

FORCIPE

2019, VOLUME 2, N 4

Scientific and practical journal for students and young scientists

Рецензируемый
научно-практический журнал
для студентов и молодых ученых

FORCIPE

Основан в 2018 году
в Санкт-Петербурге

ISSN 2658-4174

eISSN 2658-4182

Ежеквартальное издание

Журнал реферируется РЖ ВИНТИ

Учредители:

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования «Санкт-
Петербургский государственный педиатрический
медицинский университет»
Минздрава России,

Фонд НОИ «Здоровые дети — будущее
страны».

Журнал зарегистрирован Федеральной службой
по надзору в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций
(РОСКОМНАДЗОР),
ПИ № ФС77-74242 от 02 ноября 2018 г.

Проект-макет: Титова Л. А.

Распространяется по подписке.

Электронная версия — <http://elibrary.ru>

Издатель, учредитель:

ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России
Фонд НОИ «Здоровые дети — будущее
страны»

Титова Л.А. (выпускающий редактор)

Варламова И.Н. (верстка)

Адрес редакции: Литовская ул., 2,
Санкт-Петербург, 194100;
тел/факс: (812) 295-31-55;
e-mail: sovetsno.gpmu@gmail.com

Статьи просьба направлять по адресу:
sovetsno.gpmu@gmail.com

Address for correspondence:

2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100,
Russia. Tel/Fax: +7 (812) 295-31-55.
E-mail: sovetsno.gpmu@gmail.com.

Формат 60 × 90/8. Усл.-печ. л. 3,25.

Тираж до 500 экз. Цена свободная.

Оригинал-макет изготовлен

ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России.
Отпечатано ФГБОУ ВО СПбГПМУ Мин-
здрава России.

Литовская ул., 2, Санкт-Петербург, 194100.
Заказ 124. Подписано в печать 15.04.2019.

**Полное или частичное воспроизведение
материалов, содержащихся в настоящем
издании, допускается только с письмен-
ного разрешения редакции.**

**Ссылка на журнал «FORCIPE» обяза-
тельна.**

Редакционная коллегия: Editorial Board:

Главный редактор Head Editor

Д. м. н., профессор **Г.О. Багатурия** **G.O. Bagaturija**, Prof., MD, PhD

Ответственный секретарь Executive secretary

Л.Ю. Артюх **L.Yu. Artyukh**

Члены редколлегии Members of the Editorial Board

Д. м. н., профессор **Р.А. Насыров** **R.A. Nasirov**, Prof., MD, PhD

Д. п. н., профессор **В.В. Рязанов** **V.V. Ryazanov**, Prof., PhD

Д. м. н., профессор **Л.М. Краснов** **L.M. Krasnov**, Prof., MD, PhD

Д. м. н., профессор **А.В. Гостимский** **F.V. Gostimskiy**, Prof., MD, PhD

Д. м. н., профессор **Ю.А. Спесивцев** **Yu. A. Spesivtsev**, Prof., MD, PhD

Д. м. н., профессор **Н.Р. Карелина** **N.R. Karelina**, Prof., MD, PhD

Д. м. н., профессор **Т.Л. Пирцхалава** **T.L. Pirtsxalava**, Prof., MD, PhD

Д. м. н., профессор **В.В. Бржеский** **V.V. Brzhesky**, Prof., MD, PhD

Д. м. н., профессор **П.В. Павлов** **P.V. Pavlov**, Prof., MD, PhD

Д. м. н., профессор **Н.Д. Савенкова** **N.D. Savenkova**, Prof., MD, PhD

Д. м. н., профессор **Д.И. Василевский** **D.I. Vasilevsky**, Prof., MD, PhD

Д. м. н., проф. **С.В. Яйцев** (Челябинск) **S. V. Yajcev**, Prof., MD, PhD (Chelyabinsk)

Д. м. н., проф. **З.А. Афанасьева** (Казань) **Z. A. Afanasyeva**, Prof., MD, PhD (Kazan)

Д. м. н., профессор **А.И. Макаров**, **A. I. Makarov**, Prof., MD, PhD

(Архангельск) (Arkhangelsk)

Д. м. н., профессор **Zadnepryany V. I.**, Prof., MD, PhD

И.В. Заднипрный (Симферополь) (Simferopol)

Д. м. н., профессор **T.K. Kharatishvili**, Prof., MD, PhD

Т.К. Харатишвили (Москва) (Moscow)

2019, ТОМ 2, № 4

Научно-практический журнал для студентов и молодых ученых

CONTENT

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

М. Л. Оппедизано, А. М. Луничкин
Влияние индивидуального опыта поединков
на эффективность агонистического поведения
сверчков *Gryllus bimaculatus* с разными
биометрическими показателями 3

*Д. Е. Фисенко, Я. В. Козар, Р. М. Раджабов,
С. Н. Прошин, Р. И. Глушаков*
Опухолевая прогрессия глиобластомы C6 при
измененном тиреоидном статусе 9

ОБЗОРЫ

М. Д. Л. Оппедизано, И. О. Ищенко
Роль аутогенных дендритных клеток в терапии
диссеминированной меланомы кожи 15

И. О. Ищенко, М. Д. Л. Оппедизано
Совершенствование оценки противоопухолевого
иммунитета с использованием метода проточной
цитометрии 24

ИНФОРМАЦИЯ

Правила для авторов 34

ORIGINAL PAPERS

M. L. Oppedisano, A. M. Lunichkin
Influence of the individual experience of connections
on the effectiveness of the agonistic behavior of
Gryllus bimaculatus candles with different biometric
indices 3

*D. E. Fisenko, Y. V. Kozar, R. M. Radjabov, S.
N. Proshin, R. I. Glushakov*
The neoplastic proliferation of glioblastoma C6
provided by experimentally changed thyroid state 9

REVIEWS

M. L. D. Oppedisano, I. O. Ishchenko
The role of autologous dendritic cells in the treatment
of disseminated skin melanoma 15

I. O. Ishchenko, M. L. D. Oppedisano
Improvement of antitumoral immunity assessment
using the method of flow cytometry 24

INFORMATION

Rules for authors 34

ВЛИЯНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ОПЫТА ПОЕДИНКОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ АГОНИСТИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ СВЕРЧКОВ *GRYLLUS BIMACULATUS* С РАЗНЫМИ БИОМЕТРИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ

©Михаил Луиджиевич Оппедизано¹, Александр Михайлович Луничкин²

¹ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет. 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2

² Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН. 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореца, 44

Контактная информация: Михаил Луиджиевич Оппедизано — студент 2 курса, лечебный факультет. E-mail: misciaopp@gmail.com

РЕЗЮМЕ. Насекомые широко используются в современной прикладной и фундаментальной физиологии. Они обладают более простой биологической организацией, поведением и требованиями к культивированию по сравнению с позвоночными. Вместе с тем базовые принципы организации и жизнедеятельности этих групп животных во многом схожи. Это позволяет использовать насекомых в исследованиях, которые сложно или невозможно провести на позвоночных. Важным направлением физиологии является изучение механизмов агонистического поведения, обеспечивающего регуляцию территориального, полового, пищевого и социального поведения особей. В большинстве работ, посвященных изучению агонистического поведения сверчков, рассматривается влияние только одного фактора, влияющего на его успешность. Поскольку интерес представляет взаимосвязь факторов, определяющих успех особи в «столкновении» с представителем своего вида, в работе сделан упор на их комплексное влияние, в частности, в статье представлены результаты сравнения двух факторов: опыта предыдущих боёв и массы особи. Для данного исследования были выбраны представители семейства *Gryllus bimaculatus*, так как они обладают относительно небольшим числом хорошо изученных поведенческих реакций, развитой акустической коммуникацией, сравнительно легко содержатся и воспроизводятся в лабораторных условиях. Полученные данные свидетельствуют о том, что опыт предыдущих боёв способен компенсировать разницу в весе в поединке с более массивным неопытным противником, при этом временной интервал между боями не должен превышать 15 минут, а разница в весе — 25 %.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: агонистическое поведение, *Gryllus bimaculatus*, морфофизиологическая асимметрия.

INFLUENCE OF THE INDIVIDUAL EXPERIENCE OF CONNECTIONS ON THE EFFECTIVENESS OF THE AGONISTIC BEHAVIOR OF *GRYLLUS BIMACULATUS* CANDLES WITH DIFFERENT BIOMETRIC INDICES

©Mikhail L. Oppedisano¹, Aleksandr M. Lunichkin²

¹ Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 194100, Russia, Saint-Petersburg, Litovskaya str., 2

² I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry. 194223, Russia, Saint-Petersburg, Toreza ave., 44

Contact Information: Mikhail L. Oppedisano — 2-year student, medical faculty. E-mail: misciaopp@gmail.com

ABSTRACT. Insects are widely used in modern applied and fundamental physiology. They have a simpler biological organization, behavior and cultivation requirements compared to vertebrates. At the same time, the basic principles of the organization and functioning of these groups of animals are very similar. This allows the use of insects in studies that are difficult or impossible to conduct on vertebrates. An important direction of physiology is the study of the mechanisms of agonistic behavior, which ensures the regulation of the territorial, sexual, food and social behavior of individuals. In most works devoted to the study of agonistic behavior of crickets, the influence of only one factor influencing its success is considered. Since the relationship of the factors determining the success of an individual in a “collision” with a representative of their species is of interest, the emphasis is placed on their complex influence, in particular, the article presents the results of a comparison of two factors: the experience of previous battles and the mass of an individual. Representatives of the *Gryllus bimaculatus* family were selected for this study, since they have a relatively small number of well-studied behavioral reactions, developed acoustic communication, are easily contained and reproduced in laboratory conditions. The data obtained indicate that the experience of previous battles is able to compensate for the difference in weight in a duel with a more massive inexperienced opponent, while the time interval between fights should not exceed 15 minutes, and the difference in weight — 25%.

KEY WORDS: agonistic behavior, *Gryllus bimaculatus*, morpho-physiological asymmetry.

ВВЕДЕНИЕ

Агонистическое поведение представляет собой сложный комплекс агрессивных и защитных реакций, сопровождающих развитие конфликта между особями одного вида (рис. 1). Такая форма взаимодействия является неотъемлемой частью внутривидовой коммуникации, регулирующей территориальное, половое, пищевое и социальное поведение особей. Оно описано у всех представителей царства животных, в том числе и у человека. Несмотря на активное изучение агонистического поведения как в естественных, так и в лабораторных условиях, в том числе с привлечением этологических, биохимических и физиологических методов, в этой области остается много нерешенных вопросов. Один из таких вопросов заключается в следующем: какие факторы определяют успех особи в «столкновении» с представителем своего вида и как эти факторы взаимосвязаны друг с другом [6, 8, 12].

Удобным объектом для изучения агонистического поведения являются представители семейства сверчковые (*Grylloidea*), в частности, двупятнистый сверчок (*Gryllus bimaculatus*) (рис. 2). Этот вид является классическим объектом лабораторных исследований, обладает относительно небольшим числом хорошо изученных поведенческих реакций, развитой акустической коммуникацией, сравнительно лег-

ко содержится и воспроизводится в лабораторных условиях. Важно отметить, что в лабораторных условиях сохраняются все формы поведения (за исключением миграционного), характерные для природных популяций [2]. Интересно, что в странах Востока, например, в Китае, с древних времен сохранилась традиция публичных сверчковых поединков и культура содержания сверчков в неволе. Поэтому использование агонистического поведения именно сверчков может помочь приблизиться к пониманию механизмов, лежащих в основе агонистического поведения животных и человека.

Ранее было показано, что у сверчков на успех в агонистическом поведении оказывают влияние возраст и масса животного, общее состояние, присутствие самки и «обладание» укрытием (эффект резидента), история предыдущих столкновений (эффекты победителя и проигравшего). В большинстве работ, посвященных изучению агонистического поведения сверчковых, рассматривается влияние только одного фактора, влияющего на его успешность [4, 5, 14]. Так, было выявлено, что самцы с большей массой успешнее в поединках [13]. Было сделано предположение, что опыт победителя предыдущих боёв повышает шансы на победу.

Целью данного исследования было установить, может ли успешный опыт предыдущих боёв компенсировать разницу в весе в



Рис. 1. «Сражение» половозрелых самцов сверчка *G. bimaculatus*



Рис. 2. *Gryllus bimaculatus*



Рис. 3. Садки для содержания сверчков

поединке с более крупным противником. Для этого были поставлены следующие задачи:

- разработать протокол исследования;
- подготовить лабораторную культуру для проведения этологических экспериментов (определить наиболее показательный период онтогенетического развития самцов);
- изучить влияние разницы масс участников поединка на успех в агонистических отношениях сверчков, не обладающих опытом «сражения»;
- изучить, влияет ли полученный опыт победы на успех в последующих агонистических отношениях, и, если влияет, то как долго;
- изучить, влияет ли полученный опыт поражения на успех в последующих агонистических отношениях, и, если влияет, то как долго.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы 100 половозрелых самцов *G. bimaculatus*, не имеющих опыта «боев», из круглогодичной лабораторной культуры лаборатории «Сравнительной физиологии сенсорных систем». Для исключения получения опыта агонистических отношений, сверчки содержались по одному в сад-

ках размером $15 \times 11 \times 11$ см (рис. 3). В работе был использован метод «открытое поле». Все «бои» (рис. 4) проводились на арене размером 20×20 см и записывались для дальнейшего анализа при помощи видеокамеры Genius e-Face 2025, изображение с которой выводилось на компьютер в программе CrazyTalk CamSuite PRO (рис. 5). Для исключения субъективной интерпретации результатов агонистического поведения анализ видеофрагментов производился двумя исследователями.

