K, Soond DR, Pineiro R, Hagemann T, Pearce W, Lim EL, Bouabe H, Scudamore CL, Hancox T, Maecker H, Friedman L, Turner M, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. Inactivation of PI(3)K p110 δ breaks regulatory T-cell-mediated immune tolerance to cancer. *Nature* 2014, 510: 407–13.

89. Liu X, Shin N, Koblisch HK, Yang G, Wang Q, Wang K, Leffet L, Hansbury MJ, Thomas B, Rupar M, Waeltz P, Bowman KJ, Polam P, Sparks RB, Yue EW, Li Y, Wynn R, Fridman JS, Bum TC, Combs AP, Newton RC, Scherle PA. Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood* 2010, 115: 3520–30.
90. Medina-Echeverez J, Aranda F, Berraondo P. Myeloid-derived cells are key targets of immunotherapy. *OncoImmunol* 2014, 3: e28398.
91. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 10024–28.
92. Payne KK, Bear H, Manjili M. Adoptive cellular therapy of cancer: exploring innate and adaptive cellular crosstalk to improve anti-tumor efficacy. *Future Oncol* 2014, 10: 1779–94.
93. Mardiros A, Dos Santos C, McDonald T, Brown CE, Wang X, Budde LE, Hoffman L, Aguilar B, Chang WC, Bretzjaff W, Chang B, Jonalaggada M, Starr R, Ostberg JR, Jensen MC, Bhatia R, Forman SJ. T cell expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and anti-tumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood* 2013, 122: 3138–48.
94. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, June CH. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Transl Med* 2011, 3: 95ra73.
95. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2013, 368: 1509–1518.
96. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurence CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 2010, 18: 843–51.
97. Glienke W, Esser R, Priesner C, Suerth JD, Schambach A, Wels WS, Grez M, Kloess S, Arseniev L, Koehl U. Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells. *Front Immunol* 2015, 6: 21.
98. Klingemann H. Are natural killer cells Superior CAR drivers? *OncoImmunol* 2014, 3: e28147.
99. Jiang H, Zhang W, Shang P, Zhang H, Fu W, Ye F, Zeng T, Huang H, Zhang X, Sun W, Man-Yuen Sze D, Yi Q, Hou J. Transfection of chimeric anti-CD138 natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells. *Mol Oncol* 2014, 8: 297–310.
100. Carreno LJ, Kharkwal SS, Porcelli SA. Optimizing NKT cell ligands as vaccine adjuvants. *Immunotherapy* 2014, 6: 309–20.

101. Fujii S, Shimizu K, Okamoto Y, Kunii N, Nakayama T, Motohashi S, Taniguchi M. NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Front Immunol* 2013, 4: 409.
102. Charni S, de Bettignies G, Rathore MG, Aguilo JI, van den Elsen PJ, Haouzi D, Hipskind RA, Enriquez JA, Sanchez-Beato M, Pardo J, Anel A, Villalba M. Oxidative phosphorylation induces de novo expression of the MHC class I in tumor cells through the ERK5 pathway. *J Immunol* 2010, 185: 3498–503.
103. Pampena MB, Levy EM. Natural killer cells as helper cells in dendritic cell cancer. *Front Immunol* 2015, 6: 13.
104. Cartron G, Lu ZY, Baudard M, Kanouni T, Rouillé V, Quittet P, Klein B, Rossi JF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiates rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: results of a phase II study. *J Clin Oncol* 2008, 26: 2725–31.
105. Lines JL, Sempere LF, Broughton T, Wang L, Noelle R. VISTA is a novel broad-spectrum negative checkpoint regulator for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Res* 2014, 2: 510–17.
106. Witzens-Harig M, Hose D, Junger S, Pfirschke C, Khandelwai, Umansky L, Seckinger A, Conrad H, Brackertz B, Reme T, Gueckel B, Meibner T, Hundemer M, Ho AD, Rossi JF, Neben K, Bernhard H, Goldschmidt H, Klein B, Beckhove P. *Blood* 2013, 121: 4493–503.
107. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010, 363: 711–23.
108. Armand P, Nagler A, Weller EA, Devine SM, Avigan DE, Chen YB, Kaminski MS, Holland HK, Winter JN, Mason JR, Fay JW, Rizzieri DA, Hosing CM, Ball ED, Uberti JP, Lazarus HM, Mapara MY, Gregory SA, Timmerman JM, Andorsky D, Or R, Waller EK, Roten-Yehudar R, Gordon LL. Disabling immune tolerance by programmed death-1 blockade with pidilizumab after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: results of an international phase II trial. *J Clin Oncol* 2013, 31: 4199–206.
109. Westin JR, Chu F, Zhang M, Fayad LE, Kwak LW, Fowler N, Romaguera J, Hagemester F, Fanale M, Samaniego F, Feng L, Baladandayathapani V, Wang Z, Ma W, Gao Y, Wallace M, Vence LM, Ravanyi L, Muzzafar T, Roten-Yehudar R, Davis RE, Neelapu SS. Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014, 15: 69–77.

Иванова А.С.¹, Пучкова Н.Г.¹, Некрасов А.В.¹, Гурковская Я.И.¹, Апрятина В.А.¹,
Пащенко М.В.², Дагиль Ю.А.², Мастернак Т.Б.², Пинегин Б.В.², Абрамова М.А.²

МЕХАНИЗМЫ АДЬЮВАНТНЫХ ЭФФЕКТОВ ПОЛИОКСИДОНИЯ

¹ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия, Москва

²ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

Ключевые слова: полиоксидоний, адъювант, иммуномодулятор, иммунодефицит.

Список сокращений

АГ — антиген

АОК — антителообразующие клетки

АТ — антитело

ЛПС — липополисахариды

МНС — главный комплекс гистосовместимости

ПО — полиоксидоний

ЭБ — эритроциты барана

ДС — дендритные клетки

IFN — интерферон

IL — интерлейкин

NF-κB — фактор транскрипции

NK — естественные киллеры

TNF — фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor)

Резюме

В соответствии с европейским руководством по адъювантам (Guideline on adjuvants in vaccines for human use EMEA/CHMP/VEG/134716/2004) проведено углубленное исследование адъювантных свойств иммуномодулятора полиоксидония (ПО). ПО разрешен к медицинскому применению как иммуномодулятор в РФ и ряде других стран и как адъювант в составе семейства гриппозных вакцин Гриппол® [1].

Цель настоящего обзора — суммирование имеющихся на сегодня данных о механизмах адъювантных эффектов ПО на клеточном и молекулярном уровне.

A.S. Ivanova¹, N.G. Puchkova¹, A.V. Nekrasov¹, Ya.I. Gurkovskaya¹, V.A. Apyatina¹,
M.V. Paschenkov², Yu.A. Dagil², T.B. Masternak², B.V. Pinegin², M.A. Abramova.²

POLYOXIDONIUM ADJUVANT EFFECT MECHANISMS

¹ OOO NPO Petrovax Pharm, Moscow, Russia

² National Research Center — Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia.

Key words: polyoxidonium, adjuvant, immunomodulator, immunodeficiency.

List of abbreviations

AB — antibody
AFC — antibody-forming cells
AG — antigen
DC — dendritic cells
IFN — interferon
IL — interleukin
LPS — lipopolysaccharide
MHC — main histocompatibility complex
MNC — mononuclear cells
NF-Kb — transcription factor
NK — natural killers
PO — polyoxidonium
SE — sheep erythrocytes
TNF — tumor necrosis factor

Abstract

We have performed a comprehensive study of immunomodulator Polyoxidonium (PO) adjuvant use in accordance with the European Guidelines on Adjuvants in Vaccines for Human Use (EMA/CHMP/VEG/134716/204). PO is approved for medical administration as an immunomodulator in the RF and other countries and as an adjuvant within the *Grippol* family of influenza vaccines [1].

This overview summarizes data on mechanisms of PO adjuvant effects at cellular and molecular levels as accumulated by today.

Было показано, что при введении ПО в комплексе с корпускулярным антигеном (АГ) — эритроцитами барана (ЭБ) происходит увеличение в селезенке иммунизированных мышей числа антителообразующих клеток (АОК) в 2–4 раза. В комплексе с этим АГ ПО восстанавливает иммунный ответ у старых и бестимусных мышей линии nude. Такой же восстановительный эффект наблюдается при экспериментальных иммунодефицитах, созданных с помощью рентгеновского облучения или введения иммунодепрессанта циклофосфана. При иммунизации растворимым АГ гемагглютинином вируса гриппа в комплексе с ПО наблюдается усиление синтеза антител (АТ) у низкоотвечающих линий мышей CC57W и СВА. У мышей линии СВА синтез АТ усиливается почти 4,5 раза. Наибольший стимулирующий эффект наблюдается при конъюгации гемагглютинаина вируса гриппа с ПО. У мышей линии СВА синтез АТ в этом случае усиливается почти в 20 раз.

ПО усиливал иммунный ответ не только в комплексе, но и в конъюгации с АГ. При иммунизации мышей конъюгатом ПО и рекомбинантного белка теплового шока HSP70, используемым в противотуберкулезных вакцинах, наблюдается усиление синтеза АТ почти в 40 раз по сравнению с иммунизацией одним АГ.

При изучении клеточных и молекулярных механизмов иммуномодулирующего и адьювантного эффекта ПО было показано множественное действие ПО на клетки как врожденного, так и приобретенного иммунитета. ПО проникает в эндосомальный отдел клеток, в результате чего происходит повышение микромолярных концентраций перекиси водорода, служащей активатором ряда сигнальных молекул и транскрипционных факторов, в частности фактора NF-κB. При этом исследование антиоксидантных свойств показало, что ПО, обладая свойством хелатирования Fe^{2+} и окисления Fe^{2+} в Fe^{3+} , способен ингибировать катализ свободнорадикальных реакций и тем самым тормозить свободнорадикальное окисление, что создает условия для достижения микромолярных концентраций активных форм кислорода в цитоплазме клеток и активации свободнорадикального механизма синтетических процессов. Следствием этого является способность ПО оказывать стимулирующий и костимулирующий эффект на такие инициирующие цитокины, как IL-1β и IL-6. На TNF-α ПО оказывает эффект только в случае его исходного пониженного уровня. При повышенном уровне TNF-α ПО не стимулирует его дальнейший синтез. Более того, может наблюдаться некоторое понижение синтеза TNF у людей с исходно повышенным синтезом. ПО индуцирует синтез цитокинов как в культуре мононуклеаров периферической крови, так и макрофагов. В культуре дендритных клеток ПО усиливает экспрессию костимулирующих молекул CD80 и CD86, от которых в значительной степени зависит образование иммунологического синапса между АГ-представляющими клетками и лимфоцитами и, следовательно, инициация иммунного ответа.

Administration of PO together with corpuscular antigen (AG), sheep erythrocytes was shown to induce a 2 to 4-fold increase in antibody-forming cell (AFC) number in mouse spleen. PO administered in complex with this AG recovered immune response in old and nude mice. A similar recovery effect was observed in animals with experimental x-ray- or cyclophosphamide-induced immunodeficiency. Immunization with soluble AG, influenza virus hemagglutinin in complex with PO led to enhanced antibody (AB) synthesis in low-response murine lines CC57W and CBA. The AB synthesis in CBA mice increased by almost 4.5-fold. Maximum stimulation was observed as a result of conjugation of influenza virus hemagglutinin with PO. AB synthesis in CBA mice demonstrated an almost 20-fold rise.

PO increased immune response both in complex and in conjugation with AG. Immunization of mice with PO conjugate with recombinant heat shock protein HSP70 used in tuberculosis vaccines led to an almost 40-fold rise in AB synthesis as compared to immunization with AG alone.

Study of cellular and molecular mechanisms of PO immunomodulating and adjuvant effects demonstrated multiple effects of PO on cells involved both in innate and acquired immunity. PO penetrates into cell endosomal segment thus increasing micromolecular concentrations of hydrogen peroxide, an activator of some signal molecules and transcription factors, in particular NF- κ B. Study of PO antioxidant activity demonstrated that PO could chelate Fe^{2+} and oxidize Fe^{2+} into Fe^{3+} , inhibit catalysis of free radical reactions and thus slow down free radical oxidation which provided conditions for micromolecular concentrations of oxygen active forms in cell cytoplasm and activation of free radical mechanism of synthetic processes. As a consequence, PO produced stimulating and costimulating effects on initiating cytokines, such as interleukin (IL)-1 β and IL-6. PO had effect on tumor necrosis factor (TNF) α only if its baseline levels were decreased. If the level was increased, PO failed to stimulate its further synthesis. Moreover some patients with increased synthesis might present with a somewhat decreased TNF synthesis. PO induced cytokine synthesis both in peripheral blood mononuclear (MNC) and macrophage culture. In dendritic cell (DC) culture PO enhanced expression of costimulating molecules CD80 and CD86 that plaid an important role in generation of immunological synapse between AG-presenting cells and lymphocytes and consequently in immune response initiation.

Другое свойство ПО заключается в его способности примировать дендритные клетки. При совместном культивировании CD4 Т-хелперов с ПО и гемагглютинином вируса гриппа такие клетки приобретают повышенную способность синтезировать IFN- γ под влиянием этого АГ. Кроме того, такие клетки обладают выраженной способностью активировать пролиферацию CD4 Т-клеток под влиянием гемагглютинаина вируса гриппа.

Таким образом, адъювантные свойства ПО связаны со способностью индуцировать ряд провоспалительных цитокинов, активирующих клетки как врожденного, так и адаптивного иммунитета, а также с его способностью усиливать антигенпрезентирующие свойства дендритных клеток.

Характеристика полиоксидония

Физико-химические свойства

Полиоксидоний — физиологически активное высокомолекулярное соединение из нового класса гетероцепных алифатических полиаминов. По своей химической структуре это сополимер N-окиси 1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиметил)-1,4-этиленпиперазиния бромид. Этот водорастворимый полимер имеет молекулярную массу 60–100 kD.

ПО умеренно растворим в воде, физиологическом растворе, новокаине, метаноле. Наличие N (окисной группы) в основной цепи ПО обуславливает его способность к деструкции. Показано, что деструкция ПО протекает по свободнорадикальному механизму. Продуктами деструкции служат нетоксичные олигомеры — N-оксиды с молекулярной массой 1–2 kD.

Детальный контроль структуры и чистоты соединения, а также профиль примесей изучены Европейским исследовательским центром (Direction Centrale recherche & Technologie, Bruxelles). Посерийный анализ ПО показал, что это вещество, получаемое путем контролируемого синтеза, полностью соответствует заявленной спецификации, а методы, используемые для контроля, адекватны. Для каждой примеси (оценивался ионный состав) показано, что содержание в одной человеческой дозе значительно (как минимум более чем в 1000 раз) ниже установленных допустимых стандартных пределов. Сделано заключение, что профиль безопасности примесей, содержащихся в ПО, не вызывает сомнений при применении препарата.

PO also demonstrated the ability to prime DC. After CD4 T-helpers were cultured with PO and influenza virus hemagglutinin, these cells acquired an enhanced ability to synthesize interferon (IFN) γ under the effect of this AG. Besides, these cells showed a marked ability to enhance proliferation of CD4 T-cells under the effect of influenza virus hemagglutinin.

Thus, PO adjuvant properties are associated with the ability to induce several proinflammation cytokines activating cells of both innate and adaptive immunity, as well as with the ability to enhance AG-presentation properties of DC.

Polyoxidonium characterisation

Physicochemical properties

PO is a physiologically active high-molecular weight compound from a new class of heterochain aliphatic polyamines. By chemical structure it is a copolymer of N-oxi 1,4-ethylenepiperasine and (N-carboxymethyl)-1,4-ethylene piperasine bromide. This water-soluble polymer has a molecular weight of 60 to 100 kD.

PO is moderately soluble in water, saline, novocain, methanol. The presence of N-oxide group in the main chain is responsible for the ability of self destruction. PO destruction occurs by a free radical mechanism. Destruction products include non-toxic N-oxide oligomers with a molecular weight 1 to 2 kilodalton.

The Direction Centrale Recherche & Technologie, Brussels, made a detailed study of the compound structure and purity. Serial PO analysis demonstrated that this substance produced as a result of controlled synthesis was stable and fully complied with the submitted specifications, and the control methods were adequate. Each admixture (as measured by ionic composition) had a content in a single human dose considerably (at least more than 1000-fold) lower than established standard limits. It was concluded that the PO admixture profile raised no concerns about the product safety.

Фармакокинетика

При изучении фармакокинетики при подкожном и внутримышечном введении ПО было обнаружено его пролонгированное всасывание из места введения. ПО выводится преимущественно почками в две фазы. Период полувыведения быстрой фазы — 1,5 ч, медленной — 84 ч. В течение первых суток из организма выводится около 45 % препарата. Установлена значительная гетерогенность в распределении ПО в 27 изученных органах и тканях и отсутствие тканевой кумуляции. Наибольший коэффициент распределения ПО установлен (по убывающей) в почках, печени, селезенке, легких, лимфатических узлах, кишечнике.

Связывание с антигенами

Структура ПО позволяет осуществлять прочное связывание с АГ различной природы с сохранением нативной структуры АГ и антигенной специфичности. Существует 2 основных способа связывания ПО с АГ — конъюгация и комплексообразование.

Для ряда АГ разработаны методики синтеза конъюгатов, позволяющие получать очищенные конъюгаты с высоким выходом, контролируемым количеством и характером химических связей. Для каждого конъюгата подбирается состав с учетом иммунологических и общебиологических свойств получаемых иммуногенов. Технология синтеза конъюгатов, а также их характеристика подробно описаны в соответствующих документах.

В отношении комплексообразования также проведены обширные исследования, свидетельствующие об образовании стабильных комплексов ПО, формирование которых осуществляется путем взаимодействия заряженных функциональных групп белковых или полисахаридных АГ с «якорными» группами ПО.

Краткая информация по безопасности

Доклиническое изучение безопасности применения субстанции ПО проведено в соответствии с требованиями Минздрава РФ. Установлено, что ПО относится к V классу практически нетоксичных соединений (LD_{50} для мышей при внутривенном введении составляет 1417 мг/кг).

Препарат обладает огромной широтой терапевтического эффекта. Однократное введение в дозе 50 мг/кг (приблизительно в 200 раз превышающей терапевтическую дозу) не вызывает у подопытных животных изменений в ЦНС, сердечно-сосудистой системе, костном мозге и периферической крови, обезвреживающей функции печени. В органе-мишени ПО, в почках, при введении этой дозы (50 мг/кг) гистологическими исследованиями выявляются капиллярно-венозное полнокровие без повреждения структур нефронов.

Pharmacokinetics

Pharmacokinetic study of PO after subcutaneous and intramuscular (i.m.) administration demonstrated prolonged absorption from the injection site. PO is mainly eliminated through kidneys in a two-compartment manner. Distribution half-life is 1.5 hours and elimination half-life is 84 hours. About 45 % of the drug is eliminated within the first 24 hours. PO distribution in 27 organs and tissues studied showed a marked variability and no accumulation in tissues. PO demonstrated maximum coefficient of distribution (in descending order) in kidneys, liver, spleen, lungs, lymph nodes, intestine.

Antigen binding

PO structure allows strong binding with various AGs without affecting their native structure or specificity. There are 2 main ways of PO-AG binding, i.e. conjugation and complexing.

Procedures for conjugate synthesis have been developed for some AGs that allow a high-output production of pure conjugates with controllable quantity and character of chemical bounds. Composition of every conjugate is selected taking into account immunological and general biological properties of resulting immunogens. The conjugate synthesis procedures and characteristics are described in detail in appropriate documentation.

There was a vast study of complexing processes demonstrating generation of PO stable complexes through interaction of charged functional groups of protein or polysaccharide AGs with PO anchor groups.

Safety summary

Preclinical safety study of PO substance was made in accordance with Health Ministry requirements. PO was attributed to class V of practically non-toxic compounds (LD50 for mice after intraperitoneous administration was 1417 mg/kg).

The drug demonstrated the broadest spectrum of therapeutic effects. A single dose 50 mg/kg (about 200-fold higher than the therapeutic dose) induced no changes in CNS, cardiovascular system, bone marrow or peripheral blood, liver detoxication function in experimental animals. Histological study found capillary-venous plethora without damage to nephron structure in kidneys, PO target organ after administration of 50 mg/kg.

Подострый эксперимент на крысах обоего пола позволил установить, что двухнедельное ежедневное введение ПО в дозе 25 мг/кг (100-кратное превышение терапевтической дозы) вызывает незначительное (на 6 %) отставание в приросте массы тела, стимулирует ориентировочные реакции, вызывает некоторое повышение тонуса нервно-мышечного аппарата, не влияет на болевую чувствительность, функции сердечно-сосудистой системы, клеточные элементы костного мозга и периферической крови. Не обнаружено влияния ПО на белковый, углеводный, липидный и минеральный обмены. При стократной передозировке ПО выявляется достоверное увеличение в сыворотке крови мочевины без нарушения экскреторных функций почек для белка, креатинина, хлоридов. Стимуляция иммунитета при введении ПО в организм не сопровождается индукцией иммунных реакций на собственные детерминанты ПО. Так, не было зарегистрировано клеточных иммунных реакций, специфических в отношении ПО. Более того, многократные инъекции ПО мышам и морским свинкам не вызвали аллергических реакций немедленного или замедленного типа. У ПО не выявлено пирогенной активности, раздражающего действия, аллергизирующих, мутагенных, тератогенных и канцерогенных свойств.

С 1996 года ПО (в дозах 3 и 6 мг) разрешен к применению как самостоятельный препарат [1, 2].

Биологическая активность полиоксидония

Адьювантный эффект на корпускулярный антиген

Адьювантную активность ПО оценивали по влиянию препарата на уровень АОК в селезенке мышей-гибридов (СВА × С57В1/6) F₁ при внутрибрюшинном введении им ЭБ в субоптимальной дозе 5×10^6 [3].

ПО вводили внутрибрюшинно или подкожно одновременно с иммунизацией. Стимулирующий эффект выражали в виде индекса стимуляции количества АОК по сравнению с аналогичным показателем у животных, которым вместо препарата вводили физиологический раствор.

Установлено, что ПО при внутрибрюшинном введении в дозах 10, 100 и 1000 мкг усиливает антителообразование в 3–6 раз (рис. 1). Подкожная инъекция увеличивала количество АОК в селезенке в 2–4 раза при введении препарата в дозах 100 и 1000 мкг на мышшь.

Адьювантный эффект у животных с различными видами иммунодефицита

О влиянии ПО на функционирование иммунной системы у мышей с индуцированными различными способами иммунодефицитными состояниями судили по способности к накоплению в селезенке АОК при иммунизации ЭБ.

Subacute administration to mice of both genders demonstrated that PO daily injections at 25 mg/kg (a 100-fold therapeutic dose) for 2 weeks slowed down slightly (6 %) body weight increase, stimulated orientation reactions, induced some increase in neuromuscular tonus, had no effect on pain sensitivity, cardiovascular functions, bone marrow or peripheral blood cell elements. PO produced no effect on protein, carbohydrate, lipid or mineral turnover. A 100-fold overdosage resulted in a significant increase in serum urea without damage to renal excretory function for protein, creatinine, chlorides. Immunity stimulation due to PO administration is not associated with induction of immune reactions to PO self determinantes. There were no PO-specific cellular immune reactions. Moreover, multiple PO dosing in mice and guinea pigs did not induce immediate or delayed allergic reactions. PO demonstrated no pyrogenic, irritative, allergenic, mutagenic, teratogenic or carcinogenic activities.

Since 1996 PO (at 3 and 6 mg) was approved as a single agent therapy [1, 2].