Была применена следующая схема эксперимента (рис. 6): на первом этапе 2 сверчка равной массы (в пределах масс от 0.8 до 1 г, с разницей в массе не более 5%) помещались на квадратную арену в индивидуальных садках. После адаптации (спустя 15 минут) животные выпускались из садков и фиксировалось их агонистическое поведение. После определения «победителя» (пение сигнала «победы», преследование «проигравшего») и «проигравшего» (избегание «победителя») животные вновь изолировались. На втором этапе «победителю» и «проигравшему» предъявлялся сверчок большей массы (масса в пределах 1–1,2 г, отличие в массе более 5%), не имеющий опыт «сражения». Второй этап проводился с паузой в 15 и 60 минут после первого, с последовательным чередовани-

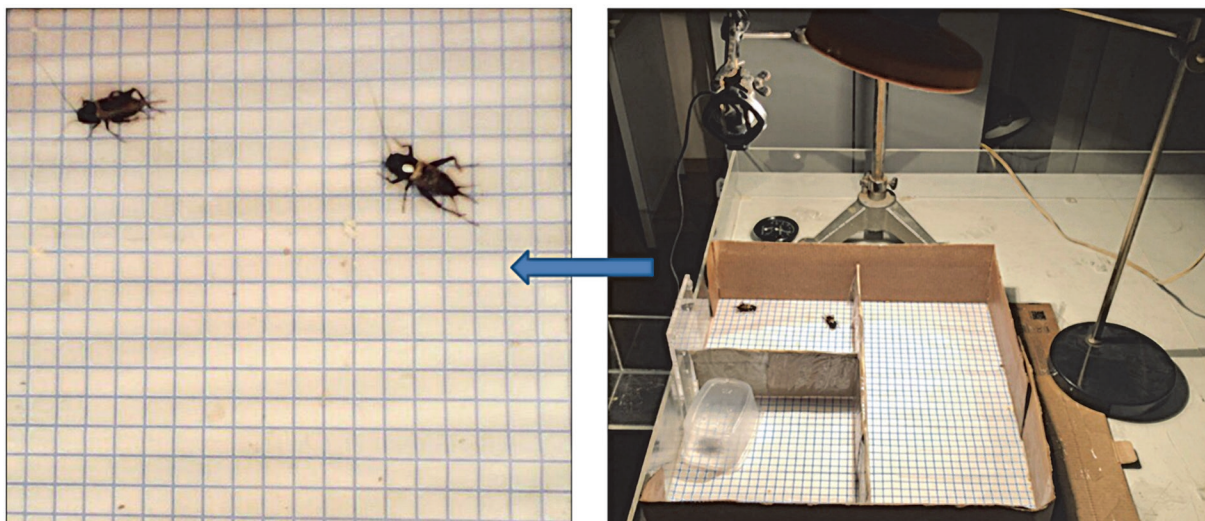


Рис. 4. Арена для проведения боёв

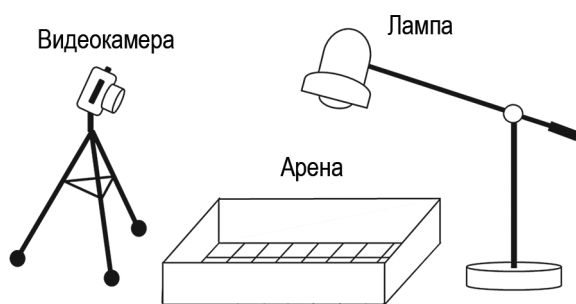


Рис. 5. Экспериментальная установка

ем «победителя» и «проигравшего» в каждом следующем опыте.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Задачей первого этапа исследования было убедиться в том, что выводы, сделанные Rillich в 2011 году (самцы с большей массой успешнее в поединках), корректны. Контрольный опыт, в

ходе которого изучалась агрессия неопытных сверчков различного веса (разница между особями превышала 5%), показал, что более тяжелый по весу самец побеждал в 90% случаев (общее количество боёв в ходе опыта — 10) (рис. 7).

На втором этапе исследовалось влияние опыта боя на агрессию. Было установлено, что самец, обладающий опытом победы, в 70% случаев побеждал более тяжелого противника (разница в весе между противниками превышала 5%) спустя 15 мин (проведено 10 поединков, достоверные отличия от контроля по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$), но всегда проигрывал спустя 60 мин (проведено 10 поединков, достоверных отличий от контроля нет, $p > 0,05$). Опытный самец побеждал неопытного в случае, если разница в их массе не превышала 25% (рис. 8).

Самец, который обладал опытом проигрыша, всегда проигрывал во втором бою вне зависимости от прошедшего времени (проведе-

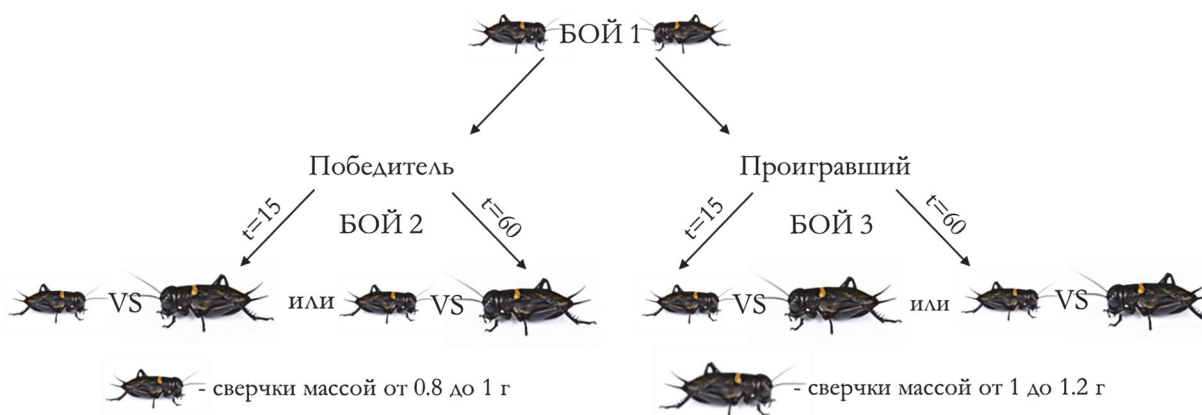


Рис. 6. Схема эксперимента

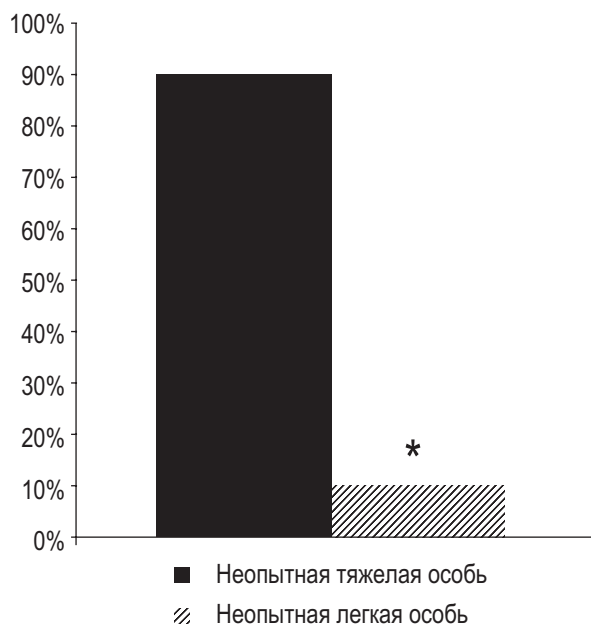


Рис. 7. Результаты агонистического взаимодействия неопытных особей разного веса (разница > 5 %) (контроль). По вертикали: количество побед (%) (n = 10).

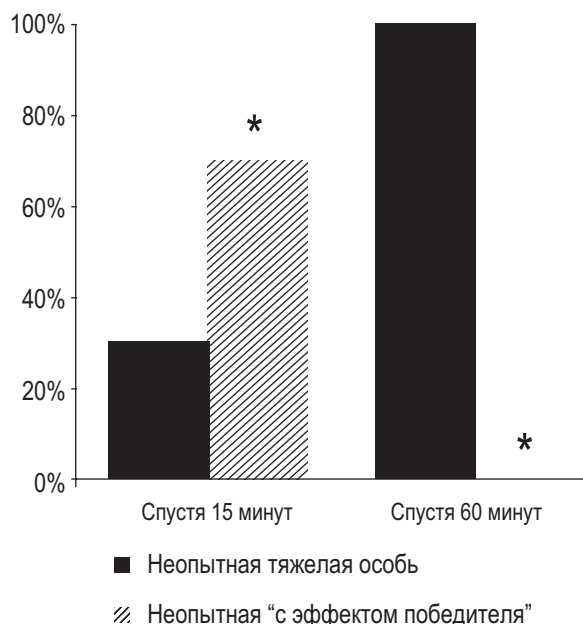


Рис. 8. Результаты агонистического взаимодействия сверчка с «эффектом победителя» и неопытного сверчка большей массы (разница > 5 %). По вертикали: количество побед (%) (n = 10).

но 10 поединков, достоверных отличий от контроля нет, $p > 0,05$) (рис. 9).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные свидетельствуют о том, что опыт предыдущих боёв способен компенсировать разницу в весе в поединке с более массивным неопытным противником, при этом временной интервал между боями не должен превышать 15 минут, а разница в весе — 25 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдукаева Н.С., Косенкова Н.С., Галеппо В.А. Медико-биологические аспекты агрессивного поведения пауков *Megalomorphae*. Педиатр. 2010; 1: 16–22.
2. Князев А.Н. Цикл развития сверчка *Gryllus bimaculatus* Deg. (Orthoptera, Gryllidae) в условиях лабораторного содержания. Энтомол. Обозр., 1985; LXIV(1): 58–73.
3. Мак-Фарленд Д. Поведение животных. Психобиология, этология и эволюция. М.: Мир; 1988.
4. Adamo S., Hoy R. Agonistic behaviour in male and female field crickets, *Gryllus bimaculatus*, and how behavioural context influences its expression. Anim. Behav., 1995; 49: 1491–1501.
5. Alexander R. Aggressiveness, Territoriality, and Sexual Behavior in Field Crickets (Orthoptera: Gryllidae). Behav., 1961; 17(2/3): 130–223.

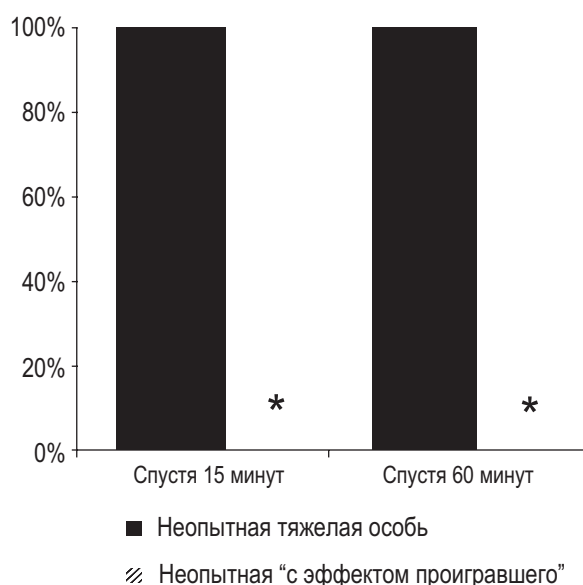


Рис. 9. Результаты агонистического взаимодействия сверчка с «эффектом проигравшего» и неопытного сверчка большей массы (разница > 5 %). По вертикали: количество побед (%) (n = 10)

6. Arnott G, Elwood RW. Assessment of fighting ability in animal contests. Anim. Behav. 2009; 77: 991–1004.
7. Beaugrand J., Zayan R., An experimental model of aggressive dominance in *Xiphophorus helleri* (Pisces, Poeciliidae). Behav. Process, 1985; 10: 1–52.
8. Briffa M., Lane S.M. The role of skill in animal contests: a neglected component of fighting ability. Proc. R. Soc. B. 2017; 284: 1596.

9. Iwasaki M, Delago A, Nishino H, Aonuma H. Effects of previous experience on the agonistic behaviour of male crickets, *Gryllus bimaculatus*. *Zool Sci.* 2006; 23: 863–72.
10. Khazraie K., Campan M. The role of prior agonistic experience in dominance relationships in male crickets *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae). *Behavioural Processes* 44; 1999: 341–348.
11. Maynard Smith, J., Price, G.R., 1973. The logic of animal conflict. *Nature.* 1973; 246: 15–8.
12. Pellis S.M. Agonistic versus amicable targets of attack and defense: consequences for the origin function and descriptive classification of play fighting. *Aggr. Behav.*, 1988; 14: 85–104.
13. Rillich J., Stevenson P.A. Winning fights induces hyperaggression via the action of the biogenic amine octopamine in crickets. *PLoS ONE* 2011.
14. Stevenson P., Schildberger K. Mechanisms of experience dependent control of aggression in crickets. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2013; 23: 318–23.
4. Adamo S., Hoy R. Agonistic behaviour in male and female field crickets, *Gryllus bimaculatus*, and how behavioural context influences its expression *Anim. Behav.*, 1995; 49: 1491–1501.
5. Alexander R. Aggressiveness, Territoriality, and Sexual Behavior in Field Crickets (Orthoptera: Gryllidae). *Behav.*, 1961; 17(2/3): 130–223.
6. Arnott G, Elwood RW. Assessment of fighting ability in animal contests. *Anim. Behav.* 2009; 77: 991–1004.
7. Beaugrand J., Zayan R., An experimental model of aggressive dominance in *Xiphophorus helleri* (Pisces, Poeciliidae). *Behav. Process.* 1985; 10: 1–52.
8. Briffa M., Lane S.M. The role of skill in animal contests: a neglected component of fighting ability. *Proc. R. Soc. B.* 2017; 284: 1596.
9. Iwasaki M, Delago A, Nishino H, Aonuma H. Effects of previous experience on the agonistic behaviour of male crickets, *Gryllus bimaculatus*. *Zool Sci.* 2006; 23: 863–72.
10. Khazraie K., Campan M. The role of prior agonistic experience in dominance relationships in male crickets *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae). *Behavioural Processes* 44; 1999: 341–348.
11. Maynard Smith, J., Price, G.R., 1973. The logic of animal conflict. *Nature.* 1973; 246: 15–8.
12. Pellis S.M. Agonistic versus amicable targets of attack and defense: consequences for the origin function and descriptive classification of play fighting. *Aggr. Behav.*, 1988; 14: 85–104.
13. Rillich J., Stevenson P.A. Winning fights induces hyperaggression via the action of the biogenic amine octopamine in crickets. *PLoS ONE* 2011.
14. Stevenson P., Schildberger K. Mechanisms of experience dependent control of aggression in crickets. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2013; 23: 318–23.

REFERENCES

1. Abdukayeva N.S., Kosenkova N.S., Galeppo V.A. Mediko-biologicheskiye aspekty agressivnogo povedeniya paukov Megalomorphae. [Biomedical aspects of the aggressive behavior of Megalomorphae spiders]. *Pediatr.* 2010; 1: 16–22. (In Russian).
2. Knyazev A.N. Tsikl razvitiya sverchka *Gryllus bimaculatus* Deg. (Orthoptera, Gryllidae) v usloviyakh laboratornogo soderzhaniya. [The cricket development cycle of *Gryllus bimaculatus* Deg. (Orthoptera, Gryllidae) in laboratory conditions]. *Entomol. Obozr.*, 1985; LXIV(1): 58–73. (In Russian).
3. Mak-Farlend D. Povedeniye zhivotnykh. Psikhobiologiya, etologiya i evolyutsiya. [Animal Behavior. Psychobiology, Ethology, and Evolution]. M.: Mir; 1988. (In Russian).

ОПУХОЛЕВАЯ ПРОГРЕССИЯ ГЛИОБЛАСТОМЫ C6 ПРИ ИЗМЕНЕННОМ ТИРЕОИДНОМ СТАТУСЕ

© Дмитрий Евгеньевич Фисенко¹, Ярослав Вячеславович Козар¹, Расул Мурадисович Раджабов¹, Сергей Николаевич Прошин¹, Руслан Иванович Глушаков²

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова. 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский проспект, 47.

²Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова. 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6.

Контактная информация: Дмитрий Евгеньевич Фисенко — студент 4 курса факультета общей медицины Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. E-MAIL: dmitfis@gmail.com.

РЕЗЮМЕ: цель работы заключается в исследовании влияния индуцированного медикаментозно гипотиреоза на продолжительность жизни лабораторных животных с предварительно перевитой глиобластомой. Исследование представляло собой две последовательные серии экспериментов, в которых участвовали 6 и 40 лабораторных мышей соответственно. Каждому из этих животных в боковой желудочек мозга перевивалась культура клеток глиобластомы C6. Лабораторные животные в рамках каждой серии подразделялись на две группы в зависимости от тиреоидного статуса: контрольная (эутиреоидная) группа и гипотиреоидная группа. В ходе экспериментов сравнивалась продолжительность жизни мышей контрольной и гипотиреоидной групп. По итогам данных установлена взаимосвязь тиреоидного статуса организма и уровня опухолевой прогрессии глиобластомы C6. В первой экспериментальной группе, состоявшей из 6 мышей, средняя продолжительность жизни в сутках составила $9,0 \pm 1,0$ дней для контрольной подгруппы, $19,0 \pm 2,0$ дней для подгруппы индуцированного гипотиреоза. Во второй экспериментальной группе, включавшей в себя 40 лабораторных животных, медиана выживаемости составила $8,9 \pm 0,6$ для эутиреоидной подгруппы, $18,7 \pm 1,7$ суток для подгруппы индуцированного гипотиреоза, в целом соответствуя результатам, полученным в ходе первого эксперимента. Из полученных результатов следует, что индуцированный гипотиреоз является фактором, снижающим скорость прогрессирования глиобластомы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тиреоидный статус, глиобластома, гипотиреоз, опухоли головного мозга.

THE NEOPLASTIC PROLIFERATION OF GLIOBLASTOMA C6 PROVIDED BY EXPERIMENTALLY CHANGED THYROID STATE

© Dmitry E. Fisenko¹, Yaroslav V. Kozar¹, Rasul M. Radjabov¹, Sergei N. Proshin¹, Ruslan I. Glushakov²

¹North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov 195067, Russia, St. Petesburg, Piskarevskii prospect 47

²S.M. Kirov Military Medical Academy 194044, Russia, St. Petesburg, Academician Lebedev st., 6

Contact Information: Dmitry E. Fisenko — 4th year student of the Faculty of General Medicine, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. E-mail: dmitfis@gmail.com.

ABSTRACT: The aim of the work lies in studying the effect of drug-induced hypothyroidism on the life expectancy of laboratory animals with previously transplanted glioblastoma. The study was two consecutive series of experiments in which 6 and 40 laboratory mice participated, respectively. The C6 glioblastoma cell culture was transplanted in the lateral ventricle of the brain

in each of these animals. Laboratory animals within each series were divided into two groups depending on thyroid status: control (euthyroid) group and hypothyroid group. During the experiments, the life expectancy of mice of the control and hypothyroid groups was compared. According to the data, the relationship between the thyroid status of the organism and the level of tumor progression of glioblastoma C6 was established. In the first experimental group consisting of 6 mice, the average life expectancy per day was 9.0 ± 1.0 days for the control subgroup, 19.0 ± 2 days for the hypothyroid subgroup. In the second experimental group, which included 40 laboratory animals, the median survival was 8.9 ± 0.6 for the euthyroid subgroup, 18.7 ± 1.7 days for the subgroup of induced hypothyroidism, generally consistent with the results obtained during the first experiment. Based on the results, it follows that induced hypothyroidism is a factor that reduces the rate of glioblastoma progression.

KEY WORDS: Thyroid state, glioblastoma, hypothyroidism, brain tumors.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Глиобластома — одна из самых частых и самых агрессивных форм опухолей головного мозга, характеризующаяся массивной и диффузной инфильтрацией в окружающие неповрежденные ткани мозга, интенсивным ангиогенезом и высоким показателем опухолевой гетерогенности. Около 17% всех внутримозговых опухолей и 54% всех глиом представлены глиобластомами [9]. Глиобластома быстро приводит к летальному исходу даже при интенсивном лечении, поскольку ее течение осложняется частыми рецидивами. Заболевание манифестирует, как правило, в возрасте от 60 до 80 лет, поэтому в последнее время ввиду старения населения регистрируется большее число случаев заболеваемости глиобластомой. На данный момент глиобластома является неизлечимым заболеванием, средняя продолжительность жизни больного — от 10 до 11 месяцев при стандартном лечении, которое включает в себя хирургические операции и химиотерапию. Кроме того, пятилетняя выживаемость больных, страдающих данным заболеванием, составляет не более, чем 3–5%. Глиобластома ассоциирована с такими факторами, как генетические мутации и воздействие ионизирующего излучения и, помимо этого, с тиреоидным статусом организма [8].

Гормоны щитовидной железы являются ключевыми регуляторами биохимических процессов в биологических системах. Осуществление биологических функций гормонами щитовидной железы во многом зависит от стимулов окружающей среды. На основании воздействия данных стимулов происходит регулирование уровня метаболизма и другие адаптивные изменения гомеостаза. Тиреоидные гормоны участвуют в процессах клеточной пролиферации, дифференцировки клеток и их созревания [2]. Точкой приложения яв-

ляются рецепторы к тиреоидным гормонам четырех типов. Тип экспрессируемого клеткой рецептора зависит от органоспецифичности и стадии клеточного цикла, в которой клетка пребывает в данный момент [1]. Гормоны щитовидной железы являются эссенциальными факторами в процессах роста и развития нервной ткани, осуществлении адекватного энергетического обеспечения центральной и периферической нервной системы. Согласно недавним исследованиям, было установлено, что гормоны щитовидной железы приводят к увеличению экспрессии на поверхности клеток интегрина $\alpha v \beta 3$, в результате взаимодействия с которым происходит индукция пролиферации опухолевых клеток, ангиогенеза, а также увеличение инвазивности опухолевой ткани и метастазирование, что существенно усугубляет течение заболевания [3, 6]. Блокирование данных эффектов тиреоидных гормонов посредством введения больных глиобластомой в гипотиреоз может значительно улучшить качество жизни пациентов, поскольку приводит к торможению опухолевой прогрессии, а, следовательно, и ослаблению эффектов, вызываемых опухолью [5].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить влияние медикаментозно измененного тиреоидного статуса на продолжительность жизни лабораторных животных с перивитой глиобластомой.

МЕТОДИКА

Лабораторные животные.

В эксперименте использовались самки и самцы беспородных мышей весом 180–220 грамм и возрастом 40 ± 10 дней. Мыши имели свободный доступ к воде и пище, содержались

в стандартных условиях вивария (температура 20–22°C, двенадцатичасовой цикл темного и светлого времени суток). Экспериментальные действия выполнялись согласно этическим принципам обращения с лабораторными животными и одобрены Локальным этическим комитетом. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех мышей составляла не менее 10–14 дней. В течение карантина проводили осмотр каждого животного (поведение и общее состояние) дважды в день: в утренние и вечерние часы. Лабораторные животные с подозрением на любое заболевание и/или имеющие изменения в поведении исключались из исследования в течение карантина. После окончания карантина лабораторные животные были рандомизированно распределены на 2 равные экспериментальные группы, контрольную и гипотиреоидную.

Модель глиобластомы С6.

Модель глиобластомы воспроизводилась с использованием клеток мышиной глиобластомы линии С6, полученных от мышей, которые длительно подвергались воздействию канцерогена. Для накопления материала клетки интравентрикулярно трансплантировались 8–9 мышам, не включенным в исследование. Инокуляцию разведенного в физиологическом растворе ликвора проводили на каждом из 46 лабораторных животных.

Модель гипотиреоза

На мышах, в результате рандомизированного отбора попавших в гипотиреоидную группу, в ходе данного эксперимента была воспроизведена модель индуцированного медикаментозного гипотиреоза, а оставшиеся животные служили контрольной подгруппой для сравнения. Модель гипотиреоза была получена путём добавления пропилтиоурацила мышам в воду для питья в расчетах по 2 мг на 100 г массы тела животного 1 раз в сутки. Для индукции гипотиреоза из наиболее распространённых тиреостатиков был выбран именно пропилтиоурацил в связи с его фармакодинамическими свойствами: дополнительное ингибирование дейодиназы в периферических тканях и высокий профиль безопасности.

Стереотаксис

Стереотаксические операции осуществлялись под неингаляционной анестезией (пропофол 2% в/в). Метамизол (2мг/мл) добавлялся в воду для питья для аналгезии за 3 дня до и 3 дня после проведения стереотаксической операции. Трансплантация опухоли проводилась через трепанационное отверстие в височной кости на расстоянии 2–3 мм



Рис. 1. Выполнение трансплантации клеток глиобластомы животному.

от сагиттального шва и 2 мм каудальнее венозного шва. Кожа животных обрабатывалась спиртом и затем йодом. Отверстие проделывалось зубоветеринарным бором. Мыши подвергались инокуляции не менее 1×10^7 клеток опухоли, содержащихся в 0,5 мл разведенного в физиологическом растворе ликвора. Шприцом на глубину 3–4 мм в головной мозг, достигая дна правого бокового желудочка, вводились опухолевые клетки.

Оценка продолжительности жизни

День трансплантации опухоли принимался за нулевой, а день, предшествующий дню смерти, считался последним днем жизни. Аутопсия производилась в первые 12 часов после смерти животного. Статистический анализ полученных данных осуществлялся посредством персонального компьютера с помощью таких программ, как Excel, GraphPadPrism 7. Для сравнения продолжительности жизни мышей использовались средние величины со стандартной статистической ошибкой. Статистический анализ кривых выживаемости производился с вовлечением критерия Лилие-фольда, а построение кривых производилось методом Каплана-Мейера. Стандартная ошибка выживаемости подсчитывалась по формуле Гринвуда. Данные признавались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По итогам данных, полученных в ходе 2 серий экспериментов, установлена взаимосвязь тиреоидного статуса организма и уровня опухолевой прогрессии глиобластомы С6. Продолжительность жизни перевитых лабораторных животных в зависимости от уровня тиреоидных гормонов представлена в таблицах 1 и 2 для первой и второй серии экспериментов соответственно.