Polyoxidonium biological activity

Adjuvant effect on corpuscular antigen

PO adjuvant activity was assessed by its effect on AFC levels in the spleen of hybrid mice (CDA × C57Bl/6) F1 after intraperitoneous administration of SE at a suboptimal dose 5×10^6 [3].

PO was administered by intraperitoneous or subcutaneous injection together with immunization. The stimulating effect was expressed as AFC stimulation index as compared to animals receiving saline instead of PO.

PO at doses 10, 100 and 1000 mcg intraperitoneous was shown to enhance antibody formation by 3 to 6-fold (fig. 1). PO doses of 100 and 1000 per mouse subcutaneous led to a 2 to 4-fold increase in AFC counts in spleen.

Adjuvant effect in animals with various immunodeficiencies

PO effects on immunity function in mice with a variety of induced immunodeficiency states were assessed by the ability to accumulate AFC in the spleen after SE immunization.

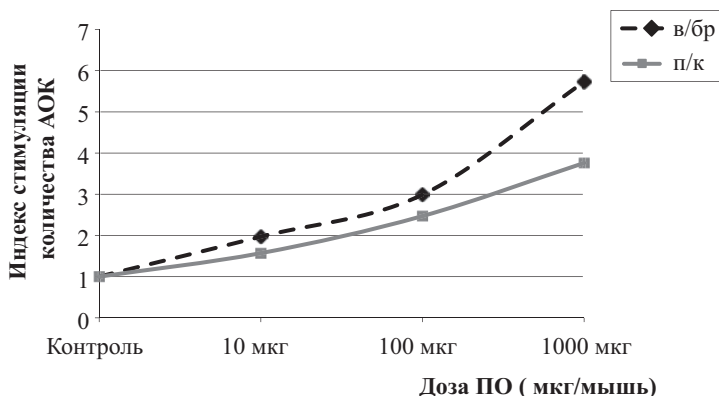


Рис.1. Стимулирующее действие полиоксидония на антителообразование у мышей-гибридов (СВА × С57В1/6) F₁ при разных способах введения

Исследования проведены на молодых и старых мышах линии СВА и мышах-гибридах (СВА × С57В1/6) F₁ разного возраста (3 и 16 мес.); на мышах с врожденной аплазией тимуса nude (nu/nu); тимэктомированных летально облученных мышах СВА, которым осуществляли перенос сингенных клеток костного мозга (В-мыши); сублетально облученных животных, которым вводили клетки костного мозга и тимуса [4].

Дополнительно проведено исследование на модели индукции иммуносупрессии циклофосфаном (данные канд. биол. н. Т.Б. Мастернак и др. ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России).

1. *Модель возрастного иммунодефицита.* Естественную модель возрастного иммунодефицита представляют собой мыши 16–20-месячного возраста, у которых существенно снижен иммунный ответ на ЭБ и уменьшено число стволовых кроветворных клеток в селезенке.

В табл. 1 представлены данные по антителообразованию у иммунизированных ЭБ (доза 2×10^7) молодых и старых мышей линии СВА и мышей-гибридов обоего пола (иммунизирующая доза 2×10^6).

Установлено, что иммунный ответ у 16-месячных животных линии СВА составляет менее 10 % от уровня молодых мышей. Внутривнутрибрюшинное введение ПО в дозе 1 мг приводило более чем к 3-кратной стимуляции числа антителопродуцентов. Эффект был сравним с таковым у молодых мышей линии СВА.

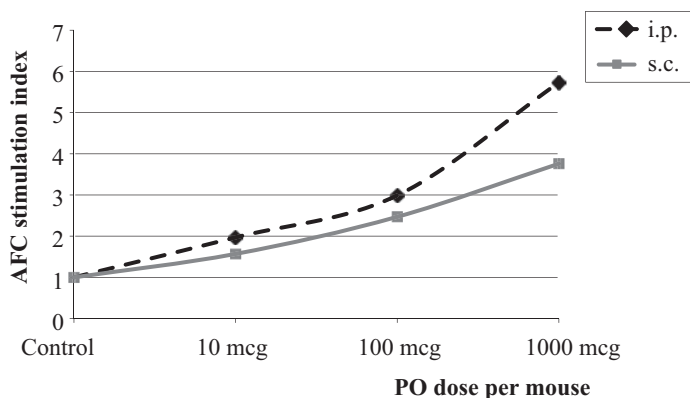


Fig. 1. PO stimulating effect on antibody formation in hybrid mice (CBA × C57Bl/6) F₁ after different ways of administration

The study was made in young and old CBA mice and (CBA × C57Bl/6) F1 hybrid mice of two ages (3 and 16 months); on nude mice with innate thymic aplasia (nu/nu); Thymectomized lethally irradiated CBA mice undergoing bone marrow (BM) syngeneic cell transfer (B-mice); mice exposed to sublethal irradiation and receiving BM and thymic cells [4].

Additionally cyclophosphamide-induced immune suppression was studied (data of candidate of biological sciences T. B. Masternak et al. NRC Institute of Immunology FMBA of Russia).

1. Age-specific immunodeficiency model. Mice 16 to 20 months of age with considerably decreased immune response to SE and decreased number of splenic stem hemopoietic cells represented a natural age-specific immunodeficiency model.

Table 1 summarizes data on antibody formation in SE- (2×10^7) immunized young and old CBA mice and hybrid mice of both genders (immunization dose 2×10^6).

Immune response in 16-month old CBA mice was less than 10 % of that in young mice. Administration of PO at 1 mg intraperitoneous led to a more than 3-fold increase in AFC levels. The effect was compatible with that in young CBA mice.

Таблица 1

Влияние полиоксидония на гуморальный иммунный ответ мышей с возрастным иммунодефицитом

Мыши	Возраст, мес.	Пол	Доза ЭБ	Доза ПО, мкг/мышь	Число АОК в селезенке	Индекс стимуляции	Кол-во животных
СВА	3	Самцы	2×10^7	—	18240 ± 544	—	18
СВА	16	Самцы	2×10^7	—	1360 ± 30	1	20
СВА	16	Самцы	2×10^7	1000	5130 ± 128	3,77	17
(СВА $\times$ C57Bl/6) F ₁	3	Самцы	2×10^6	—	318 ± 90	—	9
(СВА $\times$ C57Bl/6) F ₁	20	Самцы	2×10^6	—	98 ± 20	1	13
(СВА $\times$ C57Bl/6) F ₁	20	Самцы	2×10^6	1000	760 ± 190	7,75	11
(СВА $\times$ C57Bl/6) F ₁	3	Самки	2×10^6	—	264 ± 51	—	20
(СВА $\times$ C57Bl/6) F ₁	20	Самки	2×10^6	—	108 ± 20	1	12
(СВА $\times$ C57Bl/6) F ₁	20	Самки	2×10^6	1000	311 ± 56	2,88	11

Стимулирующее действие ПО в условиях возрастного иммунодефицита воспроизводится и при иммунизации старых мышей-гибридов (СВА $\times$ C57Bl/6) F₁. Введение ПО самкам 20-месячного возраста доводит иммунный ответ до уровня молодых животных, а количество АОК у старых самцов после введения препарата в 2,5 раза превосходит количество таковых у 3-месячных животных. Отмечено также, что стимулирующий антителообразование эффект увеличивается при снижении дозы АГ и зависит не только от исходного генетически детерминированного уровня иммунного ответа, но и от пола животных [4].

2. Модель врожденного и индуцированного облучением иммунодефицита.

Введение ПО мышам с врожденным (nude) или искусственно созданным (В-мыши) дефицитом Т-системы иммунитета приводит к 10-кратной стимуляции иммунного ответа у первых и практически полностью восстанавливает способность вторых к продукции АТ на ЭБ (табл. 2).

Влияние ПО на антителообразование исследовали и у облученных животных, которым наряду с введением клеток костного мозга вводили клетки тимуса. Иммунный ответ у таких животных снижен на 50 % по сравнению со здоровыми мышами. Введение ПО в широком диапазоне доз одновременно с иммунизацией ЭБ приводит к 1,5–3-кратной стимуляции антителообразования.

Table 1
PO effect on humoral immune response in mice with age-specific immunity deficiency

Mice	Age (months)	Gender	SE dose	PO dose, mcg/mouse	AFC number in spleen	Stimulation index	Animal number
CBA	3	Males	2×10^7	—	18240 ± 544	—	18
CBA	16	Males	2×10^7	—	1360 ± 30	1	20
CBA	16	Males	2×10^7	1000	5130 ± 128	3.77	17
(CBA $\times$ C57Bl/) F ₁	3	Males	2×10^6	—	318 ± 90	—	9
(CBA $\times$ C57Bl/) F ₁	20	Males	2×10^6	—	98 ± 20	1	13
(CBA $\times$ C57Bl/) F ₁	20	Males	2×10^6	1000	760 ± 190	7.75	11
(CBA $\times$ C57Bl/) F ₁	3	Females	2×10^6	—	264 ± 51	—	20
(CBA $\times$ C57Bl/) F ₁	20	Females	2×10^6	—	108 ± 20	1	12
(CBA $\times$ C57Bl/) F ₁	20	Females	2×10^6	1000	311 ± 56	2.88	11

The PO stimulating effect observed in age-specific immunodeficiency states was reproduced in immunization of old (CBA $\times$ C57Bl/6) F₁ hybrid mice. PO administration to 20-month old female mice increased the immune response to the levels seen in young animals, while the AFC number in old males was 2.5-fold higher after PO administration than the AFC level in 3-month old mice. It was also noted that the AB formation stimulation increased with decrease in AG dose and did not depend on either genetically determined immune response or animal gender [4].

2. *Innate and irradiation-induced immunodeficiency model.* PO administration to mice with innate (nude) or experimentally induced (B-mice) T-system deficiency resulted in a 10-fold stimulation of immune response in the former and practically complete recovery of SE antibody production in the latter (table 2).

PO effect on AB formation was also studied in irradiated mice receiving both BM and thymic cells. These animals demonstrated a 50 % decrease in immune response as compared to healthy mice. PO administration in a broad range of doses together with SE immunization led to 1.5- to 3-fold stimulation of AB formation.

Таблица 2

Влияние полиоксидония на гуморальный иммунный ответ у мышей с врожденным и индуцированным иммунодефицитом

Линия мышей	Обработка мышей			Доза ЭБ	ПО, 1 мг/мышь	Число АОК	Индекс стимуляции
	Облучение	Тимэктомия	Трансплан- тация				
nude (C57Bl/6)	—	—	—	2×10^8	-	1625 ± 48	1
nude (C57Bl/6)	—	—	—	2×10^8	+	15520 ± 389	9,55
СВА	8,5 Гр	+	КМ + КТ	2×10^7	-	1760 ± 40	1
СВА	8,5 Гр	+	КМ + КТ	2×10^7	+	12210 ± 301	6,94

Стимулирующие свойства ПО проявляются при введении его мышам с разной степенью дефицита Т-клеток: практически полное их отсутствие у бестимусных мышей и сохранение 10 % Т-клеток у В-мышей и у животных с искусственно созданным нормальным соотношением Т- и В-клеток (облученные животные, которым вносили 10 млн клеток костного мозга и 20 млн клеток тимуса). Этот факт, наряду с известными данными о большей чувствительности к радиации В-клеток, позволяет рассматривать высокую эффективность ПО у облученных животных как подтверждение результатов, полученных на здоровых мышах, о преимущественной стимуляции ПО гуморального иммунного ответа. Не исключено, что решающий вклад в стимулирующий эффект ПО у облученных животных вносит его активирующее влияние на макрофаги, которые относятся к радиорезистентным клеткам.

Известно, что в снижении иммунореактивности вследствие различных причин (генетически детерминированный низкий ответ на ЭБ у мышей линии C57Bl/6, старение или лекарственно индуцированные иммунодефицитные состояния) решающую роль играет нарушение процессов взаимодействия иммунокомпетентных клеток, процессов миграции стволовых предшественников из костного мозга, снижение числа полипотентных кроветворных клеток в селезенке. Описанный выше стимулирующий эффект ПО, выявленный при всех указанных типах иммунодефицита, позволяет предположить активирующее воздействие его на эти процессы [4].

Сопоставление дозозависимой кривой адъювантного действия ПО у здоровых и облученных животных косвенно подтверждает это (рис. 2).

Table 2

PO effect on humoral immune response in mice with innate or induced immunity deficiency

Mouse line	Treatment			SE dose	PO, 1 mg/mouse	AFC number	Stimulation index
	Irradiation	Thymectomy	Trans-plantation				
nude (C57Bl/6)	—	—	—	2×10^8	-	1625 ± 48	1
nude (C57Bl/6)	—	—	—	2×10^8	+	15520 ± 389	9.55
CBA	8.5 Gy	+	BM+TC	2×10^7	-	1760 ± 40	1
CBA	8.5 Gy	+	BM+TC	2×10^7	+	12210 ± 301	6.94

The PO stimulating effect was seen after administration to mice with different levels of T-cell deficiency including practically absolute absence in nude mice, 10 % preservation of T-cells in B-mice and animals with experimentally induced normal T-/B-cell ratio (mice exposed to irradiation and receiving 10 000 000 BM cells and 20 000 000 thymic cells). This observation together with known data about higher sensitivity of B-cells to radiation suggests that the high PO efficiency in irradiated mice confirmed PO predominant stimulation of humoral immunity seen in healthy mice. It cannot be excluded that PO activation of macrophages which are radiore-sistant cells makes the greatest contribution to the drug effect in irradiated animals.

As known, decreased immunoreactivity caused by various factors (genetically determined low response to SE in C57Bl/6 mice, aging or drug-induced immunodeficiency) is mainly due to dysregulation in interaction of immunocompetent cells, migration of stem precursors from BM, decrease in polypotent cell number in the spleen. The above-described PO stimulating effect observed in all immunodeficiency types suggests that PO activated these processes [4].

Comparison of dose-effect curves for PO adjuvant action in healthy and irradiated mice is an indirect confirmation of these considerations (fig. 2).

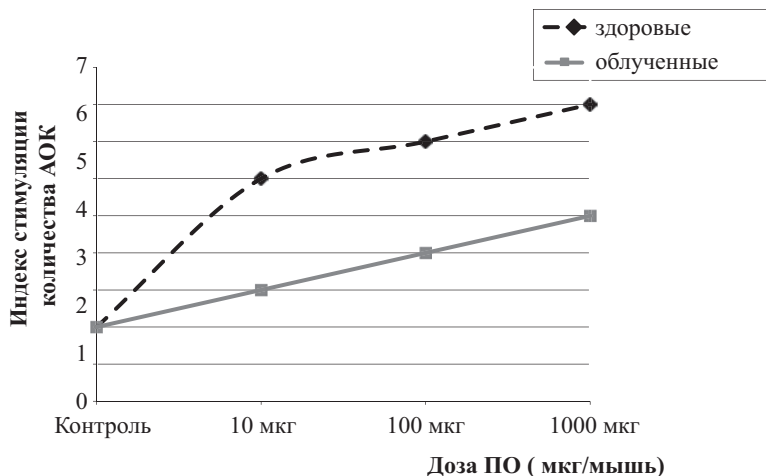


Рис. 2. Влияние полиоксидония на антителообразование у здоровых и облученных мышей

3. *Модель снижения иммунореактивности цитостатиками* (данные канд. биол. н. Т.Б. Мастернак и др. ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России). Для оценки корригирующего действия ПО на состояние иммунной системы мышей использовали предварительную индукцию иммуносупрессии противоопухолевым препаратом циклофосфан. Циклофосфан вводили за трое суток до иммунизации ЭБ. ПО в иммуностимулирующей дозе вводили за 2 ч до иммунизации. Циклофосфан известен как сильный иммунодепрессант, угнетающий иммунологическую реактивность за счет влияния на клетки-предшественники, в результате которого возникает В-клеточный дефицит с нарушением в том числе функции антителообразования. Состояние иммунной системы животных оценивали по числу АОК в селезенке.

Результаты оценивали с помощью индекса модуляции указанных параметров по отношению к таковым у животных, не подвергавшихся воздействию циклофосфана.

Установлено, что введение животным циклофосфана в дозе 150 мг/кг за 3 суток до иммунизации ЭБ приводит к существенному подавлению иммунного ответа на ЭБ. Количество АОК у животных, получивших циклофосфан, составляет 30 % от уровня антителообразования у здоровых животных. При этом количество ядросодержащих клеток в селезенке снижается не столь существенно (около 80 % от нормы).

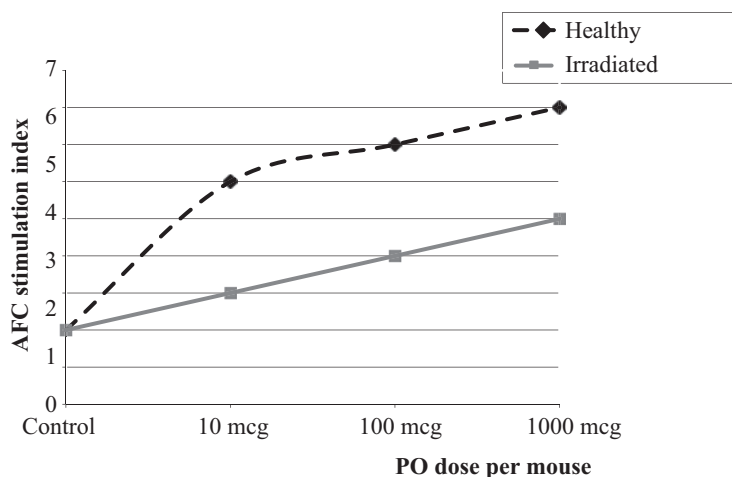


Fig. 2. PO effect on antibody formation in healthy and irradiated mice

3. *Model of cytostatic-induced decrease in immunoreactivity* (data of candidate of biological sciences T.B. Masternak et al. NRC Institute of Immunology FMBA of Russia). To assess PO correction effect on murine immunity we induced immunosuppression using the antitumor drug cyclophosphamide. Cyclophosphamide was administered three days before SE-immunization. PO at an immunity stimulating dose was administered 2 hours before immunization. Cyclophosphamide is a known immunodepressant that suppresses immunological reactivity by acting on precursor cells resulting in B-cell deficiency including impairment of AB production function. State of immunity in experimental animals was assessed by AFC number in the spleen.

Results were assessed using a modulation index (MI) for the above-mentioned parameters in relation to those in intact animals.

Administration of cyclophosphamide, 150 mg/kg to animals at 3 days before SE immunization led to a marked suppression of immune response to SE. AFC number in animals receiving cyclophosphamide was 30 % of that in normal animals. While the decrease in levels of nucleated cells in the spleen was not so pronounced (about 80 % against normal).

Уровень АОК у животных, получавших циклофосфан, составлял не более трети от уровня антителообразования у здоровых животных. Введение ПО в дозе 500 мкг/мышь приводило почти к двукратному увеличению АОК в селезенках иммуносупрессированных животных (табл. 3). Причем это увеличение происходило на фоне некоторого снижения количества ядросодержащих клеток в селезенке, что позволяет говорить о стимуляции именно количества иммунокомпетентных клеток среди спленоцитов.

Таблица 3

Влияние полиоксидония в дозе 500 мкг/мышь на иммунную систему мышей с индуцированной циклофосфаном (в дозе 150 мг/кг за 3 суток до иммунизации) иммуносупрессией

№ группы	Обработка животных			АОК/ селез. (М ± m)		АОК/10 ⁶ ЯСК сел., М ± m		ЯСК селе- зенки (М ± m)	
				абсолютн.	ИМ от К2	абсолютн.	ИМ от К2	абсо- лютн.	ИМ от К2
1	—	ЭБ	Контроль 1	13364 ± 2255	-	50,2 ± 8,48	-	266 ± 9,6	—
2	ЦФ	ЭБ	Контроль 2	4037 ± 562	1	19,0 ± 2,64	1	213 ± 6,2	1
3	ЦФ	ЭБ	ПО	7239 ± 888	1,79	33,7 ± 4,13	1,77	215 ± 4,3	1,01

ИМ — индекс модуляции; ЦФ — циклофосфан; ЯСК — ядросодержащие клетки.

Адьювантный эффект ПО при комплексообразовании и конъюгации с растворимыми антигенами

1. Адьювантный эффект у животных с различными генотипами. Одна из задач адьюванта состоит в усилении иммуногенных свойств АГ и индукции иммунного ответа у генетически низко реагирующих особей до уровня сильно реагирующих. В данной работе проведена оценка возможности фенотипической коррекции иммуноадьювантом ПО (500 мкг) гуморального ответа мышей разных линий на одно- и двукратную иммунизацию 1) гемагглютинином вируса гриппа в дозе 1 мкг; 2) гемагглютинином в той же дозе в комплексе с ПО; 3) конъюгатом 1 мкг гемагглютинаина с ПО. В экспериментах использовали половозрелых мышей линий A/Sn, B10CW, CC57W, CBA [5]. На рис. 3 представлены результаты сравнительных исследований выработки противогриппозных АТ после первичной и вторичной иммунизации.

AFC levels in cyclophosphamide-treated animals were not more than one third of those in normal mice. PO administration at 500 mg per mouse led to about a 2-fold increase in AFC number in the spleen of immunodepressed mice (table 3). Note, that this increase was associated with some decrease in nucleated cells in the spleen which suggested stimulation of immunocompetent cells among splenocytes.

Table 3
Effect of PO 500 mcg/mouse on immunity of mice with cyclophosphamide-induced (150 mg/kg at 3 days before immunization) immunity suppression

Group	Animal treatment			AFC/spleen (mean $\pm$ SD)		AFC/ 10^6 NC, spleen (mean $\pm$ SD)		Splenic NC (mean $\pm$ SD)	
				abs.	MI to K2	abs.	MI to K2	abs.	MI to K2
1	-	SE	Control 1	13364 $\pm$ 2255	-	50.2 $\pm$ 8.48	-	266 $\pm$ 9.6	-
2	CP	SE	Control 2	4037 $\pm$ 562	1	19.0 $\pm$ 2.64	1	213 $\pm$ 6.2	1
3	CP	SE	PO	7239 $\pm$ 888	1.79	33.7 $\pm$ 4.13	1.77	215 $\pm$ 4.3	1.01

PO adjuvant effect associated with complexing and conjugation with soluble antigens

1. *Adjuvant effect in animals of different genotypes.* The use of adjuvants suggests enhancement of AG immunogenicity and increase in immune response in genetically low-responsive animals to levels seen in highly reactive ones. We attempted to find out whether the immunoadjuvant PO (500 mcg) contributed to phenotypical correction of humoral response in mice from various lines to single or double immunization with (1) influenza virus hemagglutinin, 1 mcg; (2) hemagglutinin at the same dose in complex with PO; (3) hemagglutinin, 1 mcg conjugates with PO. The experiments were made on sexually mature animals of A/Sn, B10CW, CC57W, CBA lines [5]. Figure 3 shows comparison of anti-influenza AB production after the first and second immunizations.