В первой экспериментальной группе, состоявшей из 6 мышей, средняя продолжительность жизни в сутках составила $9,0 \pm 1,0$ дней для контрольной группы, $19,0 \pm 2,0$ дней для группы индуцированного гипотиреоза. Во второй экспериментальной группе, включавшей в себя 40 лабораторных животных, медиана выживаемости составила $8,9 \pm 0,6$ для контрольной группы, $18,7 \pm 1,7$ суток для группы индуцированного гипотиреоза, в целом соответствуя результатам, полученным в ходе первого эксперимента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Культура клеток глиобластомы С6, использованная в исследовании, привела к развитию глиобластомы у всех лабораторных животных

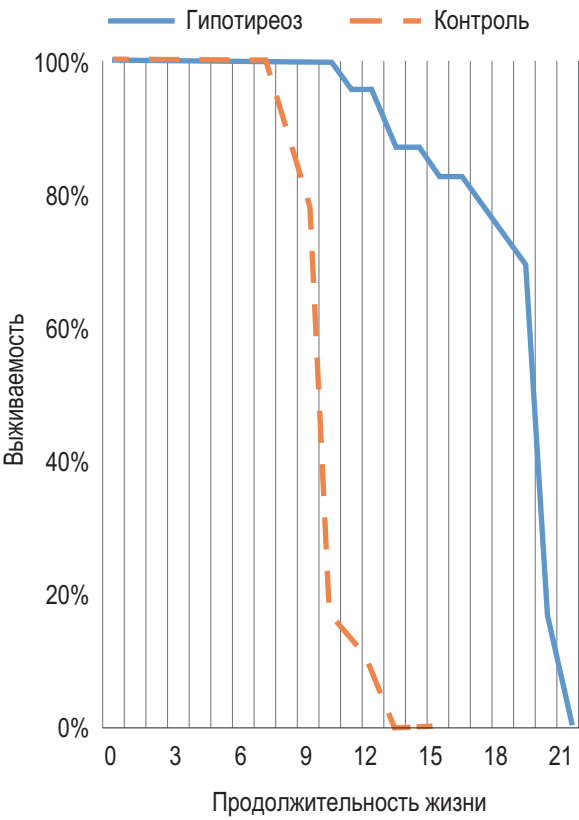


Рис. 2. Кривые выживаемости лабораторных животных гипотиреоидной и контрольной подгрупп.

Таблица 1

Влияние тиреоидного статуса на продолжительность жизни мышей с перевитой глиобластомой С6

Подгруппа	Продолжительность жизни лабораторных животных							
	Мин (сут)	Количество живых особей в группах по дням эксперимента, сутки						Макс. (сут)
		8	9	10	17	18	21	
Контрольная подгруппа	8	3	2	1	0	0	0	10
Подгруппа гипотиреоза	18	3	3	3	3	2	1	21

Таблица 2

Продолжительность жизни лабораторных мышей с различным тиреоидным статусом в рамках второй серии экспериментов

Подгруппа	Продолжительность жизни лабораторных животных											
	Мин (сут)	Количество живых особей в группах по дням эксперимента (абсолютная)										Макс (сут)
		7	8	9	10	13	15	17	19	20	21	
Контрольная подгруппа	7	20	18	16	3	0	0	0	0	0	0	10
Подгруппа гипотиреоза	14	20	20	20	20	20	19	18	17	4	1	21

(46/46), что регистрировалось по результатам аутопсии и значимой потере животных в массе тела. Данный факт наглядно демонстрирует высокую биологическую агрессивность использованной линии глиобластомы. И статистические расчеты, и экспериментальные наблюдения наглядно демонстрируют значимость влияния медикаментозно индуцированного пропилтиоурацилом гипотиреоза на продолжительность жизни лабораторных животных с глиобластомой.

Согласно результатам исследований, полученных на других моделях опухолей, гипотиреоидные состояния уменьшают агрессивность опухолевой ткани, инвазивность опухолей и ангиогенез в опухолевом очаге. Существует несколько взглядов на природу данного явления: одни авторы полагают, что такие эффекты тиреоидных гормонов, как стимуляция пролиферации опухолевых клеток, ангиогенез, миграция и метастазирование реализуются через интегрин $\alpha v \beta 3$, также повышающий экспрессию на поверхности клеточной мембраны третьего типа человеческой салидазы (NEU3). С NEU3 и её влиянием на ряд клеточных структур связано увеличение радиорезистентности опухолевой ткани и повышение эффективности систем репарации в очаге [7, 10]. Некоторые исследователи полагают, что тиреоидные гормоны влияют на опухолевый процесс через стимуляцию синтеза аквапорина 4, который, как предполагается, может выполнять роль потенциального канала для распространения опухолевых клеток [4].

Как бы то ни было, но достоверным по результатам нашего исследования является наличие прямой корреляционной связи между уровнем тиреоидных гормонов в организме лабораторного животного и степенью агрессивности глиобластомы С6.

ВЫВОДЫ

1. Уровень тиреоидных гормонов определяет прогрессирование глиобластомы и степень выраженности клинических проявлений, существенно влияет на продолжительность жизни лабораторных животных.
2. Индуцированный гипотиреоз приводит к достоверному увеличению медианы выживаемости среди лабораторных мышей с перевитой глиобластомой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колотов К.А., Машковцев О.В., Бейн Б.Н. Иммуногистохимические особенности глиальных опухолей

головного мозга. Медицинский альманах. 2012; 4: 66–9.

2. Усова Н.Н. Йодсодержащие тиреоидные гормоны и их влияние на нервную систему. Медицинские новости. 2012; 4: 11–5.
3. Beer A.J., Schwaiger M. PET imaging of $\alpha v \beta 3$ expression in cancer patients. *Methods Mol Biol.* 2011; 680: 183–200.
4. Costa L.E.S., Clementino-Neto J., Mendes C.B., Franzone N.H., Costa E.O., Moura-Neto V., Ximenes-da-Silva A. Evidence of aquaporin 4 regulation by thyroid hormone during mouse brain development and in cultured human glioblastoma multiforme cells. *Frontiers in Neuroscience.* 2019; 3(317): 125–32.
5. Faghih-Jouybari M., Naderi S., Mashayekhi S., Padeganeh T. Hypothyroidism among patients with glioblastoma multiforme. *Iranian J Neurology.* 2018; 17(3): 149–51.
6. Gaertner F.C., Schwaiger M., Beer A.J. Molecular imaging of $\alpha v \beta 3$ expression in cancer patients. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2010; 54(3): 309–26.
7. Gerard M., Corroyer-Dulmont A., Lesueur P., Collet S. Hypoxia Imaging and Adaptive Radiotherapy: A State-of-the-Art Approach in the Management of Glioma. *Frontiers in Neuroscience.* 2019; 12(6):117–23.
8. Hellevik A.I., Asvold B.O., Bjørø T., Romundstad P.R., Nilsen T.I., Vatten L.J. Thyroid function and cancer risk: a prospective population study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(2): 570–74.
9. Omuro A., DeAngelis L.M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA.* 2013; 310(17): 1842–50.
10. Takahashi K., Proshin S., Yamaguchi K., Yamashita Y., Katakura R., Yamamoto K., Shima H., Hosono M., Miyagi T. Sialidase NEU3 defines invasive potential of human glioblastoma cells by regulating calpain-mediated proteolysis of focal adhesion proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — General Subjects.* 2017; 1861(11, pt A): 2778–88. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.07.023.

REFERENCES

1. Kolotov K.A., Mashkovtsev O.V., Bein B.N. Immunohistochemical features of glial brain tumors [Immunohistochemical nuances of brain glial tumors]. *Meditsynskii al'manakh.* 2012; 4: 66–9. (In Russian).
2. Usova N.N. Iod-containing thyroid hormones and their influence on nervous system. *Meditsynskie novosti.* 2012; 4: 11–5. (In Russian).
3. Beer A.J., Schwaiger M. PET imaging of $\alpha v \beta 3$ expression in cancer patients. *Methods Mol Biol.* 2011; 680: 183–200.
4. Costa L.E.S., Clementino-Neto J., Mendes C.B., Franzone N.H., Costa E.O., Moura-Neto V., Ximenes-da-

- Silva A. Evidence of aquaporin 4 regulation by thyroid hormone during mouse brain development and in cultured human glioblastoma multiforme cells. *Frontiers in Neuroscience*. 2019; 3(317): 125–32.
5. Faghih-Jouybari M., Naderi S., Mashayekhi S., Pade-ganeh T. Hypothyroidism among patients with glioblastoma multiforme. *Iranian J Neurology*. 2018; 17(3): 149–51.
 6. Gaertner F.C., Schwaiger M., Beer A.J. Molecular imaging of avb3 expression in cancer patients. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2010; 54(3): 309–26.
 7. Gerard M., Corroyer-Dulmont A., Lesueur P., Collet S. Hypoxia Imaging and Adaptive Radiotherapy: A State-of-the-Art Approach in the Management of Glioma. *Frontiers in Neuroscience*. 2019; 12(6): 117–23.
 8. Hellevik A.I., Asvold B.O., Bjørø T., Romundstad P.R., Nilsen T.I., Vatten L.J. Thyroid function and cancer risk: a prospective population study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18(2): 570–74.
 9. Omuro A., DeAngelis L.M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA*. 2013; 310(17): 1842–50.
 10. Takahashi K., Proshin S., Yamaguchi K., Yamashita Y., Katakura R., Yamamoto K., Shima H., Hosono M., Miyagi T. Sialidase NEU3 defines invasive potential of human glioblastoma cells by regulating calpain-mediated proteolysis of focal adhesion proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — General Subjects*. 2017; 1861(11, pt A): 2778–88. DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.07.023.

УДК 616.5-006.81-08-092.6+615.277.3+615.37+612.017.12+575.113.12+577.21+611.018.834+576.385.5

РОЛЬ АУТОГЕННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК В ТЕРАПИИ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ

© Михаил Джузеппе Луиджиевич Оппедизано, Илья Олегович Ищенко

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет. 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2

Контактная информация: Михаил Луиджиевич Оппедизано — студент 2-го курса лечебного факультета. E-mail: misciaopp@gmail.com

РЕЗЮМЕ: Разработка эффективных методов терапии диссеминированной меланомы на сегодняшний день весьма актуальна в связи с доказанной высокой иммуногенностью этого вида опухолей. В качестве одного из современных методов лечения данного заболевания применяется активная специфическая иммунотерапия с использованием дендритных клеток. В данной работе уделено внимание истории исследования и биологии дендритных клеток, принципам создания дендритноклеточной вакцины, возможностям её клинического применения в лечении, роли иммунной системы в элиминации опухолевых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дендритные клетки, диссеминированная меланома, противоопухолевый ответ, иммунотерапия.

THE ROLE OF AUTOLOGOUS DENDRITIC CELLS IN THE TREATMENT OF DISSEMINATED SKIN MELANOMA

© Mikhail L.D. Oppedisano, Ilia O. Ishchenko

Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 194100, Russia, Saint-Petersburg, Litovskaya str., 2

Contact Information: Mikhail L.D. Oppedisano — 2-year student, medical faculty. E-mail: misciaopp@gmail.com

ABSTRACT: The development of effective therapies for disseminated melanoma is extremely relevant today due to the proven high immunological potency of this type of tumor. As one of the modern methods of treating this disease active specific immunotherapy using dendritic cells is used. In this paper attention is paid to the history of research and biology of dendritic cells, the principles of creating a dendritic cell vaccine, the possibilities of its clinical use in treatment, the role of the immune system in the elimination of tumor cells.

KEY WORDS: dendritic cells, disseminated melanoma, antitumor response, immunotherapy.

ВВЕДЕНИЕ

Лечение злокачественных опухолей является одной из наиболее острых проблем, стоящих перед современным обществом. Абсолютно эффективные методы терапии не разработаны, увеличение средней продолжительности жизни пациентов с истощенными воз-

можностями на несколько недель или месяцев считается важным достижением. Большие надежды в настоящее время возлагаются на иммунотерапию с использованием дендритных клеток. Преимущества данного подхода достаточно очевидны: при минимальных побочных явлениях оказывается высокоспецифическое противоопухолевое воздействие,

при этом положительный эффект сохраняется и после прекращения иммунотерапии. Первое упоминание о дендритных клетках относится к 1868 г., когда П. Лангерганс обнаружил в поверхностных слоях кожи человека белые отростчатые эпидермоциты, впоследствии названные его именем [7]. Позднее, в 1973 г. Р. Штейнман выделил из селезенки мыши особый тип клеток, которые из-за наличия ветвистых отростков назвали дендритными [17]. Он предположил, что дендритные клетки участвуют в развитии и поддержании адаптивного иммунного ответа. Результаты первых экспериментов были встречены со скептицизмом, однако последующие исследования Р. Штейнмана и других ученых подтвердили первоначальную гипотезу. Спустя многие годы данное открытие получило признание, когда 3 октября 2011 г. автор совместно с Ж. Хоффманном и Б. Бётлером были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине за «открытие дендритных клеток и их роли в адаптивном иммунитете» [28].

Учёными было установлено, что дендритные клетки являются истинными антиген-представляющими клетками [4]. Их главная функция — инициация и регуляция как первичного, так и вторичного Т- и В-клеточного иммунного ответа [1, 3, 26, 36]. Именно это уникальное свойство побудило многих исследователей к созданию различных предклинических моделей иммунотерапии рака дендритными клетками. В настоящее время в мире проводится более 300 клинических испытаний по использованию вакцин на основе стволовых и дендритных клеток для лечения онкологических заболеваний, из которых 232 в США и только 3 в России (согласно данным U.S.National Institutes of Health) (табл. 1).

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ

Изучить морфофункциональную характеристику дендритных клеток, их участие в противоопухолевом иммунном ответе с целью определения возможности использования для лечения больных диссеминированной меланомой.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

По происхождению дендритные клетки делятся на миелоидные и плазматоидные. Миелоидные и макрофаги имеют общего

костномозгового предшественника, несущего на своей поверхности маркер CD34. Более зрелые предшественники тканевых дендритных клеток, присутствующие в крови, также имеют морфологию моноцитов, но молекулы CD34 на их мембране отсутствуют. Эти клетки несут на своей поверхности маркеры миелоидной дифференцировки: CD11c, CD13, CD14, CD33. После выхода из кровотока в барьерных органах (кожа, печень, лёгкие) и слизистых оболочках из данных клеток могут формироваться дендритные клетки и макрофаги. Клетки Лангерганса, присутствующие в эпидермисе и эпителии слизистых, в отличие от интерстициальных дендроцитов, образуются из CD14-негативных моноцитов.

Плазматоидные дендритные клетки также происходят от CD34-позитивного предшественника, однако по своим морфологическим признакам и мембранному фенотипу они существенно отличаются от миелоидных дендроцитов. Их родительские клетки, присутствующие в крови, внешне похожи на плазматические, но их фенотип уникален: CD11c⁺, CD123⁺, CD45RA⁺, HLA-DR⁺ (рис. 1), [36].

УЧАСТИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК В ПРОТИВООПУХОЛЕВОМ ИММУНИТЕТЕ

По степени дифференцировки дендритные клетки делятся на следующие виды: зрелые, незрелые и предшественники. Главная функция незрелых дендритных клеток состоит в захвате чужеродного антигена, его процессинге и транспортировке во вторичные лимфоидные органы, где запускается 1-й этап специфического иммунного ответа. После контакта с антигеном в присутствии дополнительных костимуляторных сигналов дендритные клетки активируются и созревают. Процессинг заключается в эндосомальной деградации чужеродного антигена до пептидных фрагментов, которые после образования комплекса с молекулами МНС II класса доставляются на поверхность дендритных клеток для последующей активации наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов. В контексте молекулы МНС I класса ДК представляют эндогенно синтезированные пептиды, эти комплексы могут активировать наивные CD8⁺ Т-лимфоциты. Для эффективной реализации противоопухолевого иммунного ответа дендритная клетка должна активировать обе субпопуляции Т-лимфоцитов (CD4⁺ и CD8⁺). После активации эффекторных клеток последние

Таблица. 1

Иммуноterapia опухолей с помощью ДК в клинических испытаниях

Тип опухоли	Фаза	Кол-во пациен-тов	Вакцина	Путь введения	Результат
Опухоль поджелудочной железы и желчных протоков	I/II	12	ДК + пептиды MUC-1; ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-16	в/к — п/к	↑экспрессии перфорина и гранзима CD8+ Т-лимфоцитами; ↑средней выживаемости до 26 мес. (8/12) и более 7 лет (4/12) [12]
Метастатическая меланома	I/II	16	ДК + пептид MART-126-35	в/к	Частичный ответ (2/16); полный ответ (2/16) [15]
Глиобластома	I	21	ДК + PEP-3-KLN	в/к	Средняя продолжительность жизни — 1,8 года [14]
Немелкоклеточный рак лёгкого	III	103	ДК + лимфоциты; ИЛ-2	п/к	Двухлетняя общая выживаемость до 93.4%; пятилетняя общая выживаемость до 81.4% [4]
Рак толстого кишечника	I	16	ДК + мРНК СЕА (5/16) или пептид САР-1 (11/16); ПГЕ2, ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6	в/к — в/в	СЕА-специфические Т-клетки (8/11, пептидная группа; 0/5, РНК-группа); ↑уровня СЕА в крови (7/11, пептидная группа; 2/5, РНК-группа); средняя выживаемость без прогрессии 18 мес. (пептидная группа) и 26 мес. (РНК-группа) [8]
Рак предстательной железы	II	12	ДК + PSCA, PSA	п/к	Стабилизация заболевания (6/16) [20]
Гепатоцеллюлярная карцинома	I/II	5	ДК + гибридный белок; ПГЕ2, ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6, ИФН-γ, ОК432	п/к	Опухольспецифический Т-клеточный ответ (5/5); стабилизация заболевания (1/5) [19]
Колоректальный рак	I	10	ДК + пептид СЕА	в/в	Полный ответ (1/10); минимальный ответ (1/10); стабилизация заболевания (2/10) [11]
Рак почки	II	18	ДК + аутологичный опухолевые лизаты	в/к	Полный ответ (3/18); частичный ответ (6/18); стабилизация заболевания (5/18) [16]
Миелоидный лейкоз	I	4	ДК + апоптотические лейкозные клетки; KLN, ОК432	в/к	Антилейкозный CD8+ Т-клеточный ответ (2/4); ↓количества лейкозных клеток в костном мозге в 2.1 раза (¼) [5]
Т-клеточный лейкоз	I	3	ДК + tax-пептиды LLFGYPVYV или SFHSLHLLY; ФНО-α, KLN, ОК432	п/к	Tax-специфический ЦТЛ-ответ на 16–20 нед. (3/3); полный ответ (1/3); частичный ответ (1/3); стабилизация заболевания (1/3) [18]
Лимфоцитарный лейкоз	I	15	ДК + аутологичные апоптотические В-клетки; ФНО-α	в/к	Антилейкозный CD8+ Т-клеточный ответ (10/15) [13]
Саркома	I/II	30	ДК + HLA-A2	п/к	Пятилетняя общая выживаемость — 81.4% [10]
Рак яичников	I/II	11	ДК + пептиды hTERT 988Y, Her2/neu 369VV2V9, Her2/neu 68, PADRE; Klebsiella pneumoniae, ИФН-γ	в/к	Рецидив заболевания в течение вакцинации (2/11); рецидив заболевания после вакцинации (3/11); отсутствие признаков заболевания в течение >36 мес. (6/11); 36-месячная общая выживаемость — 90% [2]
Множественная миелома	II	27	ДК (APC8020, Mylovenge™)	в/в	Общая выживаемость — 5,3 года; 3,4 года в контрольной группе [6]
Опухоль печени	I	67	ДК + опухолевый лизат аутологичных и аллогенных опухолевых клеток; ФНО-α	в/л	Полный ответ (0/67); частичный ответ (5/67); стабилизация заболевания (29/67) [9]

Примечание: в/в — внутривенный путь; п/к — подкожный путь; в/к — внутрикожный путь; в/л — внутрь лимфоузлов.

устремляются в опухоль, где осуществляют лизис раковых клеток посредством секреции перфорина и гранзима В (рис. 2) [3, 23, 26, 30, 35].

ТЕХНОЛОГИЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДЕНДРИТНОКЛЕТОЧНОЙ ВАКЦИНЫ

Технология приготовления дендритноклеточной вакцины включает в себя несколько этапов (рис. 3) [23, 31]:

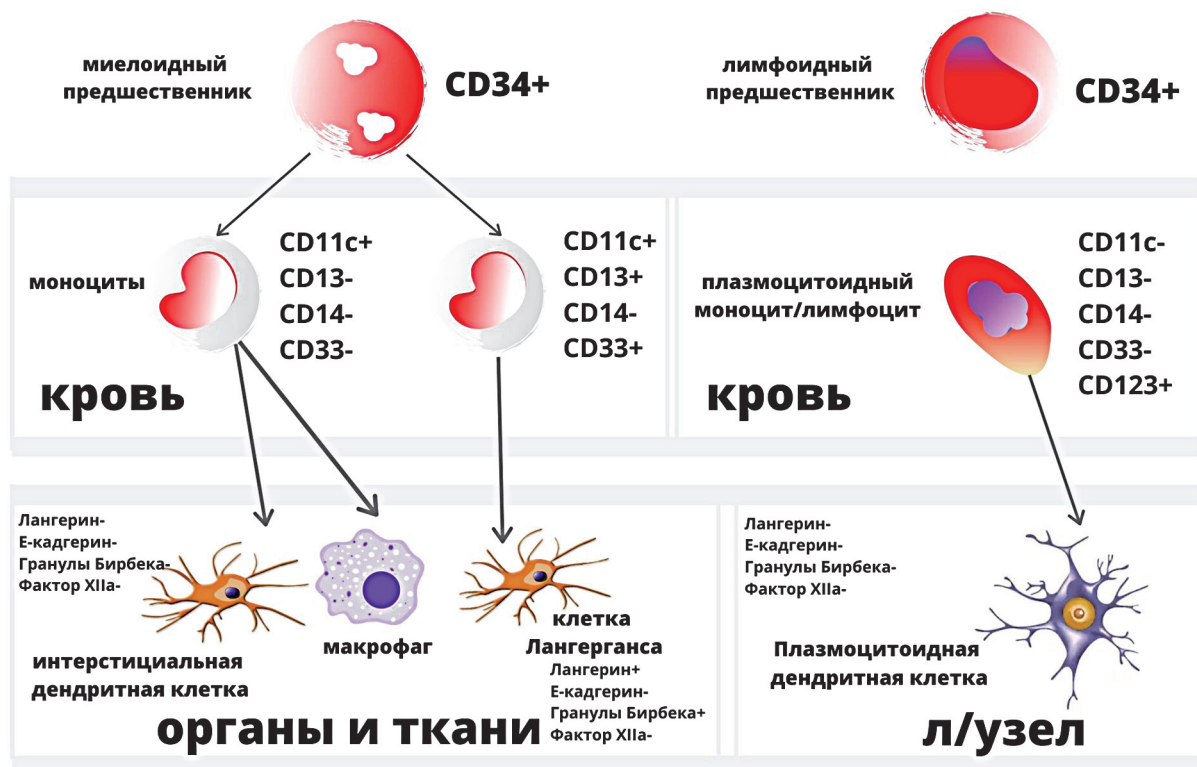
- выделение незрелых дендритных клеток из мононуклеаров периферической крови (МНК) донора или пациента;
- забор образца опухоли у больного или в криобанке и получение из неё кратковременной культуры клеток;
- разрушение культуральных клеток и приготовление из них РТА¹ содержащего опухолевого лизата;
- нагрузка и активация незрелых дендритных клеток лизатом РТА¹;
- вакцинация пациента.

Дендритные клетки получают из периферической крови с использованием стандартной процедуры [32]. Вначале из крови пациента или донора с помощью центрифугирования выделяют МНК. Затем полученные моноциты

высаживают на подложку флакона. В качестве ростовой среды используют среду CellGroDC. Моноциты обладают высоким дифференцировочным потенциалом [37], поэтому для формирования дендритных клеток используются ростовые факторы и факторы дифференцировки GM-CSF и IL-4. На 3-й и 5-й день культивирования добавляют свежую порцию GM-CSF и IL-4.

В это время производится забор образца опухоли у больного или в криобанке для получения из неё кратковременной культуры клеток. Клеточные линии, экспрессирующие РТА¹ (т.е. содержащие раково-тестикулярные антигены NY-ESO, MAGE, HAGE, GAGE и др.), смешивают в равных пропорциях и проводят 6 последовательных циклов моментального замораживания/оттаивания в фосфатно-солевом буфере, центрифугируют и фильтруют надосадочную фракцию — РТА¹ содержащий опухолевый лизат [32].