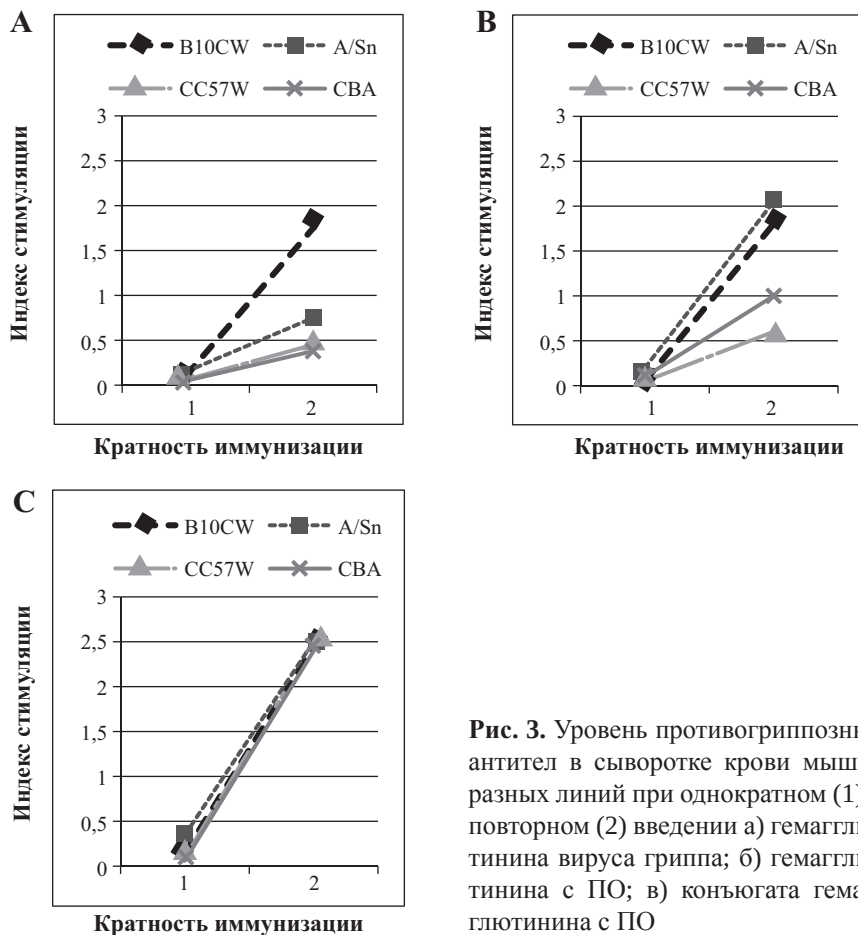


Рис. 3. Уровень противогриппозных антител в сыворотке крови мышей разных линий при однократном (1) и повторном (2) введении а) гемагглютинаина вируса гриппа; б) гемагглютинаина с ПО; в) конъюгата гемагглютинаина с ПО

При иммунизации чистым гемагглютинином наибольшая выработка АТ зарегистрирована у мышей линии В10СW, наименьшая — у мышей линий СВА СС57W после повторной иммунизации. Мыши линии А/Sn занимали промежуточное положение. При введении АГ в комплексе с ПО отмечено усиление иммунного ответа у мышей всех линий в разной степени выраженности: продукция АТ резко возросла у А/Sn, выражено — у мышей линии СВА и в меньшей степени — у сильно реагирующей на АГ линии В10СW.

В случае иммунизации мышей конъюгатом с ПО титр АТ у мышей всех исследованных линий заметно увеличился фактически до одних и тех же величин (данные представлены в табл. 4).

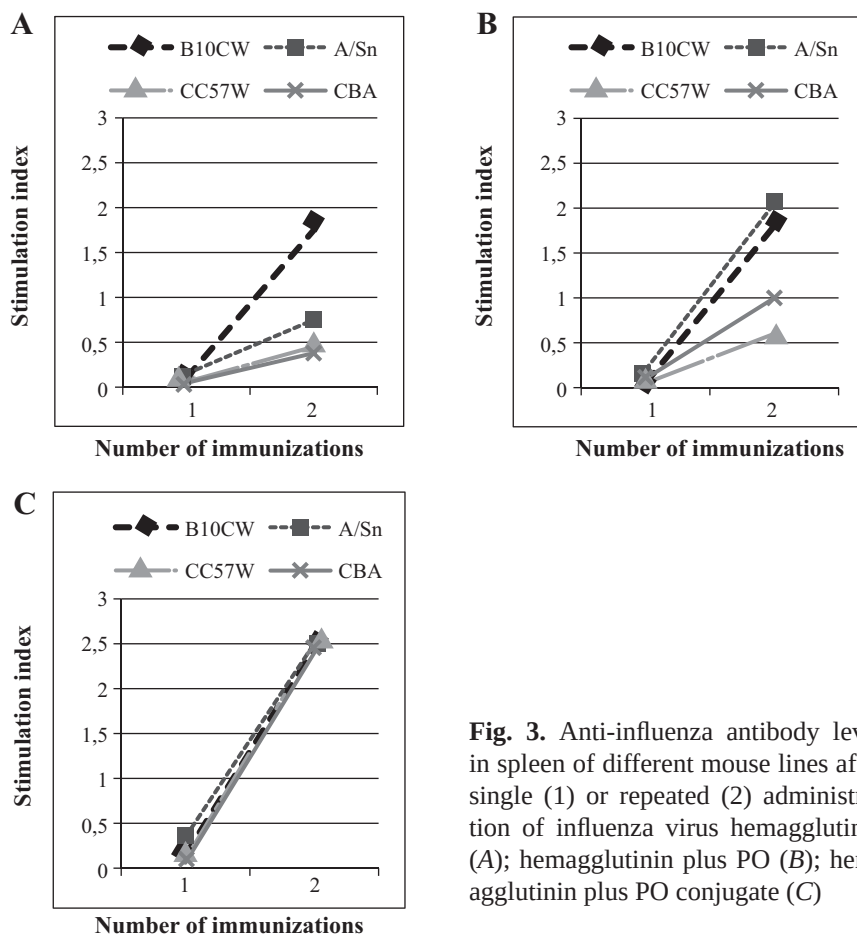


Fig. 3. Anti-influenza antibody level in spleen of different mouse lines after single (1) or repeated (2) administration of influenza virus hemagglutinin (A); hemagglutinin plus PO (B); hemagglutinin plus PO conjugate (C)

After immunization with hemagglutinin alone the maximum AB production was observed in B19CW mice and the lowest activity in CBA, CC57W after the second immunization. A/Sn mice occupied intermediate position. Administration of the AG in complex with PO increased immune response in all mouse lines to a different extent with a sharp rise in AB production in A/Sn, marked increase in CBA and to a lower degree in a highly reactive B10CW lines.

Mouse immunization with hemagglutinin-PO conjugates increased AB titers in all lines to similar levels (table 4).

Таблица 4

Выработка антител мышами разных линий через 2 недели после повторной иммунизации препаратами, содержащими гемагглютинин вируса гриппа (титр антител в иммуноферментном анализе)

Линия мышей	Средний титр антител к гемагглютнину при иммунизации мышей		
	Гемагглютинин	Комплекс гемагглютинина с иммуноадьювантом ПО	Конъюгат гемагглютинина с иммуноадьювантом ПО
CC57W	57 052	99 334	2 408 995
B10CW	489 178	561 918	2 767 209
CBA	57 052	262 144	1 290 948
A/Sp	161 369	741 455	3 913 424

Таким образом, включение иммуноадьюванта ПО в состав вакцинного препарата (как в виде комплекса, так и в виде конъюгата) приводит к коррекции генетически детерминированного гуморального иммунного ответа: уровень антителообразования у особей с низкой реактивностью на АГ значительно возрастает, в то время как иммунный ответ у высоко реагирующих особей увеличивается в меньшей степени по сравнению с ответом на «чистый» АГ.

2. *Адьювантные свойства конъюгата ПО с антигенами туберкулеза.* Животных (мыши линии BALB/c) разделили на 3 группы: в 1-й опытной группе иммунизацию проводили 100 мкг рекомбинантного белка туберкулезной микобактерии HSP70; во 2-й — 500 мкг конъюгата HSP70 с ПО (содержал 20 % HSP70); в контрольной группе внутрибрюшинно вводили 100 мкл стерильного физиологического раствора. Через 4 нед. проводилась повторная иммунизация. Через 2 нед. после повторной иммунизации животных подвергали эвтаназии для получения клеточной культуры лимфоцитов селезенки и сыворотки периферической крови.

Определение антительного иммунного ответа проводилось методом прямого твердофазного иммуноферментного анализа сывороток иммунизированных мышей. За титр в иммуноферментном анализе принимали наибольшее разведение сыворотки, при котором значение ее оптической плотности вдвое превышает значение таковой контрольной сыворотки.

Экспериментально было показано, что рекомбинантный белок *M. tuberculosis* HSP70 и его конъюгат с ПО служат сильными стимуляторами как Т-клеточного, так и гуморального иммунного ответа, причем конъюгация белка с ПО значительно усиливает этот ответ (рис. 4).

Table 4
Antibody production by different murine lines at 2 weeks following second immunization with influenza virus heamagglutinin-containing agents (EIA antibody titer)

Mouse line	Mean anti-hemagglutinin antibody titer after immunization		
	Hemagglutinin (HA)	HA+Polyoxidonium complex	HA+Polyoxidonium conjugate
CC57W	57 052	99 334	2 408 995
B10CW	489 178	561 918	2 767 209
CBA	57052	262 144	1 290 948
A/Sn	161 369	741 455	3 913 424

So, the use of immunoadjuvant PO together with a vaccine agent (both as a complex or a conjugate) led to correction of genetically determined humoral immune response with a marked increase in AB production in animals with low reactivity to the AG and a more moderate increase in highly reactive animals.

2. *Adjuvant properties of PO/tuberculosis antigen conjugate.* BALB/c mice received immunization with 100 mcg recombinant protein of tuberculosis mycobacterium HSP70 (test group 1), 500 mcg HSP70/PO conjugate (20 % HSP70) (test group 2), 100 mcg sterile saline (control group) intraperitoneous. Second immunization was made 4 weeks later. At 2 weeks after the second immunization the mice were euthanized to obtain splenic lymphocyte culture and peripheral blood serum.

AB immune response was assessed by indirect solid-phase enzyme immunoassay of serum from immunized mice. Maximum serum dilution with optical density twice greater than that in control serum was used as the enzyme immunoassay titer.

It was demonstrated experimentally that recombinant protein *M. tuberculosis* HSP70 and its conjugate with PO were strong stimulants of both T-cell and humoral immunity, with the HSP70/PO conjugate increasing considerably this effect (fig. 4).

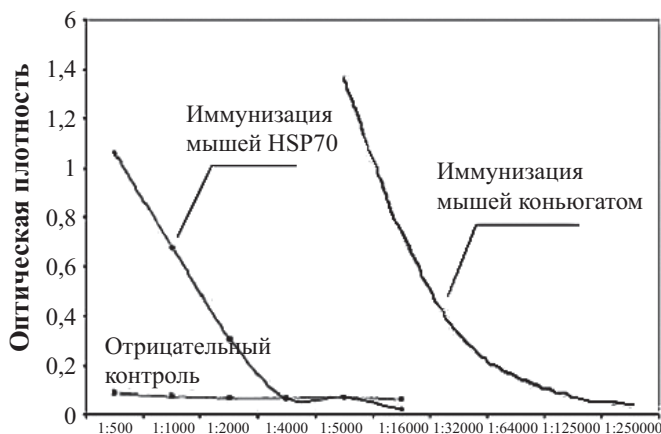


Рис. 4. Титр специфических антител в сыворотке иммунизированных мышей HSP70 и конъюгатом HSP70 с полиоксидонием

Титр АТ к рекомбинантному белку HSP70 составил 1:4000. Конъюгация с ПО усиливает уровень антительного ответа по сравнению с HSP70, т. е. титр АТ к конъюгату составил 1:160 000. Таким образом, можно говорить о том, что конъюгация значительно (в 40 раз) усиливает гуморальный иммунный ответ.

Антительный ответ не лежит в основе борьбы с микобактериями, но служит важным показателем, отражающим общую активацию иммунной системы, направленную на борьбу с туберкулезом. Центральное звено резистентности к туберкулезу — клеточный иммунитет. Пролиферируя, CD4+ Т-лимфоциты играют важную роль в формировании туберкулезной гранулемы и ограничении распространения возбудителя в тканях. В предварительных экспериментах показано, что введение рекомбинантного белка туберкулезной микобактерии HSP70 и его конъюгата с ПО вызывает комплекс изменений в иммунной системе, затрагивающий как гуморальное, так и клеточное составляющие иммунитета. Проводилась оценка пролиферации Т-клеток в случае иммунизации только рекомбинантным белком HSP70 и конъюгатом с ПО. По сравнению с иммунизацией рекомбинантным белком HSP70 конъюгат усиливает пролиферацию в 2,7 раза [6].

Изучен и другой подход к исследованию вакцинных препаратов с ПО. Протективный эффект оценивали на мышах линии СВА, зараженных вирус-лентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, после иммунизации вакциной БЦЖ и сочетанной иммунизацией БЦЖ + ПО. Данные представлены в табл. 5.

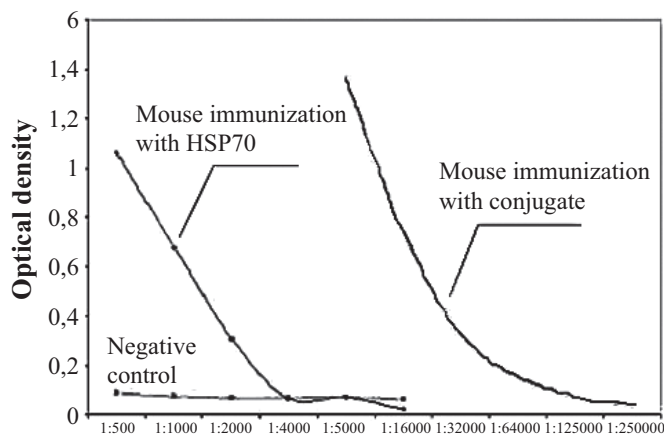


Fig. 4. Specific antibody titer in mouse spleen after immunization with HSP70 or HSP70 + PO conjugate

The titer of AB to recombinant HSP70 was 1:4 000. HSP70 conjugation with PO increased the AB response as compared to HSP70 alone: the titer of AB to the conjugate was 1:160 000. Therefore the conjugation increased dramatically (40-fold) humoral immune response.

AB response does not contribute greatly to defense against micobacteria, though it is an important indicator of general immunity activation for defense against tuberculosis. It is cell immunity that plays the central role in resistance to tuberculosis. Proliferating CD4+ T-lymphocytes contribute greatly to generation of tubercular granuloma and restrain the infectious agent from spreading in tissues. Preliminary experiments demonstrated that administration of the recombinant protein HSP70 and its conjugate with PO induced multiple changes in the immune system involving both humoral and cellular components. We assessed T-cell proliferation after immunization with HSP70 alone and HSP70/PO conjugate. The conjugate increased the proliferation by 2.7-fold as compared to HSP70 alone [6].

We also used another approach to study of vaccines with PO. Protective effect was assessed in CBA mice infected with *M. tuberculosis* virulent strain H37Rv after immunization with BCG and BCG+PO. Table 5 demonstrates the results.

Таблица 5

Сравнительная характеристика комплексного препарата БЦЖ-ПО и вакцины БЦЖ у мышей линии СВА после заражения *M. Tuberculosis* H37Rv

Препарат	Показатель		
	Продолжительность жизни, дни	Высеваемость, КОЕ	Туберкулиновые пробы, мм
БЦЖ-ПО	71,1 ± 3.2*	1.77 ± 0.36 × 10 ⁵ *	0.35 ± 0.08*
БЦЖ	60,3 ± 2.9 *	2.6 ± 0,43 × 10 ⁵ *	0.32 ± 0.09*
ПО	28.7 ± 1.9	6.8 ± 0.1 × 10 ⁷	0.11 ± 0.02
Контроль	26,0 ± 1.8	2,5 ± 0.3 × 10 ⁸	0.10 ± 0.02

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой и группой мышей, получавших ПО.

Установлено протективное действие конъюгата, сопоставимое с таковым для вакцины БЦЖ. Большая эффективность ПО показана при введении его на фоне вакцинации БЦЖ и двукратного введения иммуoadъюванта за 2 и 1 мес. до заражения животных. При введении ПО на фоне вакцинации показана наилучшая выживаемость животных, наименьшая высеваемость микобактерий и наивысшие туберкулиновые пробы [7].

Клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующего и адъювантного действия ПО

1. Связывание ПО с иммунокомпетентными клетками и влияние на бактерицидную активность фагоцитов. Опыты, проводившиеся с помощью проточной цитометрии и ПО, меченного флуорохромом, показали, что ПО с наибольшей интенсивностью связывается с моноцитами и нейтрофилами периферической крови человека и с меньшей интенсивностью с лимфоцитами (рис. 5) [8].

При взаимодействии с мононуклеарами периферической крови человека ПО существенно повышает цитотоксичность НК-клеток по отношению к клеткам-мишеням К-562. Этот эффект наблюдается практически у всех исследованных доноров, причем повышающий эффект особенно выражен у индивидов, у которых активность НК-клеток находилась на нижней границе нормы или была понижена (табл. 6).

Table 5
Comparison of BCG-PO complex agents and BCG vaccine in CBA mice after *M.tuberculosis* H37Rv infection.

Agent	Parameter		
	Life span (days)	Isolation rate (CFU)	Tuberculin test (mm)
BCG-PO	71.1 ± 3.2*	1.77 ± 0.36 × 10 ⁵ *	0.35 ± 0.08*
BCG	60.3 ± 2.9*	2.6 ± 0.43 × 10 ⁵ *	0.32 ± 0.09*
PO	28.7 ± 1.9	6.8 ± 0.1 × 10 ⁷	0.11 ± 0.02
Control	26.0 ± 1.8	2.5 ± 0.3 × 10 ⁸	0.10 ± 0.02

* p < 0.05 vs. Control and PO-treated mice

The conjugate produced protective effect compatible with that of BCG. PO efficacy increased as a result of its administration after BCG immunization and double administration of the immunoadjuvant at 2 and 1 months before infection of the animals. PO administration after vaccination was associated with the best animal survival, the least mycobacterium isolation rate and the highest tuberculin titers [7].

Cellular and molecular mechanisms of PO immunomodulating and adjuvant activities

1. *PO binding to immunocompetent cells and effect on phagocyte bactericidal activity.* Experiments using flow cytometry and fluorochrome-labeled PO demonstrated that PO bound to the highest degree with human peripheral blood monocytes and neutrophils and to the least degree with lymphocytes (fig. 5) [8].

After binding to human peripheral blood MNC PO increased markedly NK cytotoxicity against K-562 target cells. This effect was seen practically in all donors, though the enhancement was more marked in individuals with NK activity at or beneath the lower limit (table 6).

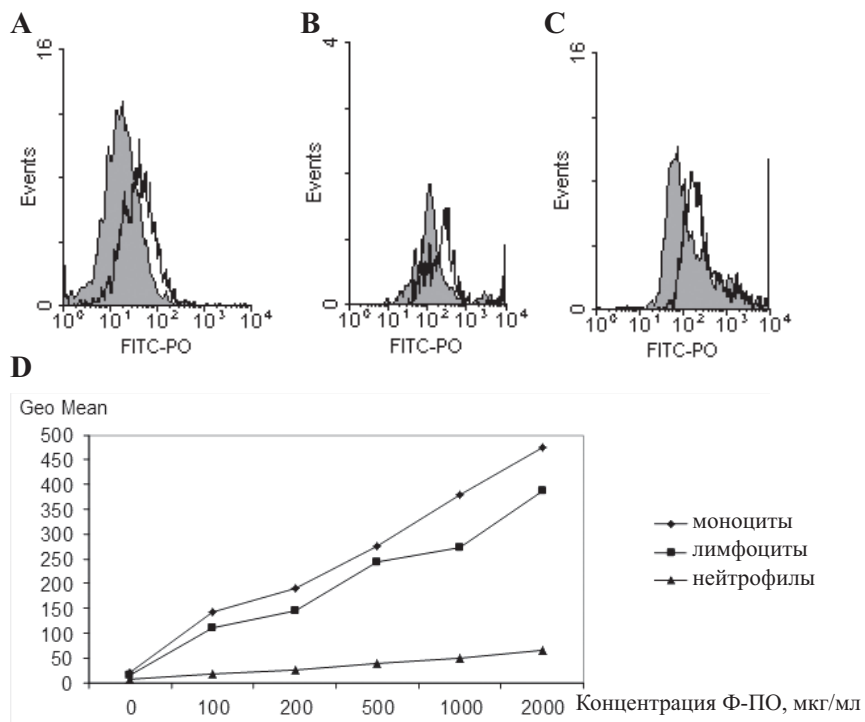


Рис. 5. Клеточные механизмы действия полиоксидония. (А) Лимфоциты. (В) Нейтрофилы. (С) Моноциты. (D). Зависимость доза–эффект интенсивности свечения (GeoMean) Ф-ПО (100–2000 мкг/мл) на лейкоцитах (3 ч инкубации) [17]. FITZ — флуоресцеинизотиоцианат

Таблица 6
Влияние полиоксидония на цитотоксичность (ЦТ) мононуклеаров здоровых доноров в отношении клеток линии К-562 (в %)

Исходная ЦТ	Число доноров	ЦТ	ЦТ в присутствии ПО (50 мкг/мл)
Низкая	2	12	45
Средняя	5	44,7 ± 6,9	46,7 ± 4,5
Высокая	2	66	42

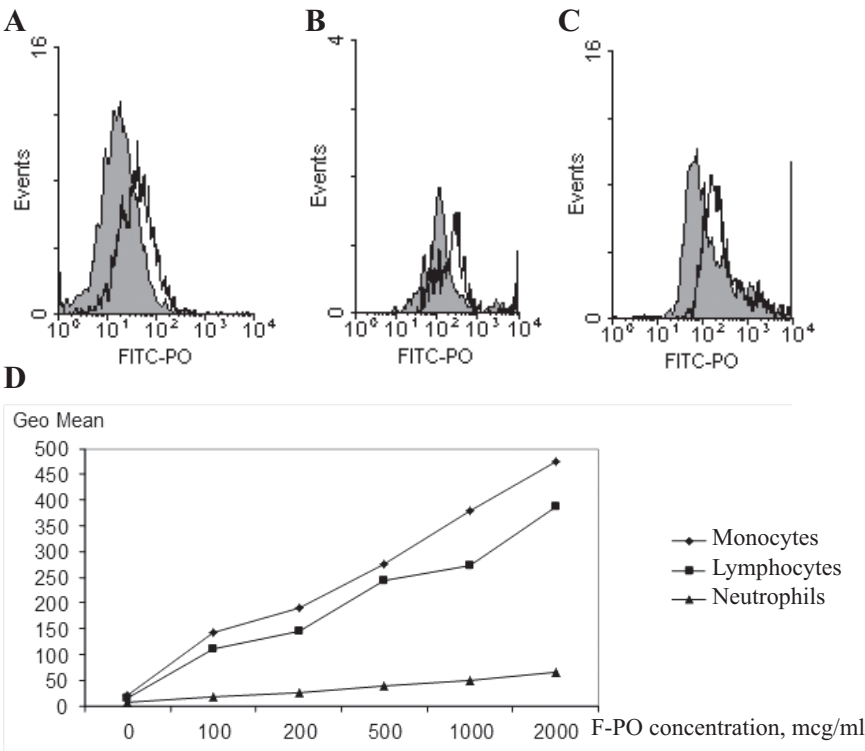


Fig. 5. Cellular mechanisms of PO activity. (A) Lymphocytes. (B) Neutrophils. (C) Monocytes. (D) Dose-effect relationship by luminescence intensity (GeoMean) F-PO (100 – 2000 mcg/ml) on leukocytes (3 h incubation) [17].

Table 6
PO effect on mononuclear cytotoxicity (CT) against K-562 cells in healthy donors (%)

Baseline CT	Donor number	CT	CT in the presence of PO (50 mcg/ml)
Low	2	12	45
Medium	5	44.7 ± 6.9	46.7 ± 4.5
High	2	66	42

Выделение мононуклеаров проводили на градиенте Ficoll-Paque общепринятым методом. Часть мононуклеаров и фагоцитов активировали ПО в дозировке 1, 50 и 100 мкг/мл. В качестве мишеней использовали человеческую эритромиелоидную линию К-562. Мишени (2 млн/мл) инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 1 ч в присутствии ³H-уридина. Далее клетки отмывали, клетки-эффекторы и мишени смешивали в соотношении 50:1 и помещали в CO₂-инкубатор на 16 ч. Радиометрию проводили на счетчике «В-Трас» (США).

При изучении влияния ПО на цитотоксическую активность нейтрофилов и мононуклеаров больных раком легкого показано (табл. 7), что исходная цитотоксическая активность неактивированных нейтрофилов и мононуклеаров полностью отсутствует и даже наблюдается стимуляция роста клеток-мишеней. При активации ПО в дозе 100 мкг/мл наблюдается резкое увеличение цитотоксической активности как нейтрофилов раковых больных, так и мононуклеаров тех же самых больных [1].

Таблица 7

Влияние полиоксидония на цитотоксичность (ЦТ) нейтрофилов и мононуклеаров больных раком легкого в отношении клеток линии К-562

Клетки	Число больных	Исходная ЦТ	ЦТ в присутствии ПО (100 мкг/мл)
Нейтрофилы	6	Стимуляция роста клеток линии К-562	54,0 ± 2,1
Мононуклеары	7	Стимуляция роста клеток линии К-562	62,1 ± 1,7

При взаимодействии с моноцитами ПО индуцирует умеренный синтез провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-6, активирующих клетки как врожденного, так и адаптивного иммунитета, с чем может быть связана его нейтрофилактивирующая активность. С этим, вероятно, связана способность ПО быстро повышать антиинфекционную резистентность. Предварительное введение ПО существенно повышает устойчивость мышей к заражению несколькими безусловно смертельными дозами *St.aureus* и *S.typhimurium* [9, 10].

При взаимодействии с нейтрофилами ПО существенно повышает их активность, что проявляется в повышенной способности фагоцитов поглощать и убивать поглощенные бактерии. На модели нейтрофилов показано, что ПО примерно на 40–60 % повышает их способность убивать поглощенный стафилококк (рис. 6).

MNC isolation was made by a common Ficoll-Pague gradient procedure. A part of MNC and phagocytes were activated with PO at 1 mcg/ml, 50 mcg/ml and 100 mcg/ml. Human erythromyeloid line K-562 was used as a target. The target (2 000 000/ml) was incubated at 37°C in 5% CO₂ for 1 h in the presence of 3H-uridine. Then the cells were washed, effector cell and target cells were mixed in a 50:1 ratio and placed into a CO₂-incubator for 16 h. Radiometry was made using a *B-Trac* (USA) counter.

Study of PO effect on cytotoxic activity of neutrophils and MNC from lung cancer patients (table 7) demonstrated that at baseline non-activated neutrophils and MNC were completely free from cytotoxic activity and even stimulation of target cell growth was observed. Activation with PO at 100 mcg/ml led to a dramatic rise in cytotoxic activity of both neutrophils and MNC from cancer patients [1].

Table 7
PO effect on cytotoxicity of neutrophils and mononuclears from cancer patients against K-562 cells

Cells	Patient number	Baseline CT	CT in the presence of PO (100 mcg/ml)
Neutrophils	6	K-562 growth stimulation	54.0 ± 2.1
Mononuclears	7	K-562 growth stimulation	62.1 ± 1.7

When interacting with monocytes PO induced moderate synthesis of proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 that activated cells of both innate and adaptive immunities which could account for its neutrophils activation capacity. And this might be responsible for PO ability to enhance quickly the body anti-infection resistance. Preliminary PO administration increased considerably murine resistance to infection with several DCL of *St. aureus* and *S. typhimurium* [9, 10].

PO interaction with neutrophils increased dramatically neutrophils activity which could be observed by increased phagocyte ability to absorb and kill bacteria. It was shown on the neutrophil model that PO increased the neutrophil's ability to kill staphylococcus by about 40 to 60 % (fig. 6).

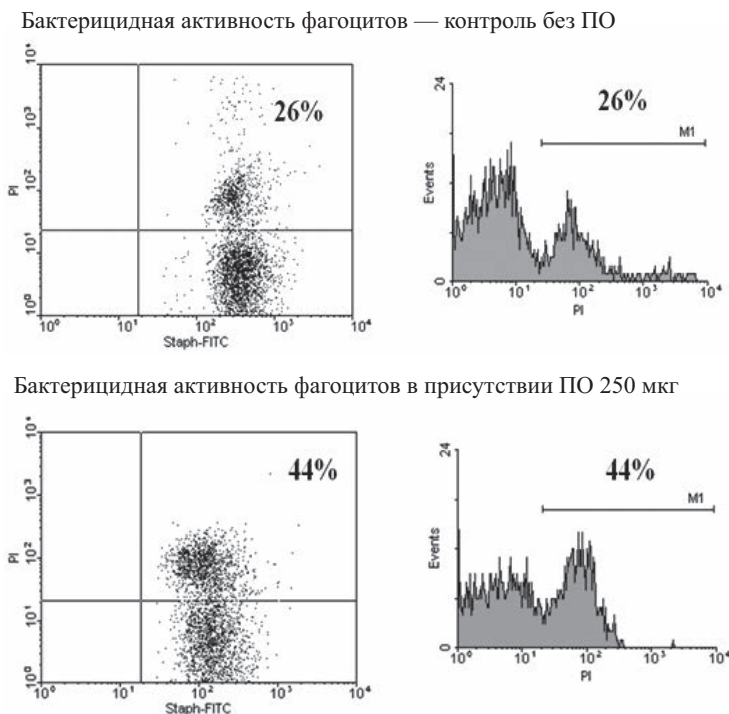


Рис. 6. Влияние полиоксидония на бактерицидную активность фагоцитов

Важно, что у больных с хронической гранулематозной болезнью, характеризующейся отсутствием бактерицидной активности нейтрофилов, ПО восстанавливает способность этих клеток убивать поглощенный стафилококк (рис. 7) [11, 12].

2. *Усиление экспрессии молекул костимуляции дендритными клетками и выработка цитокинов макрофагами человека при стимуляции ПО in vitro* (данные д-ра мед. н. М.В. Пашенкова, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России). DC и макрофаги получали по общепринятой методике из моноцитов периферической крови человека (рис. 8) [13]. Мононуклеарные клетки выделяли из донорской венозной крови на градиенте плотности фиколл-урографин. Моноциты выделяли из суспензий мононуклеарных клеток путем адгезии к пластику. На 6-й день культуры клеток отделяли от пластика путем трипсинизации. При иммунофенотипировании поверхностный фенотип DC был $CD1a^+CD11c^+CD14^-CD80^-CD83^-CD86^{dim}CD206^-HLA-DR^+$, макрофагов — $CD1a^-CD11c^+CD14^+CD80^{dim}CD83^-CD86^{dim}CD206^+HLA-DR^+$; контаминация лимфоцитами составила $< 2\%$.

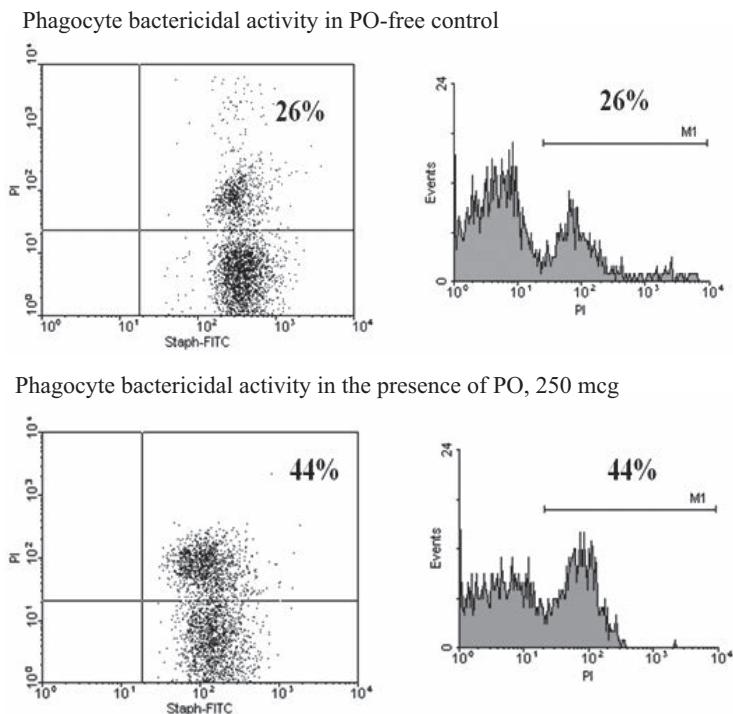


Fig. 6. PO effect on phagocyte bactericidal activity

What is important, PO recovered the neutrophil's ability to kill staphylococcus in patients with chronic granulomatosis characterized by the absence of neutrophils bactericidal activity (fig. 7) [11, 12].

2. *Enhancement of expression of costimulation molecules with dendritic cells and cytokine production by human macrophages after in vitro PO stimulation* (data supplied by M.V. Paschenkov, MD, NRC Institute of Immunology FMBA of Russia). DC and MP were grown by a common procedure from peripheral blood monocytes (fig. 8) [13]. MNC were isolated from donors' venous blood by phycoll-urograin gradient procedure. Monocytes were extracted from MNC suspension by adhesion to plastic. On day 6 cell cultures were separated from plastic by trypsinization. DC surface phenotype was CD1a⁺CD11c⁺CD14⁻CD80⁻CD83⁻CD86^{dim}CD206⁻HLA-DR⁺, that of MP was CD1a⁻CD11c⁺CD14⁺CD80^{dim}CD83⁻CD86^{dim}CD206⁺HLA-DR⁺; lymphocyte contamination was less than 2 %.

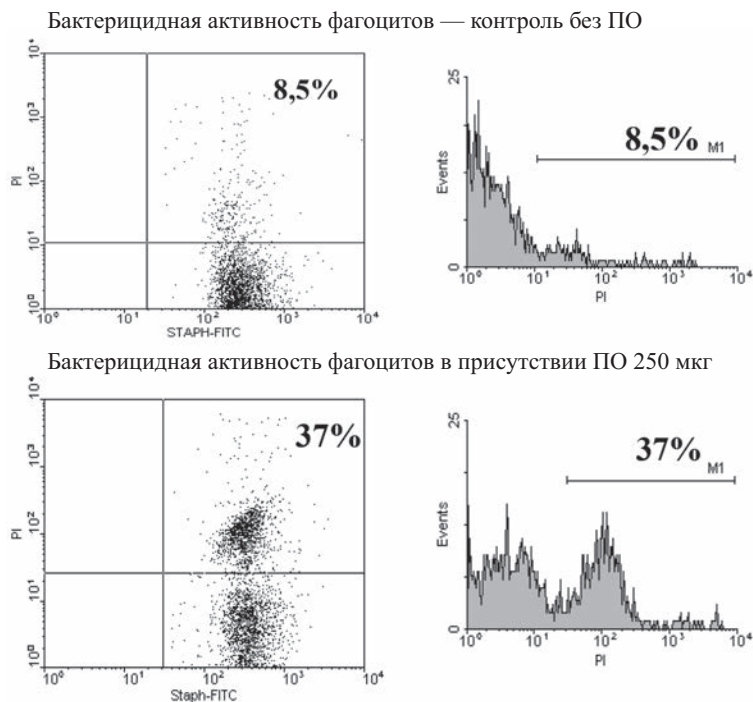


Рис. 7. Влияние полиоксидония на бактерицидную активность фагоцитов больного хронической гранулематозной болезнью

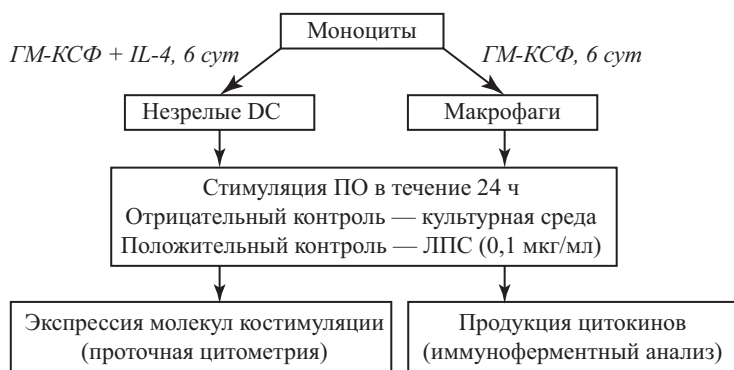


Рис. 8. Влияние полиоксидония на экспрессию коstimуляторных молекул и цитокинов дендритными клетками и макрофагами (схема опыта)

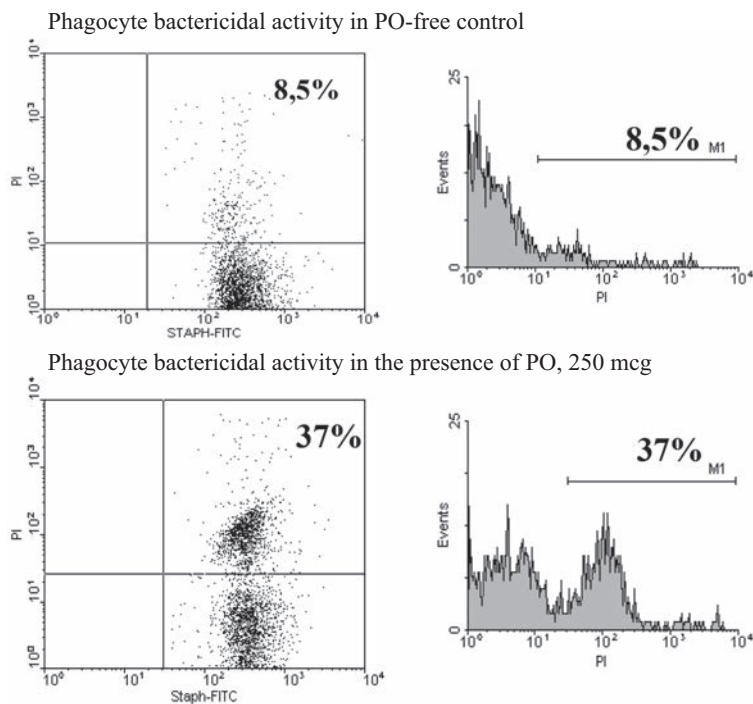


Fig 7. PO effect on bactericidal activity of phagocytes from patients with chronic granulomatosis

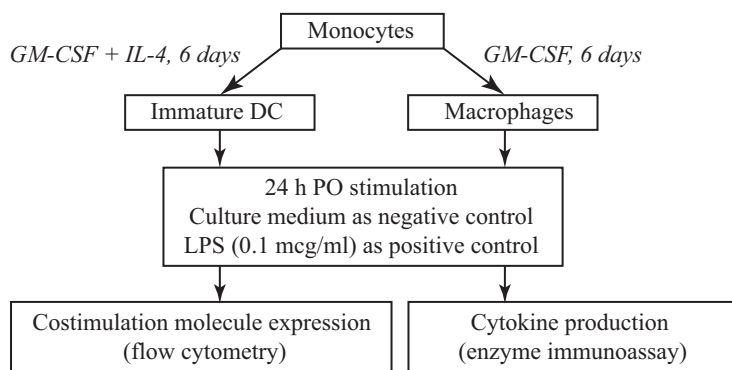


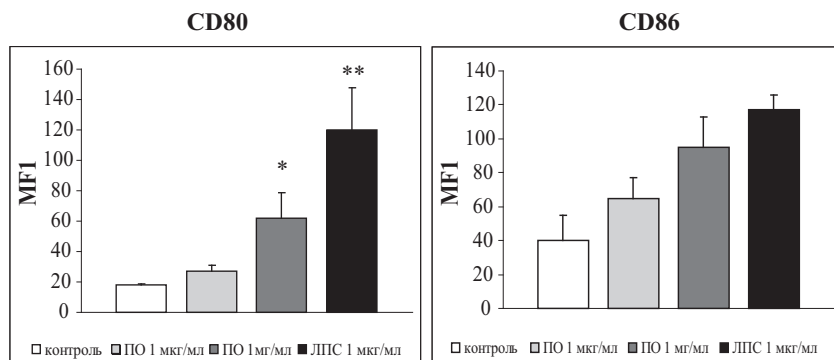
Fig. 8. PO effect on expression of costimulating molecules and cytokines on dendritic cells and macrophages (experiment diagram)

Полученные DC и макрофаги высевали в лунки 96-луночных плоскодонных планшето и культивировали в течение 24 ч в отсутствие каких-либо стимулов, либо с различными концентрациями ПО, либо с контрольным стимулятором — липополисахаридом (ЛПС) *E.coli* штамма O111:B4 в концентрации 100 нг/мл. Через 24 ч собирали супернатанты и оценивали в них уровни TNF- α и IL-6 методом твердофазного иммуноферментного анализа; сами клетки окрашивали флюоресцентно меченными АТ к CD80 и CD86 и анализировали с помощью проточного цитометра.

ПО в концентрации 1000 мкг/мл усиливал экспрессию CD80 (в меньшей степени CD86) дендритными клетками (рис. 9).

Полиоксидоний не индуцировал выработку TNF- α и IL-6 дендритными клетками, однако в концентрации 1000 мкг/мл достоверно индуцировал выработку этих двух цитокинов макрофагами (рис. 10).

Таким образом, показано, что ПО обладает двумя важными свойствами адьюванта: усиливает экспрессию костимуляторных молекул и индуцирует выработку активационных цитокинов.



* $p < 0,05$;

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

Рис. 9. Экспрессия молекул костимуляции (CD 80 и CD86) дендритными клетками под действием полиоксидония

The DC and MP were placed into 96-well plates and cultured 24 h either free from any stimulation or with various PO concentrations, or with control stimulator LPS *E. coli*, strain O111:B4 at 100 ng/ml. After 24 h the supernatant was harvested, and TNF α and IL-6 levels were measured by enzyme immunoassay; the cells were stained with labeled anti-CD80 and -CD86 AB and counted using a flow cytometer.

PO at 1000 mcg/ml enhanced expression of CD80 and to a lower extent of CD86 on DC (fig. 9).

PO did not induce production of TNF α or IL-6 by DC, however at 1000 mcg/ml significantly induced production of these two cytokines by MP (fig. 10).

Therefore, PO demonstrated two important adjuvant properties, i.e. enhanced expression of costimulating molecules and induced production of activation cytokines.

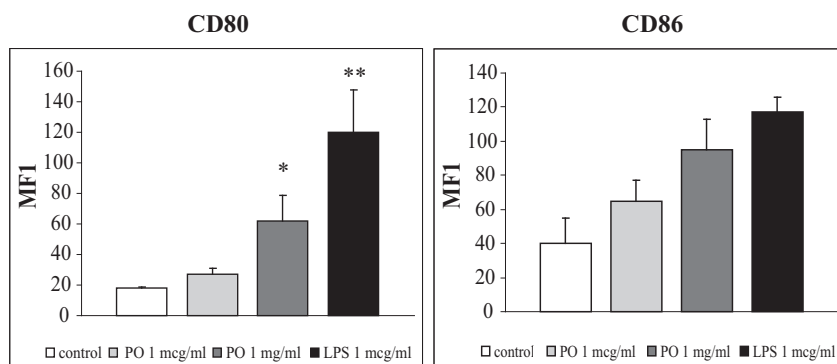
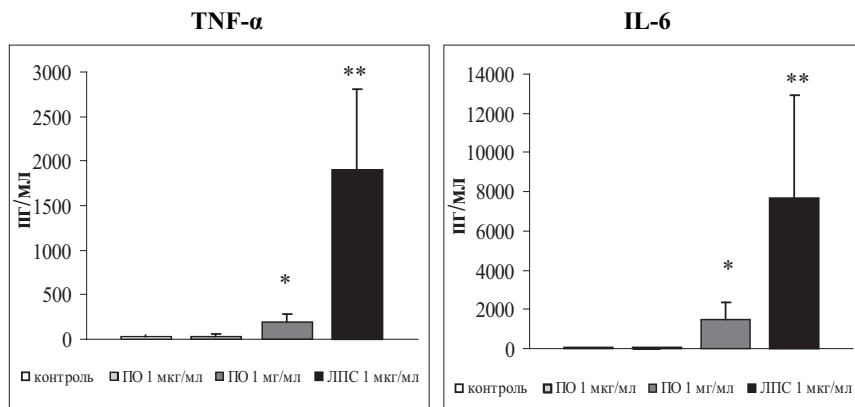


Fig. 9. Costimulation molecule (CD80 and CD86) expression on dendritic cells under the PO effect



* $p < 0,05$;

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

Рис. 10. Выработка TNF- α и IL-6 макрофагами под действием полиоксидония

3. Усиление способности DC активировать CD4⁺ Т-клетки (данные д-ра мед. н. М.В. Пашенкова, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России). Усиление экспрессии коstimуляторных молекул и активационных цитокинов, достигаемое под действием ПО, лишь косвенно указывает на усиление способности антигенпредставляющих клеток, подвергшихся действию ПО, активировать антиген-специфические CD4⁺ Т-клетки. Для того чтобы прямо продемонстрировать, что ПО усиливает способность DC активировать антиген-специфические CD4⁺ Т-клетки, были проведены следующие эксперименты (схема опыта приведена на рис. 11).

Результаты репрезентативного опыта приведены на рис. 12 и 13. Ненагруженные DC, независимо от обработки ЛПС или ПО, не индуцировали значимую выработку IFN- γ аутологичными CD4⁺ Т-клетками. Добавление в культуру моноклональных АТ к CD3 приводило к выраженной продукции IFN- γ . DC, нагруженные АГ, индуцировали значимую выработку IFN- γ Т-клетками. DC, нагруженные АГ и ПО, оказались значительно более эффективными индукторами IFN- γ по сравнению с DC, нагруженными только АГ или АГ + ЛПС. Сходные результаты получены при исследовании пролиферативного ответа [14].

Таким образом, в настоящих опытах прямо продемонстрировано, что ПО усиливает способность DC активировать антиген-специфические аутологичные CD4⁺ Т-клетки, что выражается в усилении антиген-специфической продукции IFN- γ CD4⁺ Т-клетками.

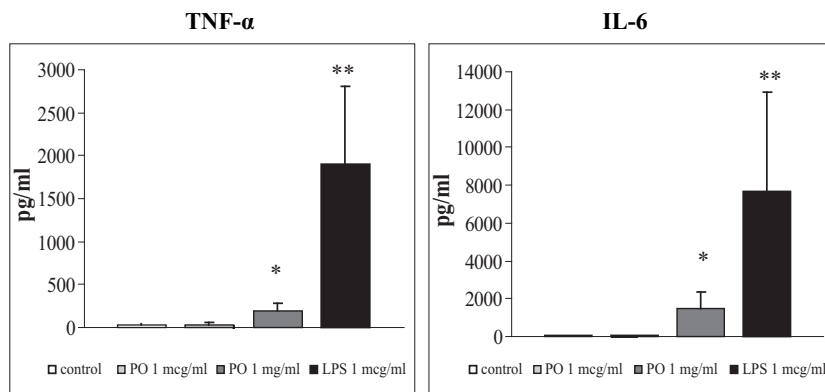


Fig. 10. TNF- α and IL-6 production by macrophages under the PO effect

3. *Enhancement of DC ability to activate CD4⁺ T-cells* (data supplied by M.V. Paschenkov, MD, NRC Institute of Immunology FMBA of Russia) The enhancement of expression of costimulating molecules and activation cytokines under the effect of PO suggests but indirectly that AFC acquire increased ability to activate AG-specific CD4⁺ T-cells as a result of exposure to PO. The following experiments were made to demonstrate directly that PO enhanced the DC ability to activate AG-specific CD4⁺ T-cells (see fig. 11 for the experiment procedure).