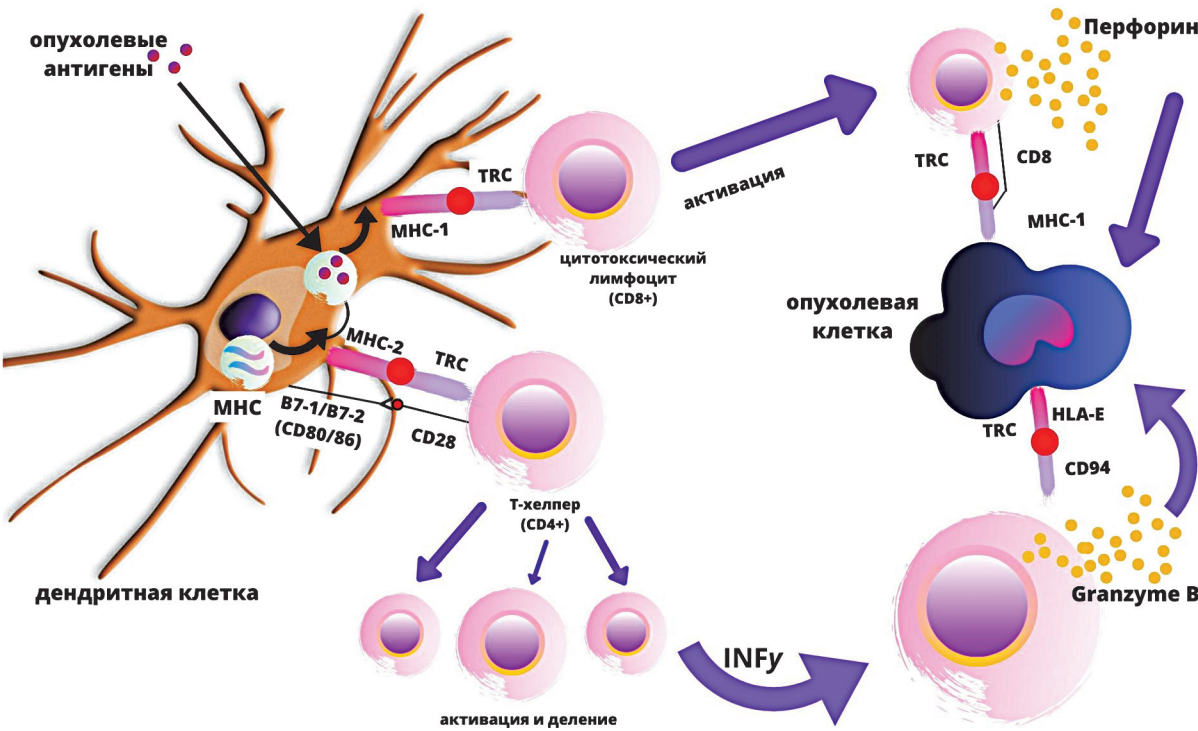
На 7-й день культивирования во флакон добавляют ростовые факторы и факторы дифференцировки GM-CSF, IL-4 и TNF- α , а также в качестве антигенной нагрузки добавляют лизат из расчета 3 клетки культуры на 1 дендритную клетку [23,25,30]. Для реализации противоопухолевого ответа зрелые активиро-



*Шмагель К.В., Черешнев В.А. «Клетки врождённого иммунитета» — М.: ГОУ ВПО ПГМА им. ак. Е.А.Вагнера, 2011.

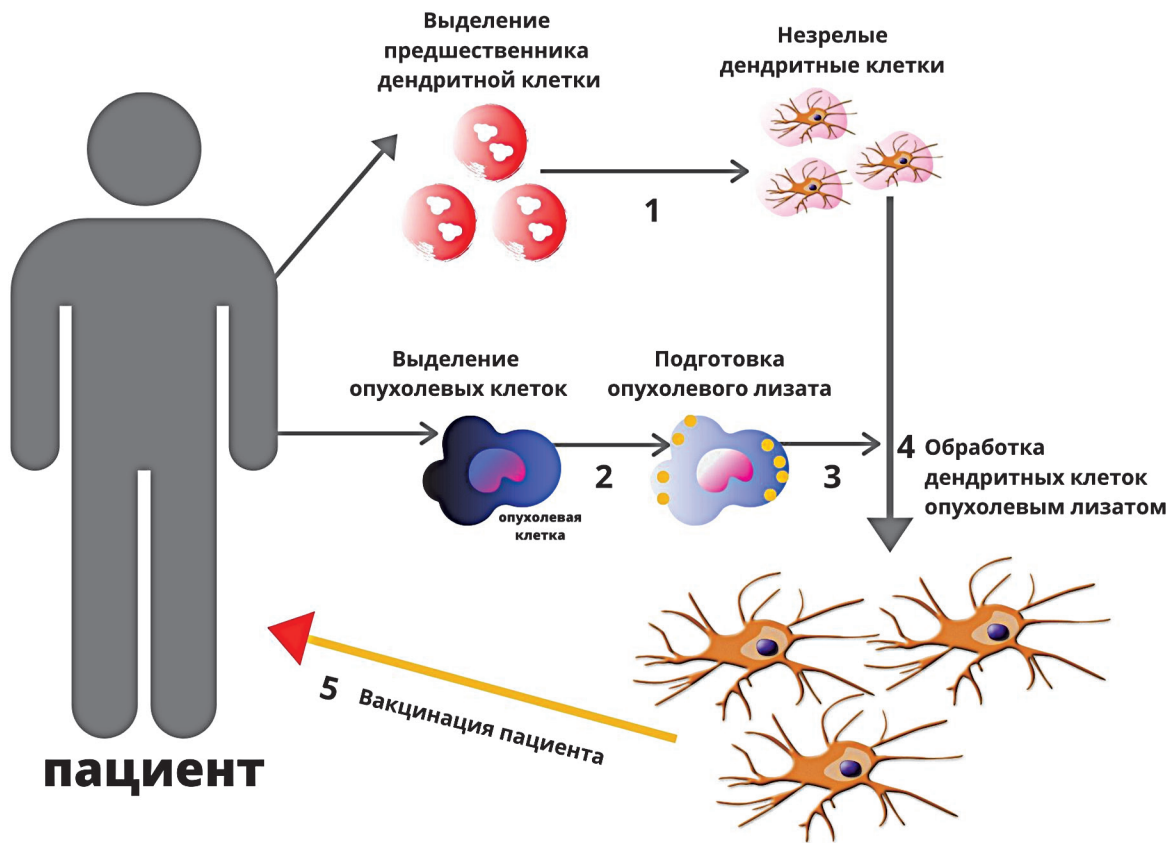
** аним.изображ.: Артюх Л.Ю. Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет.

Рис. 1. Пути образования ДК [36]



*Шевцов М.А., Хачатрян В.А., Галибин О.В., Маргулис Б.А. Иммуноterapia дендритными клетками в клинической онкологии //Современная онкология. – 2012. – No 4. – С. 56-64;
** аним.изображ.: Артюх Л.Ю. Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет.

Рис. 2. Участие ДК в противораковом иммунном ответе [35]



*аним.изображ.: Артюх Л.Ю. Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет.

Рис. 3. Схема приготовления ДК вакцины

ванные дендритные клетки должны достичь Т-клеточной зоны вторичного лимфоидного органа. В проведенных к настоящему времени клинических исследованиях применялись различные способы введения вакцин, среди них: внутрикожный, подкожный, внутривенный и в лимфатический узел [23,25,30,31].

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМЫ ДЕНДРИТОКЛЕТОЧНОЙ ВАКЦИНОЙ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

Диссеминированная меланома — это вид ракового заболевания кожных покровов, берущий свое начало из перерожденных меланоцитов. Её лечение остается одной из наиболее сложных и актуальных проблем современной онкологии, так как эту опухоль характеризует агрессивное течение и, как следствие, высокие показатели смертности. По данным отечественных и зарубежных авторов, медиана продолжительности жизни этой категории пациентов при положительном ответе на классическое лекарственное лечение (лишь 23 %) колеблется от 4 до 9 мес, а 5-летняя выживаемость не превышает 5 % [27, 33, 34]. В случае отсутствия эффекта от стандартного лечения прибегают к использованию дендритно-клеточной иммунотерапии.

Данные, опубликованные НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова (г. Санкт-Петербург), свидетельствуют о том, что у больных диссеминированной меланомой активная специфическая иммунотерапия на основе аутологичных дендритных клеток в сочетании с ФДТ и низкими дозами циклофосфида представляется действенным методом лечения и оказывает клинически значимый противоопухолевый эффект. В частности, клинический эффект у больных с исчерпанными возможностями достигает 37 %, частичный регресс наблюдается в 7,4 % случаев. Медиана общей выживаемости составляет 8,4 месяца. Помимо этого, иммунотерапия ДК-ФДТ безопасна и хорошо переносится больными. Побочные эффекты, наблюдаемые у пациентов, незначительны и могут быть охарактеризованы как нежелательные явления I или II степени [22].

ВЫВОД

Как показывают результаты экспериментальных и клинических исследований, использование дендритных клеток в иммунотерапии

диссеминированной меланомы является перспективным методом лечения. Мы убеждены, что дендритные клетки, нагруженные антигеном, не станут терапией повсеместного выбора, но в скором будущем займут своё место в арсенале противоопухолевых средств.

БЛАГОДАРНОСТИ:

Авторы выражают признательность сотрудникам отдела онкоиммунологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова за предоставленную информацию о возможности использования дендритных клеток в лечении диссеминированной меланомы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Banchereau J., and Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392: 245–52.
2. Chu C.S., Boyer J., Schullery D.S., Gimotty P.A., Gamerman V., Bender J., Levine B.L., Coukos G., Rubin S.C., Morgan M.A., et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012; 61: 629–41.
3. Janeway Ch. *Immunobiology 5E: The immune system in health and disease*. Garland Publishing. 2001: 307–9.
4. Kimura H., Matsui Y., Ishikawa A., Nakajima T., Yoshino M., Sakairi Y. *Cancer Immunol. Immunother.* 2015; 64: 51–9.
5. Kitawaki T., Kadowaki N., Fukunaga K., Kasai Y., Maekawa T., Ohmori K., Itoh T., Shimizu A., Kuzushima K., Kondo T., et al. *Exp. Hematol.* 2011; 39: 424–33.
6. Lacy M.Q., Mandrekar S., Dispenzieri A. et al. Idiotypic-pulsed antigen presenting cells following autologous transplantation for multiple myeloma may be associated with prolonged survival. *Am J Hematol.* 2009; 84(12): 799–802.
7. Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch.* 1868; 44: 325–37.
8. Lesterhuis W.J., De Vries I.J., Schreiber G., Schuurhuis D.H., Aarntzen E.H., De Boer A., Scharenborg N.M., Van De Rakt M., Hesselink E.J., Figdor C.G., et al. *Anticancer Res.* 2010; 30: 5091–8.
9. Li Q.Y., Shi Y., Huang D.H., Yang T., Wang J.H., Yan G.H., Wang H.Y., Tang X.J., Xiao C.Y., Zhang W.J., et al. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8: 5601–10.
10. Mackall C.L., Rhee E.H., Read E.J. et al. A pilot study of consolidative immunotherapy in patients with high-risk pediatric sarcomas. *Clin Cancer Res* 2008; 14(15): 4850–8.
11. Marshall J.L., Hoyer R.J., Toomey M.A. et al. Phase I study in advanced cancer patients of a diversified prime-and-boost vaccination protocol using recombinant vaccinia virus and recombinant nonreplicating avipox virus to elicit anti-carcinoembryonic antigen immune responses. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3964–73.

12. Mayanagi S., Kitago M., Sakurai T., Matsuda T., Fujita T., Higuchi H., Taguchi J., Takeuchi H., Itano O., Aiura K., et al. *Cancer Sci.* 2015; 106: 397–406.
13. Palma M., Hansson L., Choudhury A., Näsman-Glaser B., Eriksson I., Adamson L., Rossmann E., Widén K., Horváth R., Kokhaei P., et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012; 61: 865–79.
14. Phuphanich S., Wheeler C.J., Rudnick J.D., Mazer M., Wang H., Nuño M.A., Richardson J.E., Fan X., Ji J., Chu R.M., et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012; 62: 125–35.
15. Ribas A., Comin-Anduix B., Chmielowski B et al. Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15(19): 6267–76.
16. Schwaab T., Schwarzer A., Wolf B. et al. Clinical and immunologic effects of intranodal autologous tumor lysate-dendritic cell vaccine with Aldesleukin (Interleukin 2) and IFN- α 2a therapy in metastatic renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4986–92.
17. Steinman R., Cohn Z. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice I. morphology, quantitation, tissue distribution - IV. Identification and distribution in mouse spleen. *Journal of experimental medicine.* 1973–1975: 137–41.
18. Suehiro Y., Hasegawa A., Iino T., Sasada A., Watanabe N., Matsuoka M., Takamori A., Tanosaki R., Utsunomiya A., Choi I., et al. *Br. J. Haematol.* 2015; 169: 356–67.
19. Tada F., Abe M., Hirooka M., Ikeda Y., Hiasa Y., Lee Y., Jung N.C., Lee W.B., Lee H.S., Bae Y.S., et al. *Int. J. Oncol.* 2012; 41: 1601–9.
20. Thomas-Kaskel AK, Zeiser R, Jochim R et al. Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival. *Int J Cancer* 2006; 119: 2428–34.
21. Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Данилова А.Б., Данилов А.О., Нехаева Т.Л., Георгиев Г.П., Гнузев Н.В., Ларин С.С., Киселёв С.Л. Клеточные технологии в терапии злокачественных опухолей. *Росс. иммун. журнал.* 2008; 2(11), 2–3: 303–4.
22. Балдуева И.А., Новик А.В., Гельфонд М.Л., Нехаева Т.Л., Проценко С.А., Данилова А.Б., Пипиа Н.П., Семенова А.И., Емельянова Н.В., Кориненко М.В., Данилова Т.А., Латипова Д.Х., Галиуллина О.А., Телетаева Г.М., Анохина Е.М., Котова З.С., Авдонкина Н.А., Беляев А.М. Дендритно-клеточная иммунотерапия в сочетании с фотодинамической терапией и циклофосфамидом у больных диссеминированной меланомой кожи, резистентных к стандартным методам лечения. *Онкология, гематология и радиология.* 2017.
23. Барышников А.Ю. Дендритные противоопухолевые вакцины. *Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН.* 2001.
24. Быков В.Л. Частная гистология человека. М.: СОТИС; 2007.
25. Водолажский Д.И., Меньшенина А.П., Двандненко К.В., Новикова И.А., Златник Е.Ю., Бахтин А.В., Моисеенко Т.И., Селютин О.Н., Франциянц Е.М. Опыт конструирования дендритно-клеточной вакцины для лечения рака шейки матки. *Fundamental research.* 2015; 1: 716.
26. Гантиевская Ю.А., Селявко В.В. Дендритные клетки: роль в системе иммунитета. *Имунопатология, аллергология, инфектология.* 2001; 4: 5–23.
27. Егоров Г.Н., Горбунова В.А., Манзюк Л.В., Переводчикова Н.И., Бородин А.Г., Харкевич Г.Ю. Роль аранозы в лечении диссеминированной меланомы. *Клиническая онкология.* 2004; 4: 41–5.
28. Лян Н.А. Ральф Мартин Штейнман. *Аллергология и иммунология в педиатрии.* 2012.
29. Марков О.В., Миронова Н.Л., Власов В.В., Зенкова М.А. Противоопухолевые вакцины на основе дендритных клеток: от экспериментов на животных моделях до клинических испытаний. *Acta Naturae.* 2017; 3: 29.
30. Михайлова И.Н., Петенко Н.Н., Демидов Л.В. Вакциноterapia меланомы дендритными клетками. *Российский биотерапевтический журнал.* 2007; 3: 8–18.
31. Нехаева Т.Л. Оптимизация технологии и стандартизация получения противоопухолевых вакцин на основе аутологичных дендритных клеток. Автореф. дис... канд. мед. наук. 2014.
32. Нехаева Т.Л., Балдуева И.А., Новик А.В., Данилова А.Б., Данилов А.О., Комаров Ю.И., Воробейчиков Е.В., Пономаренко В.М., Вааль А.И. Оптимизация технологии и стандартизация получения противоопухолевых вакцин на основе аутологичных дендритных клеток (ДК). *Российский иммунологический журнал.* 2013; 7(16); 2–3: 345.
33. Самойленко И.В., Демидов Л.В. Пембролизумаб в лечении метастатической меланомы. *Медицинский совет.* 2017; 2(11); 6: 8.
34. Селиванова Н.В., Кудрявцева Г.Т. Комплексное лечение больной с диссеминированной меланомой кожи. *Сибирский онкологический журнал.* 2010; 6: 74.
35. Шевцов М.А., Хачатрян В.А., Галибин О.В., Маргулис Б.А. Иммунотерапия дендритными клетками в клинической онкологии. *Современная онкология.* 2012; 4: 56–64.
36. Шмагель К.В., Черешнев В.А. Клетки врожденного иммунитета. М.: ГОУ ВПО ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера. 2011.

REFERENCES:

1. Banchereau J., and Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392: 245–52.
2. Chu C.S., Boyer J., Schullery D.S., Gimotty P.A., Gamerman V., Bender J., Levine B.L., Coukos G., Ru-

- bin S.C., Morgan M.A., et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012; 61: 629–41.
3. Janeway Ch. *Immunobiology 5E: The immune system in health and disease*. Garland Publishing. 2001: 307–9.
 4. Kimura H., Matsui Y., Ishikawa A., Nakajima T., Yoshino M., Sakairi Y. *Cancer Immunol. Immunother.* 2015; 64: 51–9.
 5. Kitawaki T., Kadowaki N., Fukunaga K., Kasai Y., Maekawa T., Ohmori K., Itoh T., Shimizu A., Kuzushima K., Kondo T., et al. *Exp. Hematol.* 2011; 39: 424–33.
 6. Lacy M.Q., Mandrekas S., Dispenzieri A. et al. Idiotype-pulsed antigen presenting cells following autologous transplantation for multiple myeloma may be associated with prolonged survival. *Am J Hematol.* 2009; 84(12): 799–802.
 7. Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch.* 1868; 44: 325–37.
 8. Lesterhuis W.J., De Vries I.J., Schreiber G., Schuurhuis D.H., Aarntzen E.H., De Boer A., Scharenborg N.M., Van De Rakt M., Hesselink E.J., Figdor C.G., et al. *Anticancer Res.* 2010; 30: 5091–8.
 9. Li Q.Y., Shi Y., Huang D.H., Yang T., Wang J.H., Yan G.H., Wang H.Y., Tang X.J., Xiao C.Y., Zhang W.J., et al. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8: 5601–10.
 10. Mackall C.L., Rhee E.H., Read E.J. et al. A pilot study of consolidative immunotherapy in patients with high-risk pediatric sarcomas. *Clin Cancer Res* 2008; 14(15): 4850–8.
 11. Marshall J.L., Hoyer R.J., Toomey M.A. et al. Phase I study in advanced cancer patients of a diversified prime-and-boost vaccination protocol using recombinant vaccinia virus and recombinant nonreplicating avipox virus to elicit anti-carcinoembryonic antigen immune responses. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3964–73.
 12. Mayanagi S., Kitago M., Sakurai T., Matsuda T., Fujita T., Higuchi H., Taguchi J., Takeuchi H., Itano O., Aiura K., et al. *Cancer Sci.* 2015; 106: 397–406.
 13. Palma M., Hansson L., Choudhury A., Näsman-Glaser B., Eriksson I., Adamson L., Rossmann E., Widén K., Horváth R., Kokhaei P., et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012; 61: 865–79.
 14. Phuphanich S., Wheeler C.J., Rudnick J.D., Mazer M., Wang H., Nuño M.A., Richardson J.E., Fan X., Ji J., Chu R.M., et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012; 62: 125–35.
 15. Ribas A., Comin-Anduix B., Chmielowski B. et al. Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15(19): 6267–76.
 16. Schwaab T., Schwarzer A., Wolf B. et al. Clinical and immunologic effects of intranodal autologous tumor lysate-dendritic cell vaccine with Aldesleukin (Interleukin 2) and IFN- α 2a therapy in metastatic renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4986–92.
 17. Steinman R., Cohn Z. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice I. morphology, quantitation, tissue distribution - IV. Identification and distribution in mouse spleen. *Journal of experimental medicine.* 1973–1975: 137–41.
 18. Suehiro Y., Hasegawa A., Iino T., Sasada A., Watanabe N., Matsuoka M., Takamori A., Tanosaki R., Utsunomiya A., Choi I., et al. *Br. J. Haematol.* 2015; 169: 356–67.
 19. Tada F., Abe M., Hirooka M., Ikeda Y., Hiasa Y., Lee Y., Jung N.C., Lee W.B., Lee H.S., Bae Y.S., et al. *Int. J. Oncol.* 2012; 41: 1601–9.
 20. Thomas-Kaskel AK, Zeiser R, Jochim R et al. Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival. *Int J Cancer* 2006; 119: 2428–34.
 21. Balduvaya I.A., Moiseenko V.M., Danilova A.B., Danilov A.O., Nekhaeva T.L., Georgiev G.P., Gnuchev N.V., Larin S.S., Kisel'ev S.L. Kletochnye tekhnologii v terapii zlokachestvennykh opuholei. [Cellular technologies in the treatment of malignant tumors]. *Ross. immun. zhurnal.* 2008; 2(11), 2–3: 303–4. (In Russian).
 22. Balduvaya I.A., Novik A.V., Gel'fond M.L., Nekhaeva T.L., Prochenko S.A., Danilova A.B., Pipia N.P., Semenova A.I., Emel'yanova N.V., Korinenko M.V., Danilova T.A., Latipova D.H., Galiullina O.A., Teletaeva G.M., Anohina E.M., Kotova Z.S., Avdonkina N.A., Belyaev A.M. Dendritno-kletochnaya immunoterapiya v sochetanii s fotodinamicheskoj terapijei i ciklofosfamidom u bol'nyh disseminirovannoï melanomoi kozhi, rezistentnyh k standartnym metodam lecheniya. [Dendritic cell immunotherapy in combination with photodynamic therapy and cyclophosphamide in patients with disseminated skin melanoma who are resistant to standard methods of treatment]. *Onkologiya, gematologiya i radiologiya.* 2017. (In Russian).
 23. Baryshnikov A.YU. Dendritnye protivopuholevyje vakciny. [Dendritic antitumor vaccines]. *Vestnik RONC im. N.N. Blohina RAMN.* 2001. (In Russian).
 24. Bykov V.L. Chastnaya gistologiya cheloveka. [Private histology of man]. M.: SOTIS; 2007. (In Russian).
 25. Vodolazhskii D.I., Men'shenina A.P., Dvadenko K.V., Novikova I.A., Zlatnik E.YU., Bahtin A.V., Moiseenko T.I., Selyutina O.N., Franciyanc E.M. Opyt konstruirovaniya dendritno-kletochnoj vakciny dlya lecheniya raka shejki matki. [Experience in constructing a dendritic cell vaccine for the treatment of cervical cancer]. *Fundamental research.* 2015; 1: 716. (In Russian).
 26. Gantievskaya YU.A., Selyavko V.V. Dendritnye kletki: rol' v sisteme immuniteta. [Dendritic cells: role in the immune system]. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya.* 2001; 4: 5–23. (In Russian).
 27. Egorov G.N., Gorbunova V.A., Manzyuk L.V., Perevodchikova N.I., Borodkina A.G., Harkevich G.YU. Rol' aranozy v lechenii disseminirovannoj

- melanomy. [The role of aranose in the treatment of disseminated melanoma]. *Klinicheskaya onkologiya*. 2004; 4: 41–5. (In Russian).
28. Lyan N.A., Ral'f Martin SHtejnman. Allergologiya i immunologiya v pediatrii. [Allergology and immunology in pediatrics]. 2012. (In Russian).
29. Markov O.V., Mironova N.L., Vlasov V.V., Zenkova M.A. Protivoopuholevyje vadciny na osnove dendritnyh kletok: ot eksperimentov na zhivotnyh modelyah do klinichskih ispytanij. [Dendritic cell-based antitumor vaccines: from animal model experiments to clinical trials]. *Acta Naturae*. 2017; 3: 29. (In Russian).
30. Mihajlova I.N., Petenko N.N., Demidov L.V. Vakcino-terapiya melanomy dendritnymi kletkami. [Vaccine therapy for melanoma with dendritic cells]. *Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal*. 2007; 3: 8–18. (In Russian).
31. Nekhaeva T.L. Optimizaciya tekhnologii i standartizaciya polucheniya protivopuholevyh vadcin na osnove autologichnyh dendritnyh kletok. [Optimization of technology and standardization of the production of antitumor vaccines based on autologous dendritic cells]. Avtoref. dis... kand. med. nauk. 2014. (In Russian).
32. Nekhaeva T.L., Baldueva I.A., Novik A.V., Danilova A.B., Danilov A.O., Komarov YU.I., Vorobeichikov E.V., Ponomarenko V.M., Vaal' A.I. Optimizaciya tekhnologii i standartizaciya polucheniya protivopuholevyh vadcin na osnove autologichnyh dendritnyh kletok (DK). [Optimization of technology and standardization of obtaining antitumor vaccines based on autologous dendritic cells (DC)]. *Rossiiskij immunologicheskij zhurnal*. 2013; 7(16); 2–3: 345. (In Russian).
33. Samojlenko I.V., Demidov L.V. Pembrolizumab v lechenii metastaticheskoy melanomy. [Pembrolizumab in the treatment of metastatic melanoma]. *Medicinskij sovet*. 2017; 2(11); 6: 8. (In Russian).
34. Selivanova N.V., Kudryavceva G.T. Kompleksnoe lechenie bol'noj s disseminirovannoj melanomoy kozhi. [Comprehensive treatment of a patient with disseminated melanoma of the skin]. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal*. 2010; 6: 74. (In Russian).
35. Shevcov M.A., Hachtryan V.A., Galibin O.V., Margulis B.A. Immunoterapiya dendritnymi kletkami v klinicheskoy onkologii. [Immunotherapy with dendritic cells in clinical oncology]. *Sovremennaya onkologiya*. 2012; 4: 56–64. (In Russian).
36. SHmagel' K.V., Chereshev V.A. Kletki vrozhdynnogo immuniteta. [The cells of innate immunity]. M.: GOU VPO PGMA im. ak. E.A. Vagnera. 2011. (In Russian).

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ОЦЕНКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

© *Илья Олегович Ищенко, Михаил Джузеппе Луиджиевич Оппедизано*

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2

Контактная информация: Илья Олегович Ищенко — студент 2-го курса, лечебный факультет. E-mail: ilyshaishchenko.2000@gmail.com

РЕЗЮМЕ. Применение проточной цитометрии в лабораторных исследованиях на сегодняшний день весьма актуально в связи с высокой точностью измерения физиологических внутриклеточных параметров и скоростью получения данных для каждой конкретной клетки. Данный метод анализа является универсальным для использования как в онкоиммунологии, так и в других смежных областях исследования клеточных образцов и характеристик их отдельных структур. В работе уделено внимание принципам оценки физико-химических параметров клеток, истории создания, а также возможностям клинического применения проточной цитофлуориметрии в определении иммунного статуса онкологических больных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: проточная цитометрия, иммунный статус, проточный анализатор, иммунодиагностика, онкоиммунология, моноклональные антитела, флуорохромы.