Results of representative experiments are presented in figs. 12 and 13. Non-loaded DC whether exposed or not exposed to LPS or PO failed to induce noticeable production of IFN γ by autologous CD4⁺ T-cells. AG-loaded DC induced a noticeable production of IFN γ by T-cells. AG+PO-loaded DC appeared much more effective inducers of IFN γ as compared to AG- or AG+LPS-loaded DC. Study of the proliferative effect gave similar results [14].

So, our experiments demonstrated directly that PO enhanced the DC ability to activate AG-specific autologous CD4⁺ T-cells, as shown by increased AG-specific production of IFN γ by CD4⁺ T-cells.

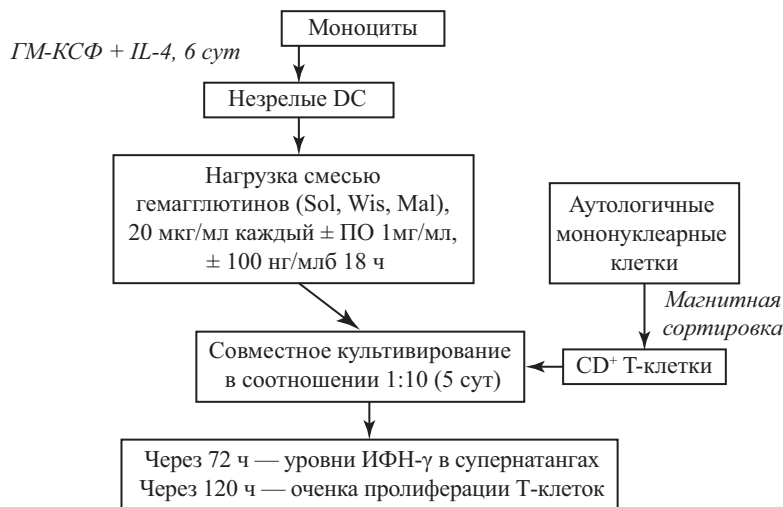


Рис. 11. Влияние полиоксидония на способность человеческих дендритных клеток активировать антиген-специфические CD4⁺ Т-клетки (схема опыта)

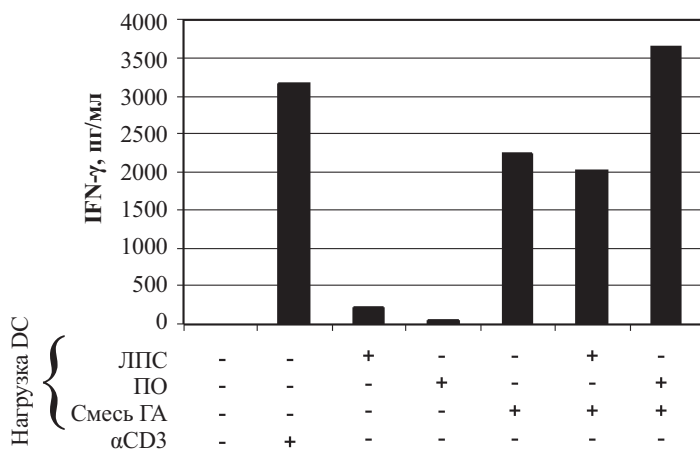


Рис. 12. Влияние полиоксидония на представление гемагглютининов вируса гриппа дендритными клетками человека аутологичным Т-хелперам по продукции IFN-γ (репрезентативный опыт)

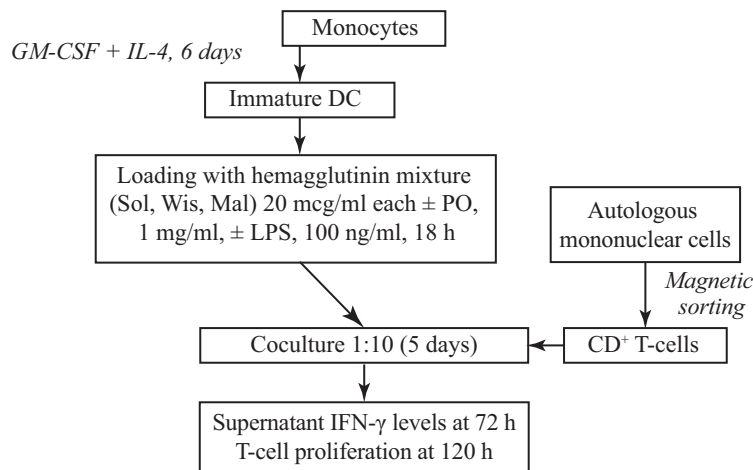


Fig. 11. PO effect on the ability of human dendritic cells to activate AG-specific CD4+ T-cells (experiment diagram)

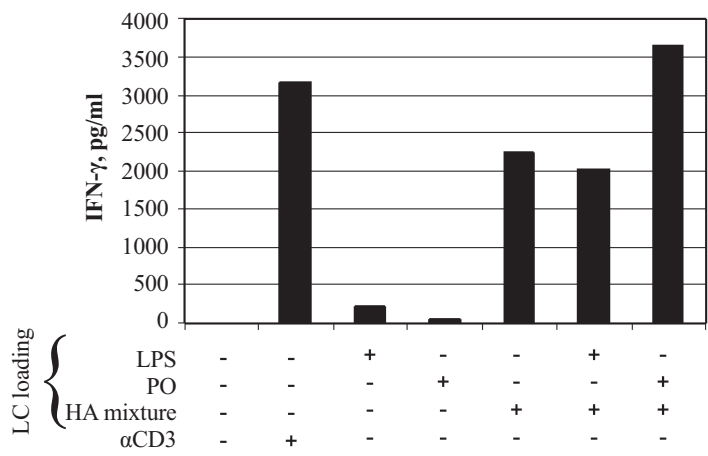


Fig. 12. PO effect on influenza virus hemagglutinin presentation by human dendritic cells to autologous T-helpers basing on IFN-γ production (representative experiment)

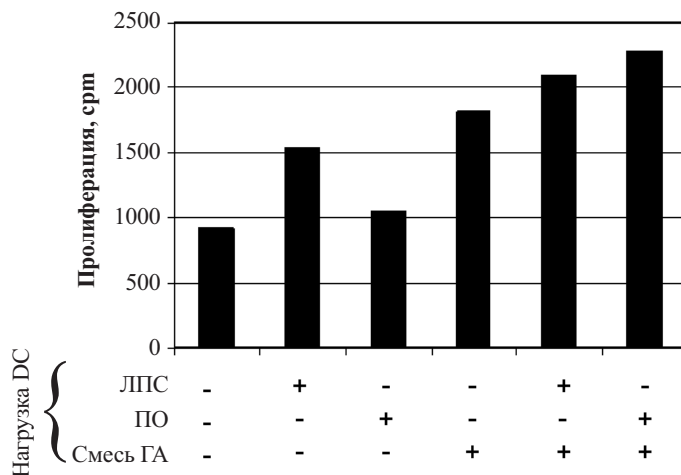


Рис. 13. Влияние полиоксидония на представление гемагглютининов вируса гриппа дендритными клетками человека аутологичным Т-хелперам по пролиферативной активности (репрезентативный опыт)

4. *Индукция синтеза цитокинов мононуклеарами периферической крови человека.* С помощью иммуноферментного анализа было проведено исследование влияния ПО на спонтанную и стимулированную продукцию мононуклеарами периферической крови здоровых доноров провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α , IL-6, а также IFN- α и IFN- γ в опытах *in vitro* [15, 16].

Оказалось, что ПО стимулирует образование мононуклеарами периферической крови IL-1 β (см. табл. 6). В дозе 100 мкг/мл продукция цитокина была повышена в среднем в 7 раз. Не был достигнут достоверный уровень значимости, поскольку выявились большие разбросы в группе после стимуляции иммуномодулятором. Костимулирующий эффект при совместном применении с ЛПС был достоверно проявлен в дозах 10 и 100 мкг/мл, т. е. обнаружено синергичное действие ПО с бактериальным препаратом.

Усиление синтеза IL-6 в 1,2–3 раза ($p < 0,05$) наблюдалось при введении ПО в дозе 100 мкг/мл в культуру нестимулированных мононуклеарных клеток (табл. 8). При совместном действии ПО и ЛПС костимулирующего эффекта обнаружено не было, проявилось лишь незначительное снижение продукции IL-6, которое имело недостоверный характер.

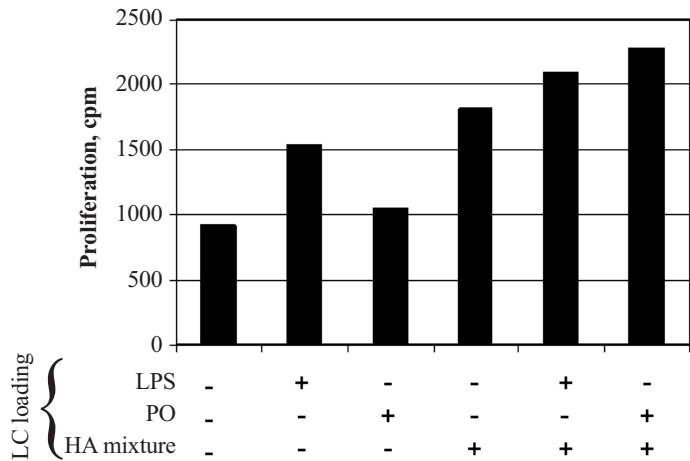


Fig 13. PO effect on influenza virus hemagglutinin presentation by human dendritic cells to autologous T-helpers basing on proliferative activity (representative experiment)

4. *Induction of cytokine synthesis by human blood MNC.* We studied PO effect on spontaneous and stimulated production of proinflammatory cytokines such as IL-1 β , TNF α , IL-6, IFN α and IFN γ by peripheral blood MNC from healthy donors by *in vitro* experiments [15, 16].

PO stimulated production of IL-1 β by peripheral blood MNC (table 6). Addition of PO, 100 mcg/ml led to a 7-fold increase in the cytokine production. The differences were not statistically significant due to broad group variability after co-stimulation. The PO costimulating effect after joint use with LPS was statistically significant at doses 10 and 100 mcg/ml, i.e. PO demonstrated synergism with the bacterial agent.

Addition of PO at 100 mcg/ml to non-stimulated MNC culture resulted in a 1.2- to 3-fold enhancement of IL-6 synthesis ($p < 0.05$) (table 8). PO with LPS failed to show costimulation effects with only a slight, not significant decrease in IL-6 production.

Таблица 8

Стимулирующий и костимулирующий эффекты полиоксидония на синтез IL-1 β и IL-6 (пкг/мл, $M \pm m$) мононуклеарными клетками

Цитокин	ПО 0 мкг/мл		ПО 1 мкг/мл		ПО 10 мкг/мл		ПО 100 мкг/мл	
	Без ЛПС	ЛПС	Без ЛПС	ЛПС	Без ЛПС	ЛПС	Без ЛПС	ЛПС
IL-1 β (n = 4)	56 $\pm$ 37	143 $\pm$ 23	93 $\pm$ 54	91 $\pm$ 44	175 $\pm$ 150	256 $\pm$ 81*	387 $\pm$ 270	280 $\pm$ 96*
IL-6 (n = 7)	131 $\pm$ 71	1124 $\pm$ 496	161 $\pm$ 68	1083 $\pm$ 762	190 $\pm$ 113	1087 $\pm$ 514	259 $\pm$ 155*	1108 $\pm$ 398

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (ПО 0 мкг/мл).

ЛПС 100 нг/мл — для индукции IL-6, ЛПС 10 мкг/мл — для индукции IL-1 β .

При анализе продукции TNF- α была прослежена разница в спонтанной продукции этого цитокина различными донорами. В результате было выделено две группы: с пониженным или нормальным (от 0 до 200 пкг/мл — I группа) и повышенным (от 200 пкг/мл и выше — II группа) исходным уровнем секреции цитокина. Оказалось, что ПО проявляет себя как истинный иммуномодулирующий препарат, снижая повышенную и повышая пониженную спонтанную продукцию TNF- α . Так, при действии ПО на культуру мононуклеарных клеток I группы происходит усиление синтеза цитокина в 2–10 раз ($p < 0,05$, доза 100 мкг/мл) (табл. 9). Напротив, при повышенном спонтанном уровне TNF- α у доноров II группы ПО снижает выработку цитокина в 1,2–2,7 раза ($p < 0,05$, доза 10 мкг/мл). Отметим, что мононуклеары 2 из 11 обследованных доноров проявили противоположный эффект на действие ПО, не соответствующий своим группам. Эти данные могут зависеть от условности разделения доноров на группы и индивидуальных особенностей доноров. Кроме того, по предположению, индивидуальная чувствительность находится под генетическим контролем.

Таблица 9

Действие полиоксидония на синтез TNF- α (пкг/мл, $M \pm m$) неиндуцированными мононуклеарами доноров с средним (I группа) и повышенным (II группа) исходными уровнями продукции цитокина

TNF- α	ПО 0 мкг/мл	ПО 1 мкг/мл	ПО 10 мкг/мл	ПО 100 мкг/мл
I группа (n = 5)	87 $\pm$ 36	324 $\pm$ 179	356 $\pm$ 304	388 $\pm$ 240*
II группа (n = 4)	525 $\pm$ 144	341 $\pm$ 98	425 $\pm$ 104*	465 $\pm$ 187

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (ПО 0 мкг/мл).

Table 8

PO stimulating and costimulating effects on IL-1 β and IL-6 synthesis (pcg/ml, mean $\pm$ SD) by mononuclear cells

Cytokine	PO 0 mcg/ml		PO 1 mcg/ml		PO 10 mcg/ml		PO 100 mcg/ml	
	No LPS	LPS	No LPS	LPS	No LPS	LPS	No LPS	LPS
IL-1 β (n=4)	56 $\pm$ 37	143 $\pm$ 23	93 $\pm$ 54	91 $\pm$ 44	175 $\pm$ 150	256 $\pm$ 81*	387 $\pm$ 270	280 $\pm$ 96*
IL-6 (n=7)	131 $\pm$ 71	1124 $\pm$ 496	161 $\pm$ 68	1083 $\pm$ 762	190 $\pm$ 113	1087 $\pm$ 514	259 $\pm$ 155*	1108 $\pm$ 398

* $p < 0,05$ compared to control group (PO 0 mcg/ml).

LPS 100 ng/ml for IL-6 induction, LPS 10 mcg/ml for IL-1 β induction.

Analysis of TNF α production discovered inter-donor variability in spontaneous production of this cytokine. The donors were divided into two groups with decreased or normal (0 to 200 pcg/ml, Group 1), and increased (200 pcg/ml and higher, Group 2) baseline levels of cytokine secretion. PO behaved as a true immunomodulator by decreasing the increased or increasing the decreased spontaneous production of TNF α . Exposure of MNC culture from Group 1 to PO resulted in a 2- to 10-fold ($p < 0.05$ at 100 mcg/ml) increase in the cytokine synthesis (table 9). And on the opposite, PO decreased by 1.2- to 2.7-fold ($p < 0.05$ at 10 mcg/ml) the cytokine production in Group 2 with increased baseline TNF α levels. Note, that MNC from 2 of the 11 donors studied demonstrated a contrary response to PO not complying with their groups. These findings might be explained by conditional character of donor division into experimental groups and individual variability in the donors' characteristics, while individual sensitivity was presumed to be genetically controlled.

Table 9

PO effect on TNF- α synthesis (pcg/ml, mean $\pm$ SD) by donors' non-induced mononuclears with baseline medium (Group 1) and increased (Group 2) cytokine production intensity

TNF- α	PO 0 mcg/ml	PO 1 mcg/ml	PO 10 mcg/ml	PO 100 mcg/ml
Group 1 (n = 5)	87 $\pm$ 36	324 $\pm$ 179	356 $\pm$ 304	388 $\pm$ 240*
Group 2 (n = 4)	525 $\pm$ 144	341 $\pm$ 98	425 $\pm$ 104*	465 $\pm$ 187

* $p < 0,05$ compared to control group (PO 0 mcg/ml).

Важные данные получены при совместной стимуляции мононуклеарных клеток ПО и активаторами (табл. 10). При одновременном индуцировании клеток фитогемагглютинином с ПО наблюдалось повышение синтеза TNF- α , особенно четко в максимальной дозе ($p < 0,05$). Известно, что фитогемагглютинин служит стимулятором лимфоцитов, которые также могут продуцировать TNF- α . Поскольку ПО активирует преимущественно моноциты, то эти стимулы могут складываться в общий эффект либо здесь может быть задействован каскадный механизм: ПО активирует моноциты, которые передают сигнал активации лимфоцитам, в результате чего повышается общая продукция провоспалительного цитокина. При совместной индукции ЛПС и ПО отмечено снижение стимулированной продукции TNF- α в 1,2–1,6 раза ($p < 0,05$).

Таблица 10
Костимулирующий эффект полиоксидония на синтез TNF- α (пкг/мл, $M \pm m$), индуцированный фитогемагглютинином (5 мкг/мл) и липополисахаридами (100 нг/мл)

Индуктор	ПО 0 мкг/мл	ПО 1 мкг/мл	ПО 10 мкг/мл	ПО 100 мкг/мл
ФГА (n = 5)	926 $\pm$ 422	898 $\pm$ 271	936 $\pm$ 348	1424 $\pm$ 637*
ЛПС (n = 5)	725 $\pm$ 174	647 $\pm$ 216*	597 $\pm$ 197*	572 $\pm$ 146*

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (ПО 0 мкг/мл).

5. *Молекулярные механизмы действия ПО.* С помощью электронной микроскопии с использованием ПО, меченного коллоидным золотом, установлено, что после прилипания к поверхности клетки ПО проникает в ее эндосомальный компартмент (рис. 14, 15). Это проникновение не сопровождается повышением концентрации внутриклеточного кальция. Но в нейтрофилах, моноцитах и лимфоцитах наблюдается достоверное повышение микромолярных концентраций внутриклеточной перекиси водорода, причем наиболее сильное в нейтрофилах (рис. 16, 17) [17]. Перекись водорода — сильный внутриклеточный мессенджер, ингибирующий фосфатазы и активирующий JAK-киназы, протеинкиназу C и транскрипционный фактор NF- κ B. Действительно, с помощью проточной цитометрии (рис. 18) было показано, что ПО вызывает активацию фактора NF- κ B и транслокацию его в ядро клетки.

Таким образом, на основании этих данных можно считать, что эффект ПО, по крайней мере в отношении провоспалительных цитокинов, связан с прямой или опосредованной через РКС стимуляцией транскрипционного фактора NF- κ B (рис. 19), включающего транскрипцию нескольких сот генов воспаления и иммунного ответа [10, 15, 17, 18].

Important findings were obtained after costimulation of MNC with PO and activators (table 10). Simultaneous cell induction with phytohemagglutinin and PO led to increased synthesis of TNF α , more markedly at maximum dose ($p < 0.05$). Phytohemagglutinin is a well known lymphocytes stimulator that also can produce TNF α . Since PO mainly activates monocytes, then these stimuli may contribute to a common effect or a cascade mechanism may take place, i.e. PO activates monocytes that transfer the activation signal to lymphocytes resulting in increased total production of the proinflammatory cytokine. The LPS and PO coinfection results in a 1.2- to 1.6-fold decrease in stimulated production of TNF α ($p < 0.05$).

Table 10
PO costimulating effect on TNF- α synthesis (pg/ml, mean $\pm$ SD) induced by PHA (5 mcg/ml) and LPS (100 ng/ml)

Inducer	PO 0 mcg/ml	PO 1 mcg/ml	PO 10 mcg/ml	PO 100 mcg/ml
PHA (n = 5)	926 $\pm$ 422	898 $\pm$ 271	936 $\pm$ 348	1424 $\pm$ 637*
LPS (n = 5)	725 $\pm$ 174	647 $\pm$ 216*	597 $\pm$ 197*	572 $\pm$ 146*

* $p < 0,05$ compared to control group (PO 0 mcg/ml).

5. *Molecular mechanisms of PO activity.* Electronic microscopy using colloid gold-labeled PO demonstrated that after adhesion to cell surface PO penetrated into the cell endosomal compartment (figs. 14, 15). This penetration was not associated with increase in intracellular calcium levels. However, neutrophils, monocytes and lymphocytes showed a significant increase in hydrogen peroxide micromolecular concentrations which were most marked in neutrophils (figs. 16, 17) [17]. Hydrogen peroxide is a strong intracellular messenger that inhibits phosphatases and activates JAK-kinases, protein kinase C and transcription factor NF- κ B. Indeed, as shown by flow cytometry (fig. 18), PO induced NF- κ B activation and translocation into the cell nucleus.

These findings suggest therefore that PO effect at least on proinflammatory cytokines was due to direct or PKC-mediated stimulation of NF- κ B (fig. 19), involving transcription of several hundred inflammatory and immune response genes [10, 15, 17, 18].

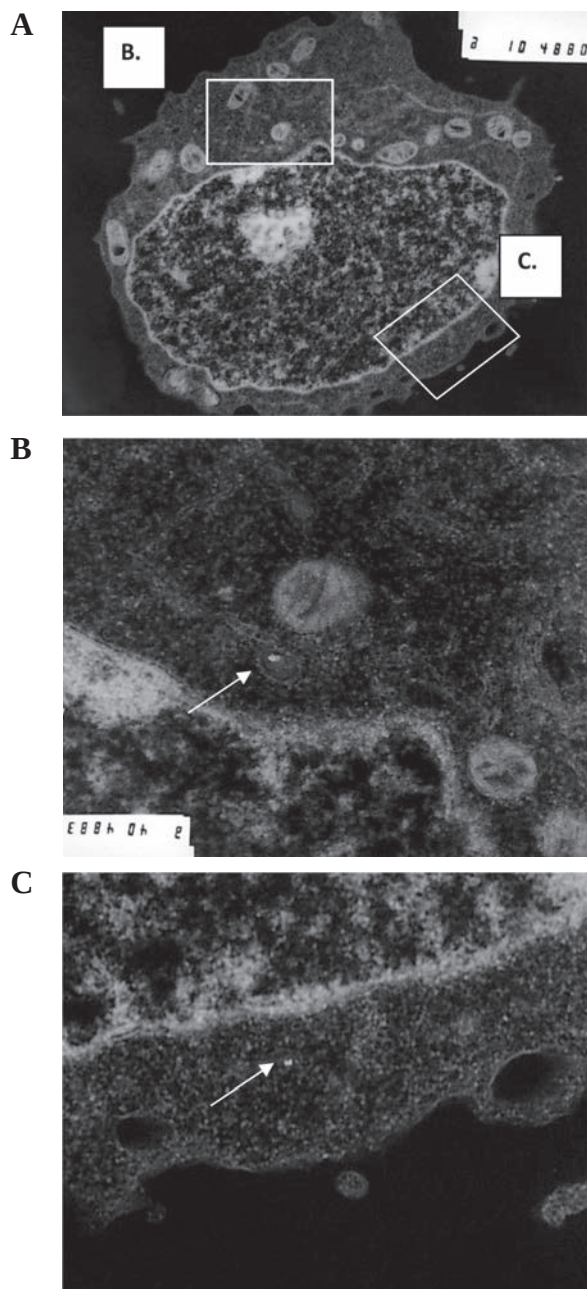


Рис. 14. Везикулы с Au-ПО в моноците. Микрофотографии электронно-микроскопического исследования. (А) Фагоцит с двумя везикулами, содержащими полиоксидоний (200 мкг/мл), меченный коллоидным золотом. (В, С) Увеличенная микрофотография моноцита: соответственно 1-я и 2-я везикулы с золотом, отмеченные стрелками

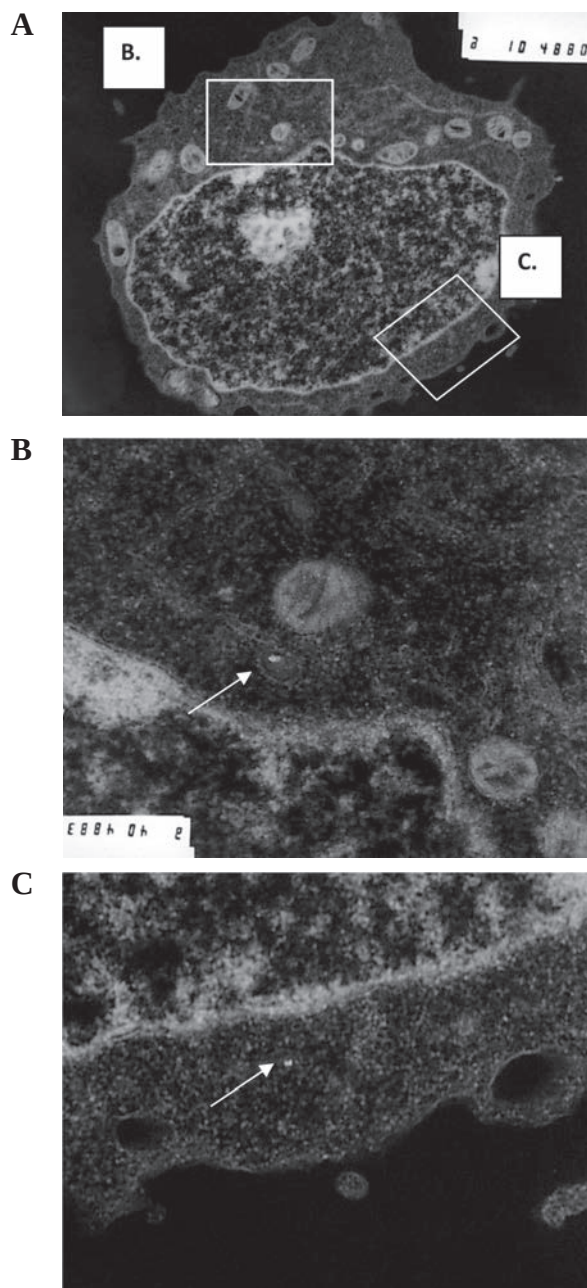


Fig. 14. Au-PO containing vesicles in a monocyte. Electronic microscopic images. (A) A colloid gold-labeled phagocyte with two PO-containing vesicles (200 mcg/ml). (B, C) Monocyte enlarged photos: vesicles 1 and 2 with gold arrowed

А

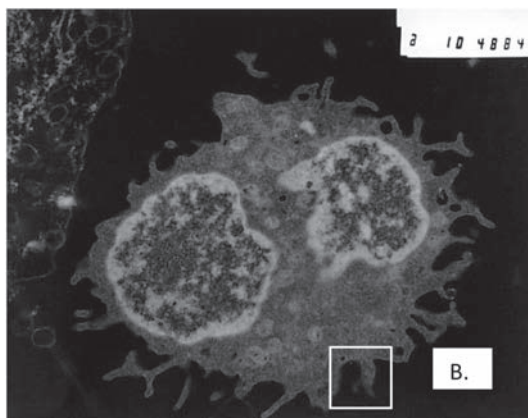
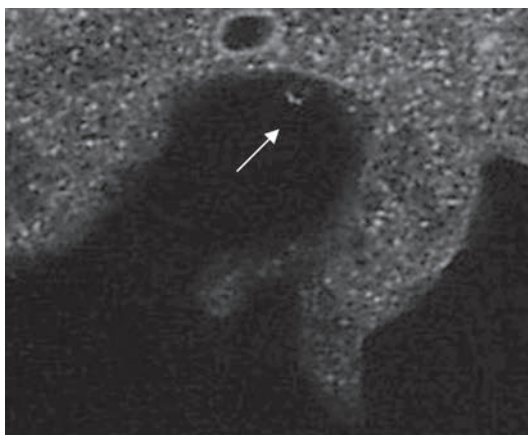


Рис. 15. (А) Захват комплексов коллоидного золота с полиоксидонием (200 мкг/мл) фагоцитом периферической крови. (В) Увеличение нейтрофила (стрелкой показаны частицы коллоидного золота)

В



A

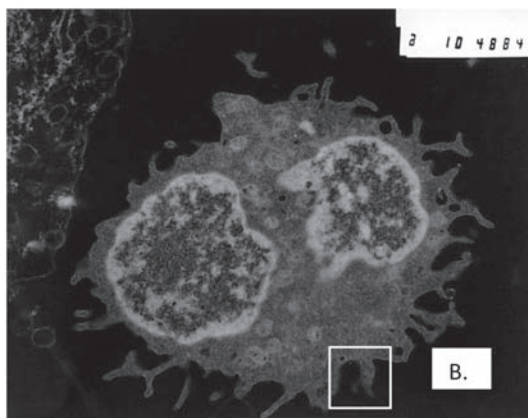
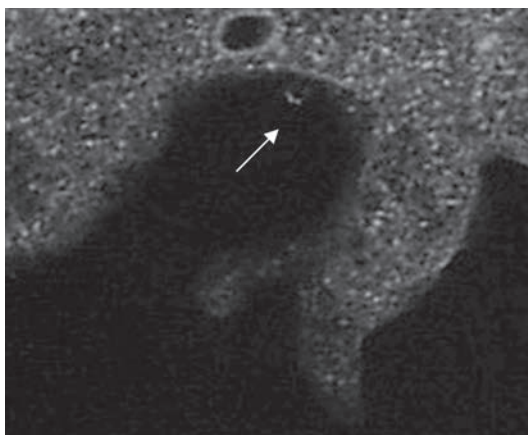
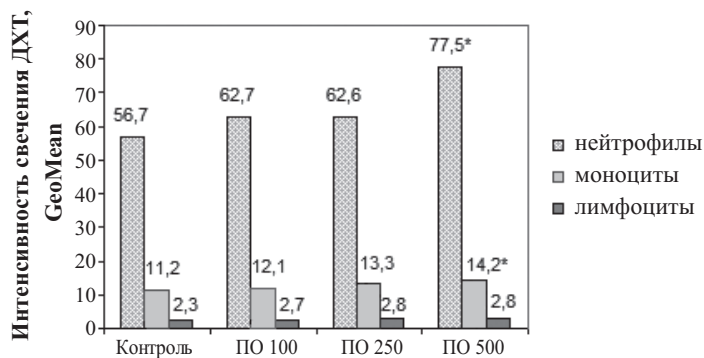


Fig. 15. (A) Peripheral blood phagocyte captures colloid gold -PO (200 mcg/ml) complexes — Au-PO. (B) Neutrophil enlarged photo: colloid gold particles arrowed

B





* $p < 0,05$ по сравнению с контролем (без ПО).

Рис. 16. Влияние полиоксидония (100, 250 и 500 мкг/мл) на уровень синтеза внутриклеточной перекиси водорода, оцениваемого по флюоресценции дихлорфлуоресцеин диацетата (ДХФ) (GeoMean) ($n = 15$)

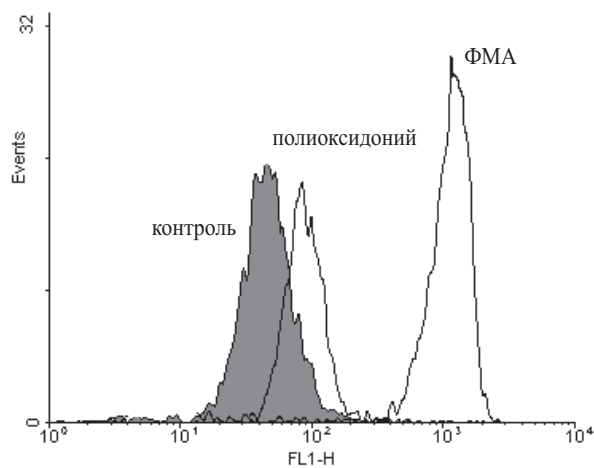


Рис. 17. Цитофлуорограмма ДХФ-теста. Влияние полиоксидония (500 мкг/мл) на уровень внутриклеточной перекиси водорода в нейтрофилах периферической крови доноров. ФМА в дозе 100 нг/мл

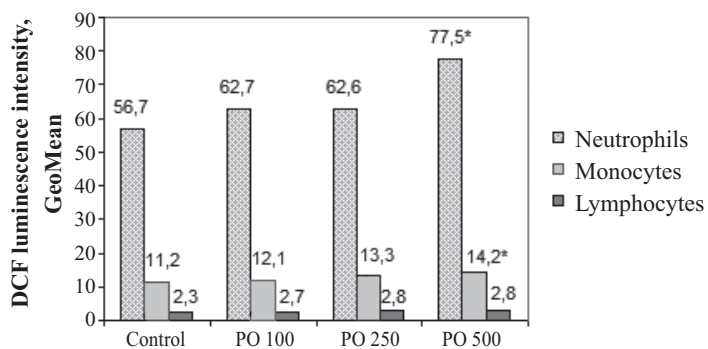


Fig. 16. PO (100, 250 and 500 mcg/ml) effect on synthesis of intracellular hydrogen peroxide as assessed by DCF fluorescence (GeoMean) (n = 15).

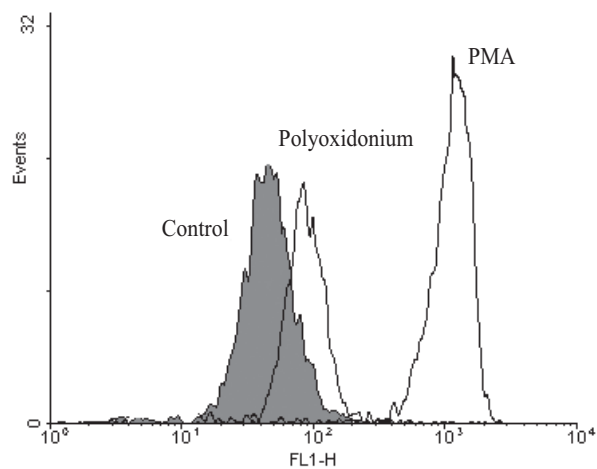
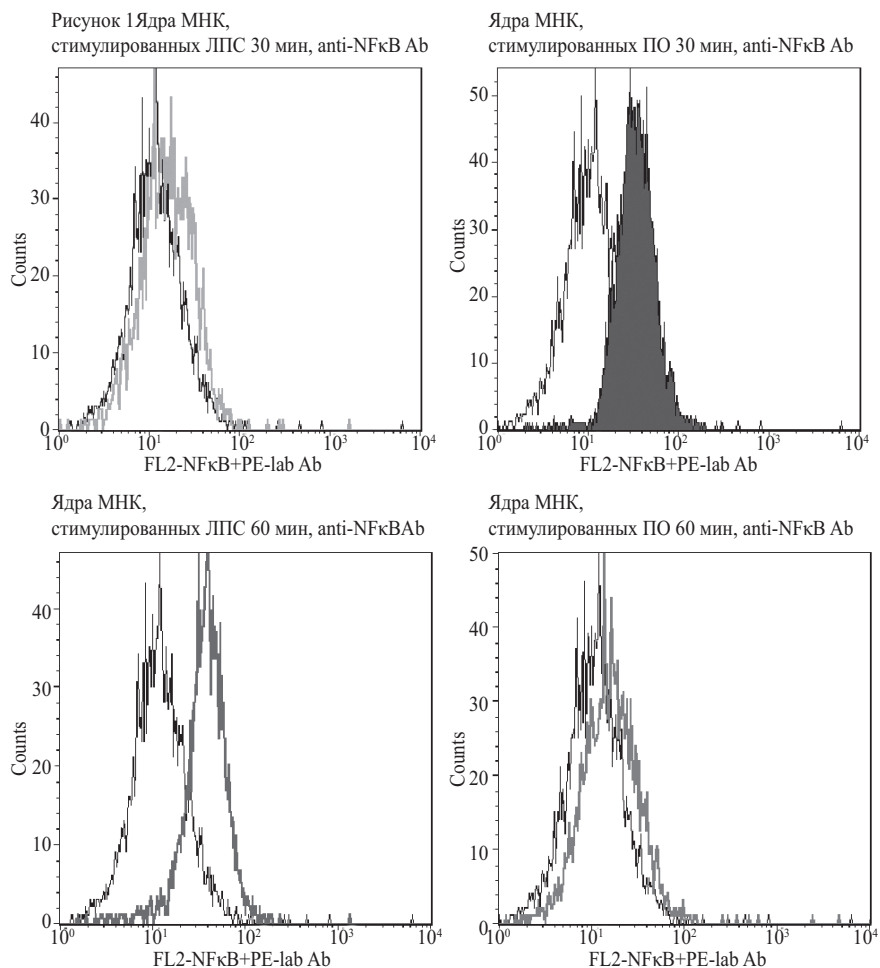


Fig. 17. DCF test cytofluorogram. PO (500 mcg/ml) effect on intracellular H_2O_2 levels in donors; peripheral blood neutrophils. PMA at 100 ng/ml



Процент содержания ядерного NF-κB в моноцитах крови доноров

	15 мин	30 мин	60 мин
Спонт.	14 %	29 %	53 %
ЛПС	80 %	52 %	92 %
ПО	24 %	91 %	48 %

Рис. 18. Активация транскрипционного фактора NF-κB полиоксидонием (контроль — липополисахариды)

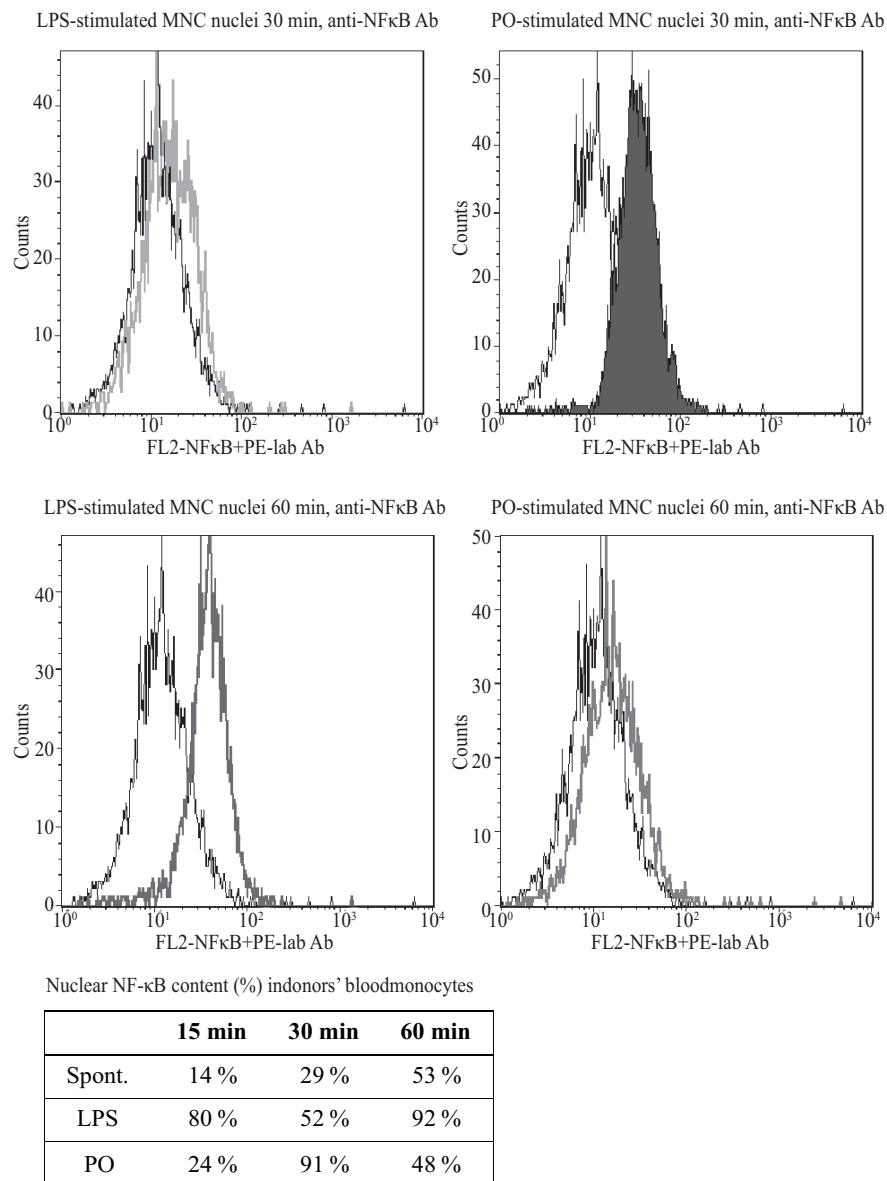


Fig. 18. PO activates transcription factor NF- κ B (control with LPS)

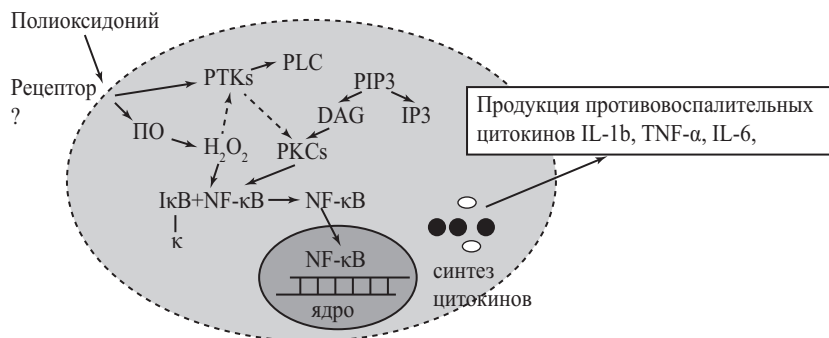


Рис. 19. Модель активации клетки-мишени полиоксидонием

Вместе с этим необходимо отметить, что ПО не обладает способностью индуцировать или усиливать образование активных форм кислорода, регистрируемых с помощью как люминолзависимой, так и люцигенинзависимой хемилюминесценции (первый вид хемилюминесценции идентифицирует супероксидный радикал, второй — перекись водорода). Напротив, во всех исследованных концентрациях ПО резко подавлял спонтанное образование активных форм кислорода (табл. 11). Менее эффективно он ингибировал образование активных форм кислорода, индуцированных опсонизированным зимозаном. Однако при больших концентрациях препарата (500 мкг/мл) происходило значимое подавление образования как супероксидного радикала, так и перекиси водорода [10].

Таблица 11

Влияние полиоксидония на хемилюминесценцию (ХЛ)

ХЛ, мВ/мин	ХЛ в присутствии ПО			
	0	100 мкг/мл	250 мкг/мл	500 мкг/мл
Люминолзависимая				
Спонтанная	18,3 ± 5,9	2,4 ± 0,6*	1,9 ± 0,6*	1,5 ± 0,6*
Индукцированная	340,7 ± 81	304,2 ± 52	245,0 ± 62	104,7 ± 68*
Люцигенинзависимая				
Спонтанная	16,0 ± 3,0	н. д.	1,6 ± 1,2*	0,5 ± 0,17*
Индукцированная	53,6 ± 19,9	н. д.	48,5 ± 16	25,7 ± 14,3*

* $p < 0,05$ по сравнению с хемилюминесценцией в отсутствие ПО.

н. д. — не делали.

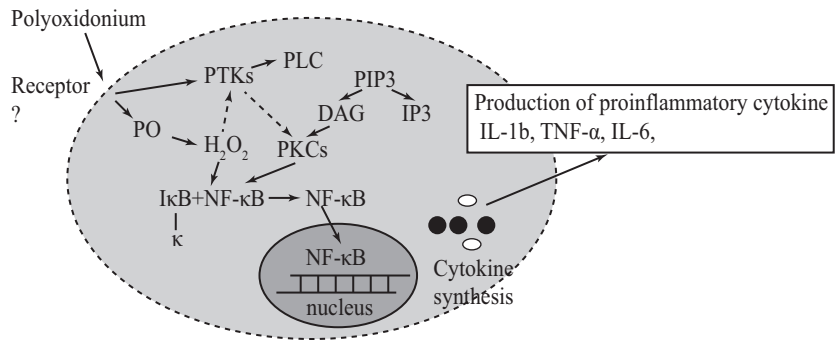


Fig. 19. Model for PO target cell activation

However, PO failed to induce or enhance production of oxygen active forms as detected by luminol- and lucigen-dependent chemoluminescence (the former identifying superoxide radicals, the latter identifying hydrogen peroxide). On the contrary, PO at all concentrations studied inhibited dramatically spontaneous production of oxygen active forms (table 11). PO inhibition of opsonized zimozan-induced oxygen active forms was less effective. However, PO at high concentrations (500 mcg/ml) demonstrated significant suppression of production of both superoxide radicals and hydrogen peroxide [10].

Table 11

PO effect on chemiluminescence (CL).Significance of differences

CL, mV/min	CL in the presence of PO			
	0	100 mcg/ml	250 mcg/ml	500 mcg/ml
Luminol-dependent				
Spontaneous	18.3 ± 5.9	2.4 ± 0.6*	1.9 ± 0.6*	1.5 ± 0.6*
Induced	340.7 ± 81	304.2 ± 52	245.0 ± 62	104.7 ± 68*
Lucigenin-dependent				
Spontaneous	16.0 ± 3.0	ND	1.6 ± 1.2*	0.5 ± 0.17*
Induced	53.6 ± 19.9	ND	48.5 ± 16	25.7 ± 14.3*

* $p < 0.05$ vs. Chemiluminescence without PO.
ND — not done.

В дополнение к этому получены экспериментальные данные об умеренной способности ПО к перехвату водных радикалов и гидрофобных радикалов. Вместе с этим показано, что ПО взаимодействует с каталитически активными ионами двухвалентного железа, где ПО проявляет свойства хелатора Fe^{2+} и окислителя Fe^{2+} в Fe^{3+} . Известно, что если в цитоплазме клеток возникают условия для хелатирования и/или окисления каталитически активного пула ионов двухвалентного железа (Fe^{2+}) в каталитически неактивное состояние ионов Fe^{3+} , что приводит к снижению действующей концентрации гидроксильных радикалов, то создаются условия для достижения микромолярных концентраций активных форм кислорода в цитоплазме клеток и активации свободнорадикального механизма синтетических процессов.

При возникновении и развитии ряда воспалительных заболеваний наблюдается активация генерализованных свободнорадикальных реакций. Это обусловлено двумя основными причинами: увеличением уровня продукции первичных и вторичных радикалов-инициаторов и участников свободнорадикальных реакций (стадия инициации) и появлением катализаторов свободнорадикальных реакций, в основном ионов Fe^{2+} (стадия разветвления цепей окисления). Отсюда следует, что ингибирование свободнорадикальных реакций может осуществляться как за счет перехвата радикалов, так и за счет элиминации каталитически активных ионов Fe^{2+} . Последнее особенно важно при патологиях, для которых характерно нарушение целостности кровеносных сосудов и выливание крови в ткань: раны, инсульты, желудочные кровотечения, гемофтальмы и т.д. ПО, обладая свойством хелатирования Fe^{2+} и окисления Fe^{2+} в Fe^{3+} , будет ингибировать катализ свободнорадикальных реакций и тем самым тормозить свободнорадикальное окисление [19].

Заключение

Показано, что ПО:

- с сохранением нативной структуры АГ и антигенной специфичности осуществляет прочное связывание с АГ различной природы, обеспечивая физическую презентацию АГ антигенпредставляющих клеток;
- усиливает антительный ответ на слабые АГ и обеспечивает выраженный иммунный ответ на сниженные дозы АГ;
- улучшает структуру иммунного ответа при иммунодефицитах различной этиологии;
- проявляет антиоксидантные свойства, обладая свойством хелатирования Fe^{2+} и окисления Fe^{2+} в Fe^{3+} , за счет чего способен тормозить свободнорадикальное окисление, создавая условия для достижения микромолярных концентраций активных форм кислорода в цитоплазме клеток и активации свободнорадикального механизма синтетических процессов;

In addition, we have experimental data showing PO moderate ability to intercept water radicals or hydrophobic radicals. It has also been shown that PO interacts with catalytically active ions of bivalent iron, where PO demonstrates properties of Fe^{2+} chelator and Fe^{2+} oxidizer into Fe^{3+} . As known, if there are conditions for chelation and/or oxidation of catalytically active pools of bivalent iron (Fe^{2+}) into catalytically inactive ions Fe^{3+} which in turn leads to decrease in hydroxyl radical concentration in cell cytoplasm, then micromolecular concentrations of oxygen active forms may be seen in cell cytoplasm with activation of free radical mechanism of synthesis.

Development of some inflammatory diseases is associated with activation of generalized free radical reactions. The following two reasons account for this, i.e. increased production of primary and secondary initiator radicals and participants of free radical reactions (initiation stage) and appearance of catalysators of free radical reactions, mainly Fe^{2+} ions (oxidation chain branching stage). It follows then that inhibition of free radical reactions may occur due to both radical interception and elimination of catalytically active ions Fe^{2+} . The latter is of most importance in diseases characterized by blood vessel disintegration and blood leakage into tissues, such as wounds, strokes, gastric bleeding, hemophthalmos etc. PO able to chelate Fe^{2+} and oxidize Fe^{2+} into Fe^{3+} can inhibit catalysis of free radical reactions and thus slow down free radical oxidation [19].

Conclusion

PO is shown:

- to bind strongly to various AGs thus providing physical AG presentation by AFC with the AG native structure and specificity preserved;
- to enhance AB response to weak AGs and to ensure marked immune response to AG decreased doses;
- to improve immune response structure in cases with immune deficiency of various origin;
- to possess antioxidant properties by chelating Fe^{2+} and oxidizing Fe^{2+} into Fe^{3+} , and thus to inhibit free radical oxidation and to make conditions for micromolecular concentrations of oxygen active forms in cell cytoplasm and activation of free radical synthesis mechanisms;

- является стабильным нетоксичным водорастворимым соединением; в организме подвергается деструкции; выводится почками.

Адьювантная активность ПО осуществляется за счет множественного действия на клетки как врожденного, так и приобретенного иммунитета и проявляется на различных этапах иммунного ответа:

- клетками-мишенями для ПО в условиях *in vitro* служат факторы ранней защиты организма от инфекции (факторы естественной резистентности) — моноциты/макрофаги, нейтрофилы и НК-клетки;
- активация кислороднезависимых механизмов бактерицидности нейтрофилов;
- активация специфических антигенпредставляющих клеток (макрофагов, моноцитов, дендритных клеток) и выработки ими значимых цитокинов, усиление экспрессии костимулирующих рецепторов;
- усиление исходно пониженной цитотоксичности НК-клеток, восстановление цитотоксических свойств нейтрофилов раковых больных;
- увеличение АОК в иммунокомпетентных органах;
- усиление выработки нейтрализующих IgG.

Свойства ПО как адьюванта, изученные на различных моделях *in vivo* и *in vitro*, реализованы в ряде вакцинных препаратов, как внедренных в клиническую практику, так и находящихся на разных этапах разработки и исследования.

Литература / Literature

1. Пинегин Б.В., Хаитов Р.М., Некрасов А.В., Пучкова Н.Г., Иванова А.С., Климова С.В., Кулаков В.В., Петров Р.В., Хамидуллина К.Ф., Мазуров Д.В., Дамбаева С.В., Аттауллаханов Р.И. Полиоксидоний — препарат нового поколения иммуномодуляторов с известной структурой и механизмом действия. Иммунология. 2000; 5: 24–28.
2. Некрасов А.В., Пучкова Н.Г., Иванова А.С. и др. Производное поли-1,4-этиленпиперазина, обладающее иммуномодулирующей, противовирусной и антибактериальной активностью. Пат. РФ № 2073031, 1997.
3. Мастернак Т.Б., Скворцов В.Ю., Ларин А.С., Горбачева Л.Д., Чижевская М.А., Малкина Е.Ю., Горбачева Е.В., Шарова О.В., Иванова А.С., Пучкова Н.Г., Некрасов А.В. К механизму иммуномодулирующего действия полиоксидония: дополнительные сведения. Аллергия, астма и клиническая иммунология. 2000; 9: 14–20.
4. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Мастернак Т.Б., Манько В.М., Руднева Т.Б., Алексеева Н.Ю., Кожина Е.В., Ларин А.С., Шарова О.В., Мал-

- to be a stable, non toxic water-soluble compound; to undergo destruction in the body; to be excreted by kidneys.

PO adjuvant activity is due to multiple actions on cells of both innate and acquired immunity and is observed at different stages of immune response:

- PO *in vitro* target cells include factors of body's early anti-infection defense (natural resistance factors) such as monocytes/macrophages, neutrophils and NK-cells;
- activation of neutrophil oxygen-independent bactericidal mechanisms;
- activation of specific antigen-presenting cells (macrophages, monocytes, dendritic cells) and their production of important cytokines, enhancement of expression of costimulating receptors;
- enhancement of baseline decreased cytotoxicity of NK-cells, recovery of neutrophil cytotoxicity in cancer patients;
- increase in levels of antibody forming cells in immunocompetent organs;
- enhancement of neutralizing IgG production.

Polyoxidonum adjuvant properties have been studied in multiple *in vivo* and *in vitro* models and implemented in several vaccinal products that are already used in the clinical practice or are at various stages of development.

кина Е.Ю., Горбачева Л.Д., Иванова А.С., Пучкова Н.Г., Некрасов А.В. Коррекция иммунодефицитных состояний с помощью иммуномодулятора «Полиоксидоний». Аллергия, астма и клиническая иммунология. 2000; 9: 3–7.

5. Манько В.М., Руднева Т.Б., Разваляева Н.А., Пучкова Н.Г., Хаитов Р.М. Фенотипическая коррекция генного контроля иммунного ответа на гриппозную вакцину. Иммунология. 1997; 4: 36–39.
6. Калюкина А.С. Изучение возможности применения рекомбинантного белка HSP70 туберкулезной микобактерии в профилактике туберкулеза. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. М., 2007.
7. Литвинов В.И., Леви Д.Т., Романова Р.Ю. Новая противотуберкулезная вакцина адъювантного типа. Сравнительный анализ ее протективных свойств с вакциной БЦЖ и с комплексным препаратом БЦЖ-Полиоксидоний. Аллергия, астма и клиническая иммунология. 2001; 1: 20–22.
8. Дьяконова В.А., Климова С.В., Кулаков В.В., Савинова И.В., Пинегин Б.В. Изучение взаимодействия полиоксидония с клетками иммунной

- системы при помощи проточной цитофлюориметрии. Иммунология. 2002; 6: 334–337.
9. Кулаков В.В., Воробьева Н.В., Пинегин Б.В. Изучение цитостатической и цитотоксической активности нейтрофилов периферической крови человека. Иммунология. 1997; 4: 19–20.
 10. Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хаитов Р.М. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения. Цитокины и воспаление. 2004; 3(3): 41–47.
 11. Dambaeva S.V., Mazurov D.V., Golubeva N.M., D'yakonova V.A, Pinegin B.V., Khaitov R.M. Effect of Polyoxidonium on the Phagocytic Activity of Human Peripheral Blood Leukocytes. Russ. J. Immunol. 2003; 8(1): 53–60.
 12. Dambaeva S.V., Mazurov D.V., Golubeva N.M., D'yakonova V.A, Pinegin B.V. The effect of polyoxidonium, a novel immunomodulator, on the phagocytic activity of human peripheral blood leukocytes. Centr. Eur. J. Immunol. 2003; 28(2): 127–33.
 13. Sallusto F., Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J Exp Med. 1994; 179(4): 1109–18.
 14. Пинегин Б.В., Варфоломеева М.И. Влияние иммуномодулятора на синтез интерферонов. Лечащий врач. 2010; 10: 88–91.
 15. Дьяконова В.А., Дамбаева С.В., Голубева Н.М., Бураков В.В., Шаронов Г.В., Комогорова Е.Э., Пинегин Б.В. Изучение механизма действия иммуномодулятора полиоксидония на клеточном и молекулярном уровнях на клетках периферической крови человека в условиях *in vitro*. Физиология и патология иммунной системы. 2004; 8(2): 100–115.
 16. Дьяконова В.А., Климова С.В., Ким К.Ф., Пинегин Б.В. Продукция цитокинов под действием полиоксидония *in vitro*. Иммунология. 2002; 6: 337–340.
 17. Дьяконова В.А., Бураков В.В., Шаронов Г.В., Пинегин Б.В. Изучение клеточных и молекулярных механизмов взаимодействия иммуномодулятора полиоксидония с клетками иммунной системы человека. Иммунология. 2004; 3: 145–152.
 18. Dyakonova V.A., Dambaeva S.V., Pinegin B.V., Khaitov R.M.. Study of interaction between the polyoxidonium immunomodulator and the human immune system cells. International Immunopharmacology. 2004; 4: 1615–1623.
 19. Клебанов Г.И., Любичкий О.Б., Дьяконова В.А. Изучение антиоксидантных свойств иммуномодулятора полиоксидония. Иммунология. 2005; 26(4): 200–205.

Н.А. Козлов

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕЧЕБНОГО ПАТОМОРФОЗА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ ИММУНОТЕРАПИИ ПОЛИОКСИДОНИЕМ

Отдел патоморфологии ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина» Минздрава России

Введение

Ранее нами было описано клиническое наблюдение полного лечебного патоморфоза инвазивного рака молочной железы у больной 32 лет, получившей 7-дневный курс иммунотерапии ПО с последующей операцией в объеме радикальной мастэктомии [1]. При маммографическом исследовании в нижне-наружном квадранте левой молочной железы была обнаружена зона уплотнения размером 3 × 3,4 см. При кор-биопсии был выявлен инвазивный рак неспецифического типа G2 (рис. 1). На периферии и в центральных отделах опухоли отмечались редкие рассеянные лимфоидные клетки, гистологические признаки хронического воспаления, в том числе гранулематозного, отсутствовали.

Иммуногистохимическое исследование рецепторного статуса опухоли выявило отсутствие экспрессии в ее клетках рецепторов эстрогенов, рецепторов прогестерона и мембранной экспрессии Her2/neu; индекс Ki-67 составил 75 %, что соответствовало тройному негативному раку.

В предоперационном периоде на протяжении 7 суток больная получала ПО. После предоперационной иммунотерапии на следующий день больной была выполнена плановая радикальная мастэктомия. При исследовании операционного материала удаленной молочной железы в проекции нижне-наружного квадранта, соответствующего ложу опухоли, была обнаружена неоднородная зона уплотнения размером 6 × 5,5 × 5 см, без четких границ, представленная чередующимися участками серовато-желтого и темно-красного цвета, с отдельными дряблыми и западающими на поверхности срезов участками. На остальном протяжении ткань молочной железы была представлена макроскопически неизменными крупными жировыми дольками, разделенными утолщенными прослойками белесой стромы. Ложе опухоли было взято на исследование полностью.

При микроскопическом исследовании препаратов операционного материала удаленной молочной железы признаки наличия резидуальной опухоли в ее ткани и 18 регионарных лимфоузлах обнаружены не были. Дополнительно срезы ложа опухоли были окрашены антителами к панцитокератину, экспрессия которого была ограничена клетками предсуществующих протоков и до-

лек. По результатам выявленных изменений в ткани молочной железы было сделано заключение о наличии полного лечебного патоморфоза.

В настоящем исследовании мы даем морфологическую и иммуногистохимическую характеристику клеточного состава воспалительного инфильтрата в опухолевом ложе рака молочной железы с полным лечебным патоморфозом после иммунотерапии ПО.

Материалы и методы

Для сравнительного гистологического исследования нами были отобраны гистологические препараты кор-биопсии и операционного материала. Все срезы с парафиновых блоков окрашивались гематоксилином и эозином для проведения рутинного гистологического исследования. Парафиновые блоки операционного материала были отобраны для проведения иммуногистохимического исследования.

Иммуногистохимическое исследование выполнялось на серийных депарафинизированных срезах опухолевой ткани с помощью биотин-стрептавидинового иммунопероксидазного метода. Срезы толщиной 3–5 мкм депарафинизировали и регидратировали по стандартной схеме. Для демаскировки антигенов проводили предварительную обработку депарафинизированных срезов в водяной бане при 95°C в течение 40 мин с использованием цитратного буфера pH 6,0 (Dako). Срезы инкубировали с первичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве вторичных антител и пероксидазного комплекса использовали стандартный набор реагентов LSAB + Kit или систему детекции Super Sensitive™ Polymer-HRP («BioGenex»). Для визуализации реакции применялся раствор диаминобензидина DAB + (Dako). Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера.

Иммуногистохимическая панель включала антитела к CD4 (4B12, BioGenex), CD8 (C8/144B, CellMarque), CD20 (L26, BioGenex), CD163 (10D6, DBS), панцитокератину (AE1/AE3, DBS), CD3 (EP41, Eptomics), CD68 (KP1, Dako), IgG4 (MRQ-44, CellMarque). Экспрессия всех маркеров оценивалась полуколичественно с указанием процентного содержания антиген-позитивных клеток в срезе.

Результаты

Гистологические особенности и клеточный состав инфильтрата в ложе опухоли

Исследование гистологических препаратов операционного материала рака молочной железы показало, что ткань железы вне выявленных изменений имела сохранную гистоархитектонику и была представлена разнокалиберными прото-

ками, терминальными дольково-протоковыми единицами, несколько утолщенной гипоклеточной коллагеновой стромой и преобладающей жировой тканью. В свою очередь, выраженные изменения в строении органа наблюдались в ложе опухоли, где были отмечены массивные поля реактивной фиброзной ткани, на большом протяжении замещающие или очагово сдавливающие предсуществующие железистые структуры и жировую ткань. Обращала на себя внимание резкая граница между опухолевым ложем и интактной тканью молочной железы.

Около 70 % площади полей фиброза было занято очагами полиморфного воспалительного инфильтрата, либо концентрирующегося вокруг предсуществующих протоков и долек со ступенчатым их контуром, либо расположенного в виде зонального скопления клеток, разделенных широкими прослойками фиброзной ткани, в сочетании с редкими лимфогистиоцитарными элементами (рис. 2А). Среди воспалительных клеток отмечались рассеянные мелкие ненекротизирующиеся эпителиоидноклеточные гранулемы (диаметром 0,1–0,2 мм) и скопления гигантских многоядерных клеток инородных тел (рис. 2С). Центральные отделы гранулем содержали округлые пустоты с четкими границами, соответствующими скоплениям липидов, окруженным полиморфноядерными лейкоцитами, и широким ободком эпителиоидноклеточных гистиоцитов (рис. 2В). Помимо нейтрофилов в состав гранулем входили единичные лимфоциты. Расположение гранулем не было четко связано с долями или протоками и носило произвольный характер.

На отдельных участках в зонах наиболее плотной инфильтрации определялись острые абсцессы, центральные отделы которых содержали большое количество полиморфноядерных лейкоцитов и некротического детрита. Вокруг отдельных протоков и долек отмечалась циркулярная инфильтрация лимфоидными клетками, варьирующая от рыхлой до очень плотной. Лимфоидные фолликулы, в том числе с герминативными центрами, на всем протяжении исследованного материала отсутствовали.

Среди клеток воспалительного инфильтрата определялись полиморфноядерные нейтрофилы (15–20 %), отдельные эозинофилы (до 5 %), многочисленные малые лимфоциты (55–60 %), рассеянные плазматические клетки (10 %) и эпителиоидные гистиоциты (10 %) (рис. 2Д).

На всем протяжении фиброзного ложа опухоли среди клеток воспалительного ряда определялись диффузно рассеянные мелкие ветвящиеся сосуды с пролиферирующим эндотелием.

Иммуногистохимическая характеристика клеток воспалительного инфильтрата

Иммунофенотипирование клеток воспалительного инфильтрата в ложе опухоли показало, что соотношение CD3⁺ и CD20⁺ лимфоцитов носило прак-

тически эквивалентный характер. Т- и В-лимфоциты диффузно распределялись по ложу опухоли, не формируя каких-либо значимых скоплений (рис. 3А, В). В свою очередь, по результатам экспрессии Т-клеточных маркеров было установлено, что среди Т-лимфоцитов клетки CD4+ и CD8+ представлены в равных долях. Распределение тех и других Т-лимфоцитов также носило диффузный характер, без образования четких агрегатов (рис. 3С, D).

Оценка экспрессии панмакрофагального маркера (CD68) выявила его наличие как в диффузно расположенных в инфильтрате одиночных гистиоцитах, так и в эпителиоидных макрофагах, формирующих гранулемы, и гигантских многоядерных клетках (рис. 3Е).

Дополнительно проведенная окраска препаратов одним из селективных макрофагальных маркеров выявила наличие диффузно рассеянных по ложу опухоли CD163+ макрофагальных элементов (рис. 3F), не участвующих в формировании гранул и не образующих каких-либо очаговых скоплений. Гистиоцитарные элементы гранул и гигантские многоядерные клетки инородных тел были CD163-негативны.

Экспрессия IgG4 в плазмочитарных элементах воспалительного инфильтрата выявлена не была.

Обсуждение

Проведенное нами иммуноморфологическое исследование опухолевого ложа рака молочной железы с полным лечебным патоморфозом позволило выявить следующие изменения: воспалительный инфильтрат был представлен как клетками неспецифического, так и специфического иммунного звена; среди последних в равных долях определялись элементы клеточного и гуморального иммунитета. Также в равных долях были представлены Т- и В-лимфоидные клетки. CD68-позитивные макрофагальные элементы были представлены как дискретно расположенными гистиоцитами, так и эпителиоидными макрофагами, формирующими гранулемы без некроза, и отдельными скоплениями гигантских многоядерных клеток инородных тел. Около 15–20 % клеток инфильтрата составляли гранулоциты с преобладанием нейтрофилов. Кроме того, по результатам экспрессии CD163 было установлено, что в опухоли присутствует большое количество дискретно расположенных опухоль-ассоциированных макрофагов M2-типа, отвечающих за противовоспалительные и репаративные процессы.

Также на основании результатов проведенного морфологического и иммунофенотипического анализа изменений в ткани молочной железы нами был исключен ряд неопухолевых патологических процессов, имеющих маммографическое, клиническое и морфологическое сходство с инвазивным раком. В

частности, в результате дифференциального диагноза нами были исключены лимфоцитарный мастит (диабетическая мастопатия), плазмоцитарный мастит, идиопатический (дольковый) гранулематозный мастит, перидуктальный мастит, сопровождающий эктазию протоков молочной железы, и IgG4-ассоциированный склерозирующий мастит.

Таким образом, выявленные иммуноморфологические изменения можно расценивать как сочетание картины специфической иммунной реакции, опосредованной наличием Т- и В-лимфоцитов и плазмоцитов, и острого воспалительного процесса, сопровождающегося формированием множественных абсцессов и гранулем вокруг некротизированной ткани.

Литература

1. Шамилов Ф.А., Тупицын Н.Н., Воротников И.К., Вишневская Я.А., Козлов Н.А., Сельчук В.Ю. Полиоксидоний в предоперационном лечении рака молочной железы. Полная регрессия опухоли в процессе неoadьювантной иммунотерапии. Иммунология гемопоза. 2015; 13(1): 101–112.

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. БЛОХИНА»
при финансовой поддержке
РОССИЙСКОГО ФОНДА
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

12-я Международная конференция
«Иммунология гемопоэза»

Тема конференции:
«От иммунодиагностики
к иммунологическому стадированию
и иммунотерапии рака»

Председатель: профессор Н.Н. Тупицын

Модераторы: профессор G. Janossy (UK),
профессор J.-F. Rossi (France)

Место проведения: г. РЫБИНСК, Ярославская область, Россия

4–6 июня 2015 года

ПРОГРАММА

04.06.2015 *Заезд участников конференции*

13.00–13.30 *Открытие конференции*

Приветственное слово G. Janossy (London), J.-F. Rossi (Montpellier, France), В.Ю. Сельчука, Н.Н. Тупицына (Москва), Д.А. Борисова.

I. ГЕМОБЛАСТОЗЫ. 8-ЦВЕТНЫЕ ПАНЕЛИ ЕВРО-ФЛОУ КАК СТАНДАРТ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ

Председатели: профессор Д. Джаносси (Англия), профессор Н.Н. Тупицын (Россия), профессор С.А. Луговская (Россия), Д. Майер (Германия)

13.30–14.30 *Desiree Meyer*, PhD Application Specialist (специалист по проточной цитометрии), BD Biosciences, Germany, Heydelberg «Панели диагностики лейкозов и лимфом Евро-Флоу: от создания до практического использования в европейских странах»

14.30–15.00 Канд. мед. наук **Л.Ю. Гривцова** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Острые лейкозы: иммунофенотипическая диагностика в дебюте болезни и мониторинг МРБ, использование подходов Евро-Флоу»

15.00–15.30 Канд. мед. наук **Н.А. Купрышина** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Иммунодиагностика периферических лимфом с использованием панелей Евро-Флоу»

15.30–15.50 Профессор **Н.Н. Тупицын** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Практическое использование панелей Евро-Флоу в диагностике плазмноклеточных и НК-клеточных заболеваний»

***15.50–16.10** **А.В. Семьянихина** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Маркеры, ассоциированные с повторяющимися транслокациями, в панелях Евро-Флоу»

***16.10–16.30** Канд. мед. наук **А.М. Попов** (Россия, Екатеринбург) «Эволюция многоцветных панелей антител для диагностики и мониторинга острых лейкозов»

16.30–17.30 Обсуждение. Дискуссия. Рекомендации конференции по внедрению панелей Евро-Флоу в России

Минисимпозиум: «Новое в люминисцентной диагностике лимфом»

17.30–17.50 Старший специалист, канд. физ.-мат. н. **С.А. Глазунова** (Thermo Fisher Scientific, Москва), канд. мед. наук **Е.Н. Шолохова** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Микроскопы EVOS в многоцветной флуоресцентной диагностике опухолей, примеры из практики»

17.50–18.10 Канд. мед. наук **П.А. Зейналова** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Диффузная В-крупноклеточная лимфома: новые иммунологические и гематологические факторы прогноза»

19.00 Ужин

Концерт лауреатов международных конкурсов, солистов Государственного академического театра «Московская оперетта» Екатерины Чудотворовой (сопрано) и Алексея Коровина (тенор), партия фортепиано — Людмила Семешко

05.06.2015

РОЛЬ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ КОСТНОГО МОЗГА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ В РАЗРАБОТКЕ ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ

Председатели: профессор З.Г. Кадагидзе (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва), профессор Ж.-Ф. Росси (Монпелье, Франция), профессор О.А. Рукавицын (ФГКУ «ГВКГ им. акад. Н.Н. Бурденко, Москва), канд. мед. наук К.Н. Мелкова (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва), д-р мед. н. И.С. Долгополов (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва)

9.00–9.20 Д-р мед. наук **И.С. Долгополов** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Эволюция взглядов на роль иммунотерапии в детской онкологии»

9.20–9.40 Канд. мед. наук **Г. Чкадуа** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Возможные иммунологические механизмы, реализации эффектов вакцинотерапии у детей с солидными опухолями»

9.40–10.20 Профессор. **Ж.-Ф. Росси** (Франция) «Effector cells for innate immune therapy (Tgammadelta and NK): from bench to bedside». «Эффекторные клетки врожденного иммунитета (Т-гамма/дельта, NK): от исследований к клинике»

10.20–10.40 Профессор **Н.Н. Тупицын** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Эволюция исследований костного мозга при саркомах в онкологическом научном центре имени Н.Н. Блохина»

10.40–10.55 Канд. мед. наук **Т.В. Горбунова** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «TCRγΔ лимфоциты и NK-клетки при саркомах у детей»

10.55–11.10 Канд. мед. наук **Л.Ю. Гривцова** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Костный мозг и мобилизованные периферические стволовые клетки, иммунологические сходства и различия»

11.10–11.30 Канд. мед. наук **К.Н. Мелкова** (зав. отделением трансплантации ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Возможности иммуно-терапевтических подходов с использованием аллогенного костного мозга во взрослой онкологии»

11.30–12.30 Обсуждение возможности создания иммунотерапевтического протокола, основанного на использовании аллогенного костного мозга, для предотвращения метастазирования в легкие при саркомах»

12.30–13.30 Обед

13.30–18.00 Экскурсия на теплоходе по Рыбинскому морю, экскурсии по историческому центру города и музеям

18.00–19.00 Ужин

06.06.2015

I. ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ СТАДИРОВАНИЕ РАКА. ИССЛЕДОВАНИЕ КОСТНОГО МОЗГА

Председатели: профессор В.Ю. Сельчук (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва), профессор И.К. Воротников (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва), профессор Л.Н. Любченко (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва)

9.30–10.00 Профессор **Н.Н. Тупицын** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Костный мозг онкологического больного: диссеминированные опухолевые клетки, иммунная система, гемопоэтическая ткань»

10.00–10.30 Канд. мед. наук **М.П. Никулин** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Поражение костного мозга при раке желудка»

***10.30–10.45** Канд. мед. наук **О.А. Богомолова** (Россия, Ульяновск) «Клиническое значение исследования костного мозга при раке молочной железы»

10.45–11.00 Старший специалист, канд. физ.-мат. наук **С.А. Глазунова** (Thermo Fisher Scientific, Москва) «Высокоскоростной проточный цитометр

Attune NxT с акустическим фокусированием для детекции очень редких событий»

***11.00–11.15** О.А. Безнос (Россия, Москва) «Обнаружение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных раком молочной железы методом проточной цитометрии с акустической фокусировкой»

***11.15–11.30** Аспирант **Е.С. Обаревич** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Клиническое значение исследования костного мозга больных диссеминированным раком желудка»

11.30–11.40 Канд. мед. наук **А.Д. Панахов** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Клиническое значение обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных раком предстательной железы»

11.40–11.50 **П.Б. Натальин**, PhD, руководитель отдела генетического анализа (Thermo Fisher Scientific, Москва), «Генетическое профилирование опухолей и периферийный мониторинг рака»

II. ПОЛИОКСИДОНИЙ В НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ТЕРАПИИ ОПЕРАБЕЛЬНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

***11.50–12.00** Канд. мед. наук **Ф.А. Шамилов** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Полная регрессия рака молочной железы в процессе неоадьювантной иммунотерапии полиоксидонием (описание случая)»

***12.00–12.15** Канд. мед. наук **Н.А. Козлов** (ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва) «Морфологический субстрат гранулематозного воспаления после эффективного лечения операбельного рака молочной железы полиоксидонием, приведшего к полной регрессии опухоли»

12.15–12.30 Канд. мед. наук **М.Б. Васильев, М.М. Васильева** (Воронежский онкологический диспансер, Воронеж, Россия) «Первый опыт неоадьювантной иммунотерапии рака молочной железы полиоксидонием»

12.35–13.00 Общая дискуссия, закрытие конференции

В рамках конференции проводится конкурс работ молодых ученых. Доклады молодых ученых отмечены в программе звездочкой (*). Руководитель конкурсной комиссии — председатель Совета молодых ученых ФГБНУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина» канд. мед. н. И.В. Самойленко

HI 13TH

INTERNATIONAL
CONFERENCE
HAEMATOPOIESIS
IMMUNOLOGY

BUDAPEST, HUNGARY

JUNE
3 & 4
2016



Bone marrow immunology in minimal residual cancer

Moderator:

Prof George Janossy, LONDON, UNITED KINGDOM

Chairmen:

Prof Klaus Pantel, HAMBURG, GERMANY

Prof Suleyman Dincer, ISTANBUL, TURKEY

Prof Jean-François Rossi, MONTPELLIER, FRANCE

www.imhaemo.ru

HI 13TH

INTERNATIONAL
CONFERENCE
HAEMATOPOIESIS
IMMUNOLOGY

BUDAPEST, HUNGARY
JUNE
3 & 4
2016

TOPICS

- **MRD in oncohaematology:
8-color Euroflow panels**
Desiree Meyer, GERMANY
- **Minimal cancer**
Prof Klaus Pantel, GERMANY
& Dr Catherine Alix-Panabières, FRANCE
- **Bone marrow immune system**
Dr Bruno Brando, MD PhD, ITALY
- **Immune therapy of MRD**
Prof Jean-Francois Rossi, FRANCE
- **Allogeneic bone marrow
in cancer treatment**
Prof Suleyman Dincer, TURKEY
- **Bone marrow cleaning from DTC:
new approaches based on PD-L1, CD47...**
To be determined

Location:

Hungarian Academy of Sciences,
Széchenyi István tér 9, 1051 Budapest, Hungary

Organization: com&co

Com&Co Events, Étienne Jarry
12, Bd Fellen, 13016 Marseille, France
Tel.: (+33) 4 91 09 70 53
Fax: (+33) 4 96 15 33 08
ejarry@comnco.com

www.imhaemo.ru

Рисунки к статье Жан-Ф. Росси

КАК ПОВЫСИТЬ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК-ЭФФЕКТОРОВ В ИММУНОТЕРАПИИ РАКА?

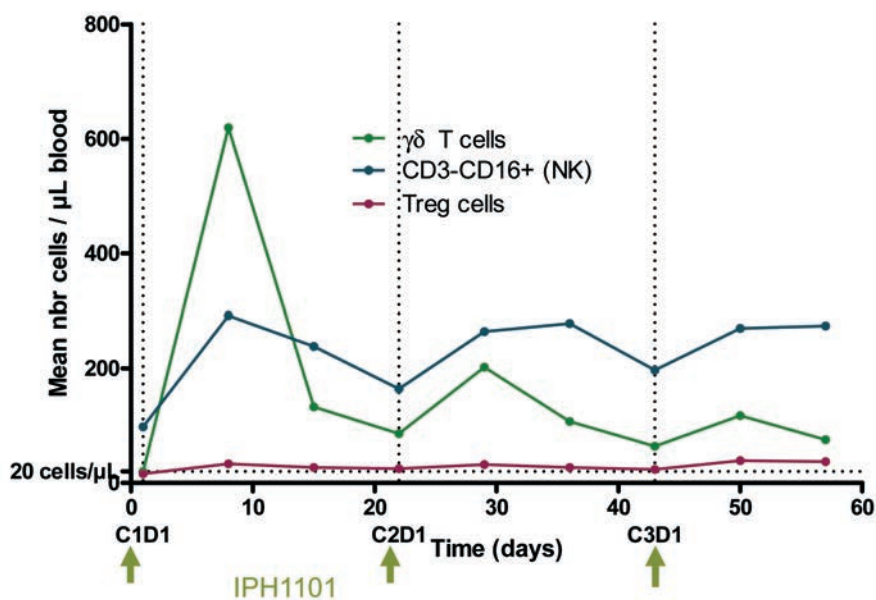


Рис. 1. Фармакодинамика иммунных клеток у больных фолликулярной лимфомой, включенных в клиническое исследование II фазы с амплификацией $\gamma\delta$ T-лимфоцитов *in vivo*

Nbr — число; C1D1 — цикл 1 день 1; Treg — регуляторные T-лимфоциты.

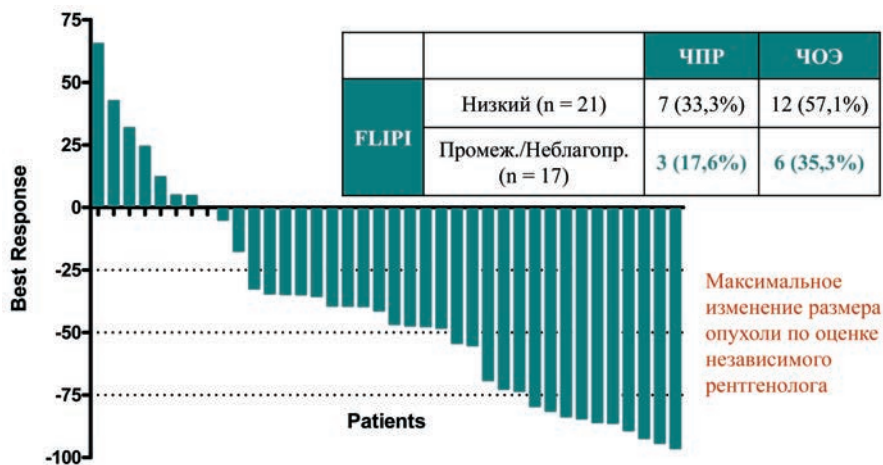


Рис. 2. Частота объективного эффекта в зависимости от индекса FLIPI и количественная оценка эффективности в клиническом исследовании II фазы с амплификацией $\gamma\delta$ T-лимфоцитов *in vivo*

ЧПР — частота полной ремиссии; ЧОЭ — частота объективного эффекта; FLIPI — международный прогностический индекс для фолликулярной лимфомы.

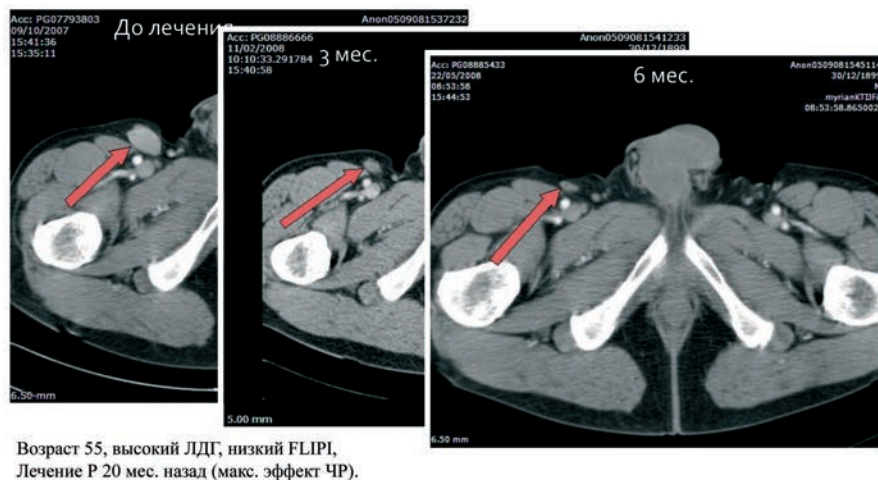


Рис. 3. Отложенная полная ремиссия у больного, включенного в клиническое исследование II фазы с амплификацией $\gamma\delta$ T-лимфоцитов *in vivo*

ЛДГ — лактатдегидрогеназа; FLIPI — международный прогностический индекс для фолликулярной лимфомы.

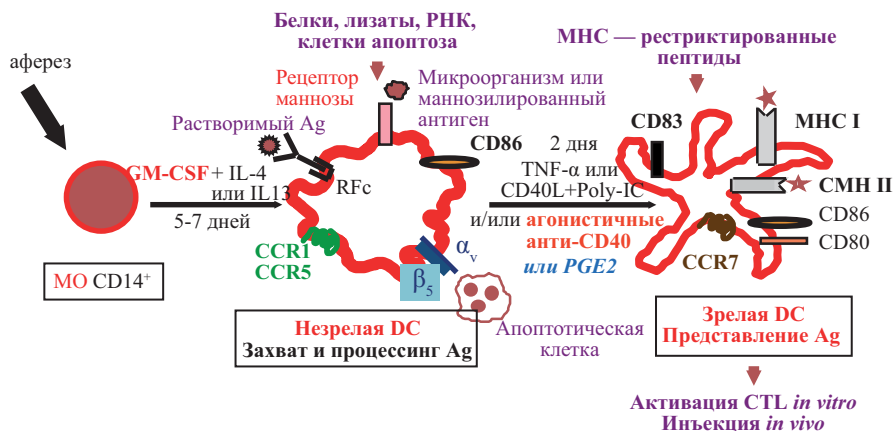


Рис. 4. Созревание и дифференцировка дендритных клеток (DC) из моноцитов (МО) *ex vivo*

CTL — цитотоксические Т-лимфоциты; Ag — антиген.

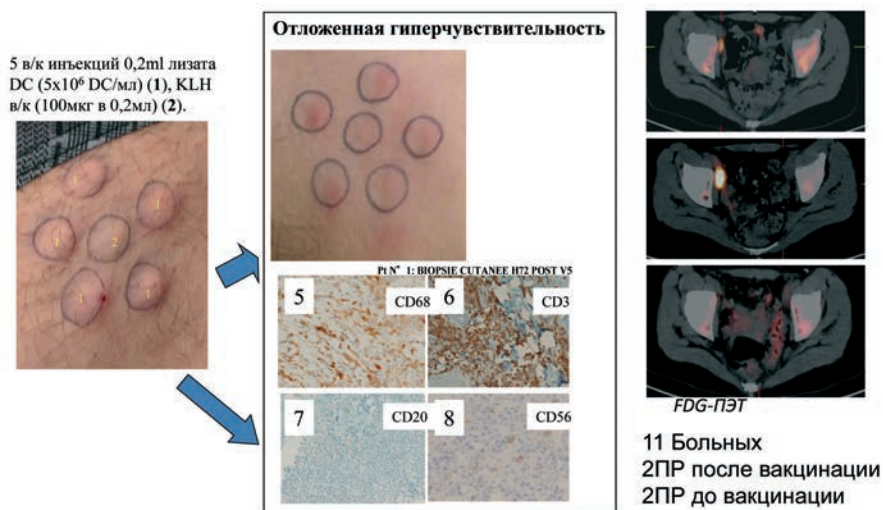


Рис. 5. Эффект гиперчувствительности на фоне введения клеточного лизата в комбинации с дендритными клетками с гистологическими данными и результатами позитронной эмиссионной томографии с ¹⁸F-фтордезоксиглюкозой в качестве мониторинга иммунного ответа

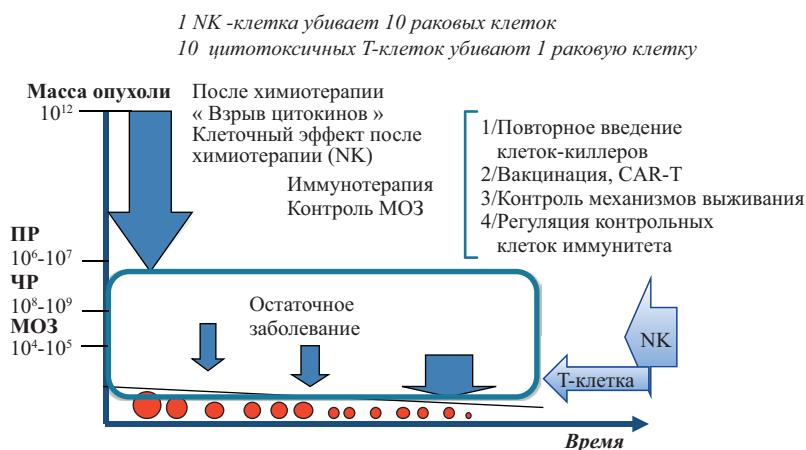


Рис. 6. Окно возможностей иммунной терапии при онкологических заболеваниях

Рисунки к статье Н.А. Козлова

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕЧЕБНОГО ПАТОМОРФОЗА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ ИММУНОТЕРАПИИ ПОЛИОКСИДОНИЕМ

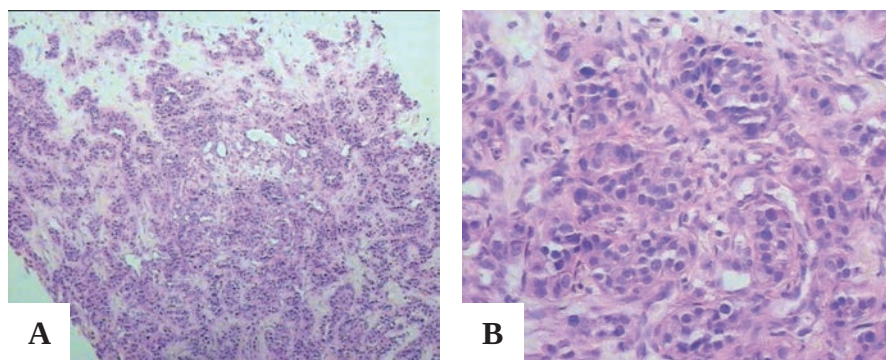


Рис. 1. (А) Биопсия узлового новообразования молочной железы. Инвазивный рак неспецифического типа G2. Инфильтративный край опухоли (верхняя часть снимка). Гематоксилин-эозин, увеличение $\times 50$. (В) Множественные солидные комплексы рака. Отмечаются единичные иммунные клетки, признаки гранулематозного воспаления отсутствуют. Гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$

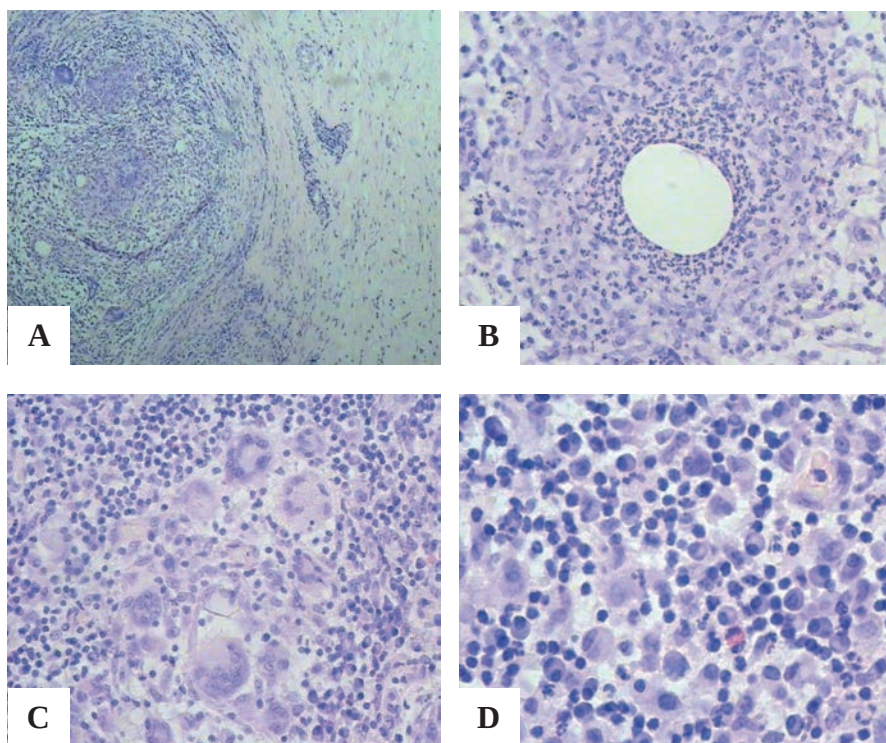


Рис. 2. (А) Опухолевое ложе содержит множественные гранулемы без очагов некроза, с плотной лимфоидной инфильтрацией по периферии и широкие поля фиброзной ткани, среди которых встречается редкие предсуществующие протоки молочной железы (левый верхний угол снимка). Гематоксилин-эозин, увеличение $\times 50$. (В) Эпителиоидноклеточная ненекротизирующая гранулема, в центре которой расположено крупное скопление липидов, окруженное полиморфноядерными нейтрофилами. Гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$. (С) Очаговые скопления гигантских многоядерных клеток инородных тел. Гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$. (D) В составе воспалительного инфильтрата определяются полиморфноядерные нейтрофилы, лимфоциты, плазматические клетки, эпителиоидные гистиоциты. Гематоксилин-эозин, увеличение $\times 400$

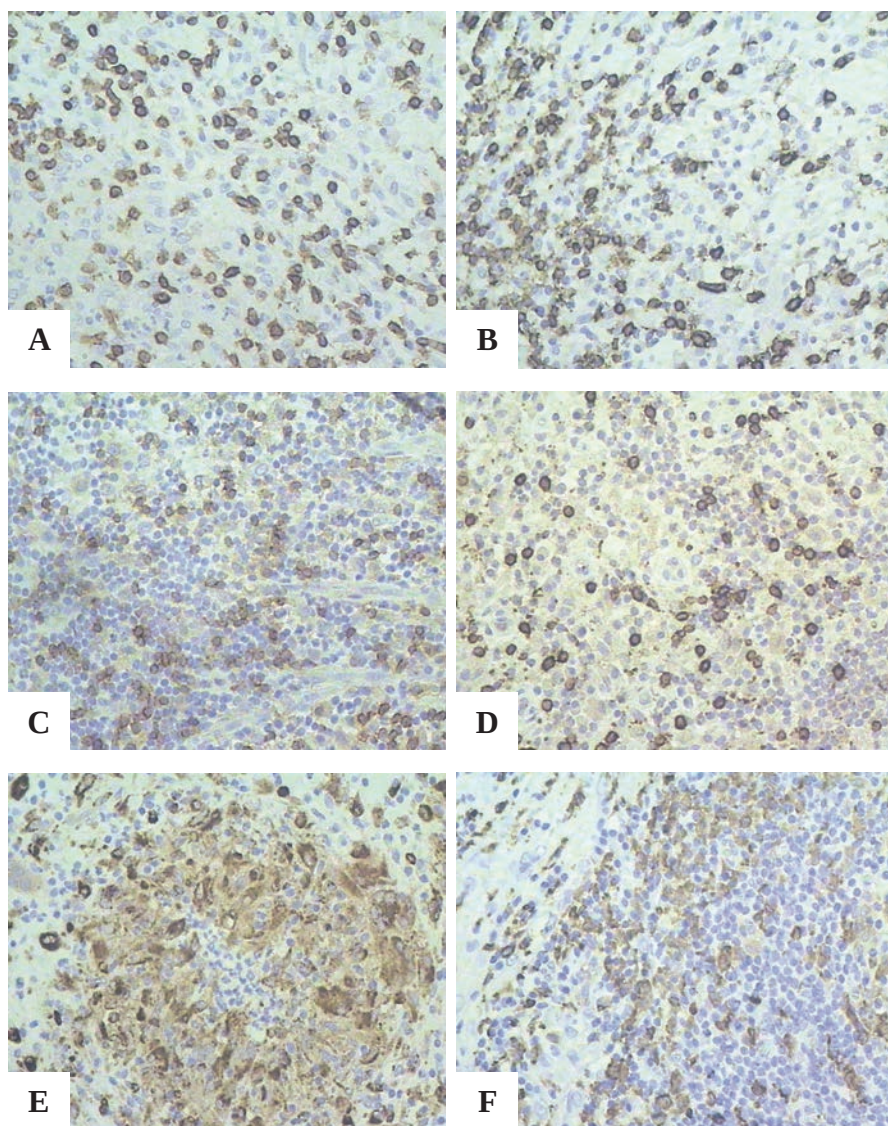


Рис. 3. (A) Диффузно расположенные в инфильтрате CD3-положительные лимфоциты. (B) CD20-положительные лимфоциты в инфильтрате. (C) CD4-положительные лимфоциты. (D) CD8-положительные лимфоциты. (E) CD68-положительные эпителиоидные гистиоциты, формирующие гранулему. (F) CD163-положительные макрофаги, диффузно расположенные среди клеток воспалительного инфильтрата. Иммунопероксидазная реакция, увеличение $\times 200$