IMPROVEMENT OF ANTITUMINAL IMMUNITY ASSESSMENT USING THE METHOD OF FLOW CYTOMETRY

© *Ilya O. Ishchenko, Mikhail D.L. Oppedisano*

Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 194100, Russia, Saint-Petersburg, Litovskaya str., 2

Contact Information: Ilya O. Ishchenko — 2-year student, medical faculty. E-mail: ilyshaishchenko.2000@gmail.com

ABSTRACT. The use of flow cytometry in laboratory research today is very important due to the high accuracy of measuring physiological intracellular parameters and the speed of obtaining data for each specific cell. This analysis method is universal for use both in oncological immunology and in other related fields of study of cell samples and the characteristics of their individual structures. The work focuses on the principles of assessing the physicochemical parameters of cells, the history of creation, as well as the possibilities of the clinical use of flow cytofluorimetry in determining the immune status of cancer patients.

KEY WORDS: flow cytometry, immunological status, immunodiagnosis, oncoimmunology, monoclonal antibodies, fluorochromes.

ВВЕДЕНИЕ

Проточная цитометрия (цитофлуориметрия) — это современная технология быстрого измерения физических и химических параметров клеток, органелл и происходящих в

них процессов [2, 5]. Разработка и внедрение в лабораторную практику данного метода позволили проводить исследования метаболизма каждой клетки в отдельности от всей клеточной субпопуляции с высокой точностью, относительной простотой и в сжатые сроки.

На сегодняшний день имеющиеся на рынке проточные цитометры сделали возможными анализы со скоростью до 100 000 событий в секунду, регистрируя при этом до 10^6 – 10^8 клеток в образце. Такие возможности у метода появились не сразу [2, 4, 5]. Первое упоминание о проточных цитофлюометрах относится к 1934 году, когда была опубликована статья с упоминанием полуавтоматического проточного оптического счетчика клеток. Позднее, в 1965 году, был создан волюметрический проточный сортер, позволивший разделять клеточные структуры по размеру. Спустя четыре года получил патент первый коммерческий флуоресцентный проточный анализатор, определявший не только размеры клеток, но и концентрацию внутриклеточных органелл за счёт флуоресценции и светорассеяния. Пик развития метода был достигнут только спустя полвека, когда стали разрабатываться анализаторы с потенциальными возможностями детекции до 50 параметров [1]. Благодаря достигнутому данный метод помимо изначально запланированного определения количества клеток позволил проводить также исследования их функционального состояния [2, 3, 4, 5, 6]. Другим преимуществом цитофлюориметрии является её универсальность, позволяющая исследовать форменные элементы периферической крови человека, диссоциированные клетки любых тканей, бактерии, клетки животных и

растений [4, 5, 11]. Помимо этого, с помощью проточной цитометрии можно определять уровень цитокинов — одного из основных показателей функциональной активности дендритных клеток [3, 5, 6, 10].

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип метода проточной цитометрии включает в себя три основных этапа (рис. 1) [2, 3, 5]:

- окрашивание проб флуорисцирующими красителями;
- измерение и регистрация оптических параметров клеток в проточной кювете и преобразование света в электрический сигнал;
- определение количественной величины измеряемых параметров.

В основе метода лежит принцип гидродинамического фокусирования. Суспензия клеток, предварительно окрашенных флуоресцентными красителями, под давлением подаётся в проточную ячейку. За счёт разности давлений между образцом и проточной жидкостью происходит гидродинамическое фокусирование струи в струе, вследствие чего образуется два ламинарных потока жидкости и предотвращается их перемешивание (рис. 2). Диаметр внутренней струи соответствует размерам проходящих клеток, поэтому клетки выстраиваются друг за другом [2, 5, 8].

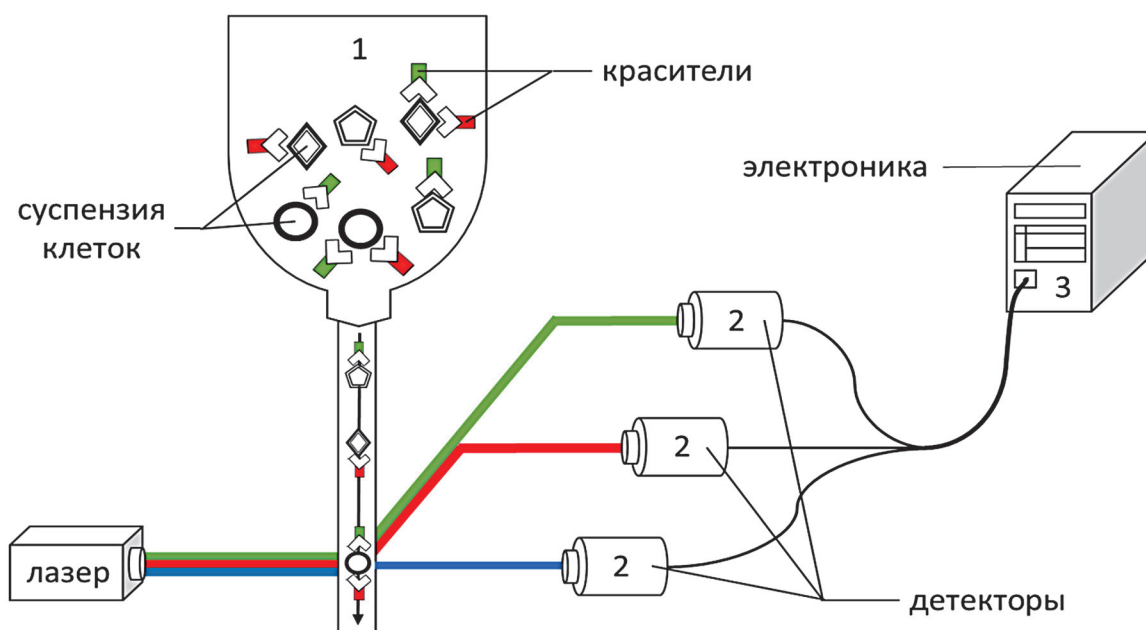


Рис. 1. Принцип проточной цитометрии.

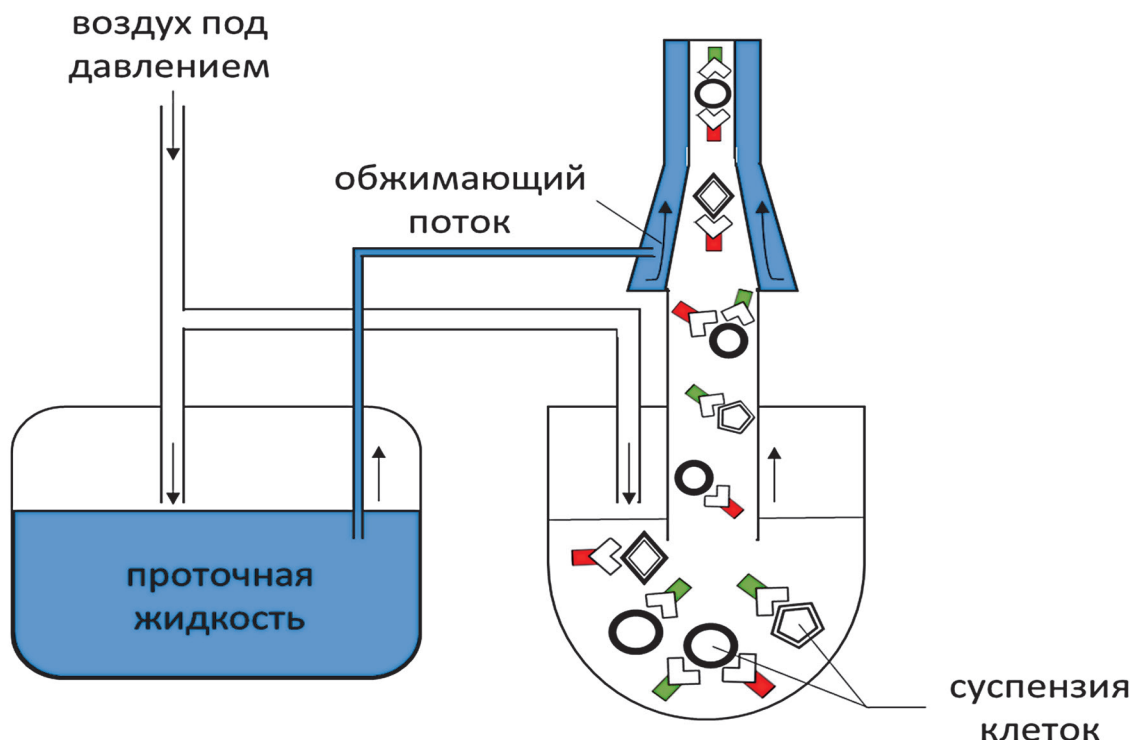


Рис. 2. Схема проточной системы.

В определенной зоне клетки пересекают луч источника света, после чего происходит регистрация информации об их параметрах. В ходе цитометрического анализа регистрируются такие показатели, как светорассеяние клеток и интенсивность флуоресценции. Первый включает в себя два компонента: FSC (forward side scatter) — показатель прямого светорассеяния и SSC (side scatter) — показатель бокового светорассеяния (рис. 3) [2, 5].

Прямое светорассеяние (FSC) позволяет определять размеры самой клетки. Отклонения лазерных лучей при этом светорассеянии не должны превышать 9–12 градусов. Боковое светорассеяние (SSC) дает информацию о внутриклеточных параметрах (наличие гранул, клеточных включений, концентрации физиологически значимых химических соединений в цитоплазме клеток. При прохождении сквозь клетку лазерный луч преломляется и рассеивается, затем излучение собирается по детекторам бокового и малоуглового (прямого) светорассеяния. Сам анализ показателей светорассеяния зависит от морфофункциональных особенностей клеток [2, 4, 5].

Предварительно клеточную фракцию нагружают моноклональными антителами (MAT) и красителями — флюорохромами —

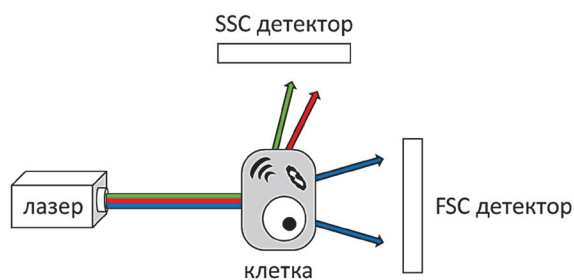


Рис. 3. Светорассеяния клетки.

органическими полимерами, содержащими сопряженные ароматические фрагменты. И только после этого раствор с содержимым подается в проточную кювету цитометра. Моноклональные антитела (MAT) необходимы в данном анализе, поскольку именно с ними взаимодействуют флюорохромы [2, 5].

Принцип действия флюорохромов следующий: в результате присоединения к MAT полимерного красителя образуется π -орбитальная система (рис. 4). Для неё характерна большая делокализация электронного облака. За счет флуоресцентного красителя флюорохромы обладают очень высоким квантовым выходом, что позволяет регистрировать даже самые слабые сигналы [2, 4].

Основной параметр, регистрируемый проточными цитометрами — интенсивность флюоресценции исследуемой субпопуляции клеток или внутриклеточных компонентов. В момент пересечения клеткой луча лазера флюорохромы, связанные с моноклональными антителами, переходят в возбуждённое состояние, в результате чего происходит изменение длины волны испускаемых флюоресцентными красителями квантов света. Данное излучение проходит через оптическую систему прибора (рис. 5), после чего происходит регистрация детекторами. Заключительный этап анализа проточного цитометра — преобразование оптических сигналов в электрические с последующим компьютерным анализом полученной информации [2, 4, 5].

Компьютерное отображение результатов цитофлюориметрии представляет собой график зависимости различных клеточных параметров. Ось абсцисс характеризует размеры

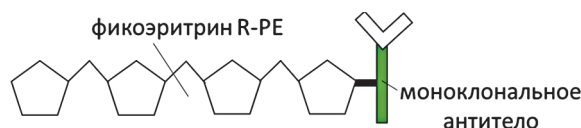


Рис. 4. Принцип действия фикоэритрина R-PE.

клеток, ось ординат — концентрацию клеточного содержимого. Также по осям могут быть заданы другие показатели для исследования, к примеру, по оси абсцисс — наличие на клеточных мембранах определённых кластеров дифференцировки (CD), а по оси ординат структура клеток. На рисунке 6 представлена оценка субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток крови: нейтрофилы имеют большие размеры и количество компонентов внутриклеточного содержимого по сравнению с моноцитами и лимфоцитами, поэтому на графике представлены выше и правее остальных [2]. По такому принципу и происходит анализ полученных данных методом проточной цитометрии. В итоге, из одной пробы материала пациента можно получить информацию о субпопуляционной фракции клеток, а также для каждой популяции из пробы оценить уровень апоптоза, пролиферации, экспрессии клеточных рецепторов, внутриклеточных белков и другие показатели [2, 4, 5, 11].

ПРЕИМУЩЕСТВА МЕТОДА

Метод проточной цитометрии обладает рядом преимуществ, делающих его востребованным в лабораторной практике. В первую

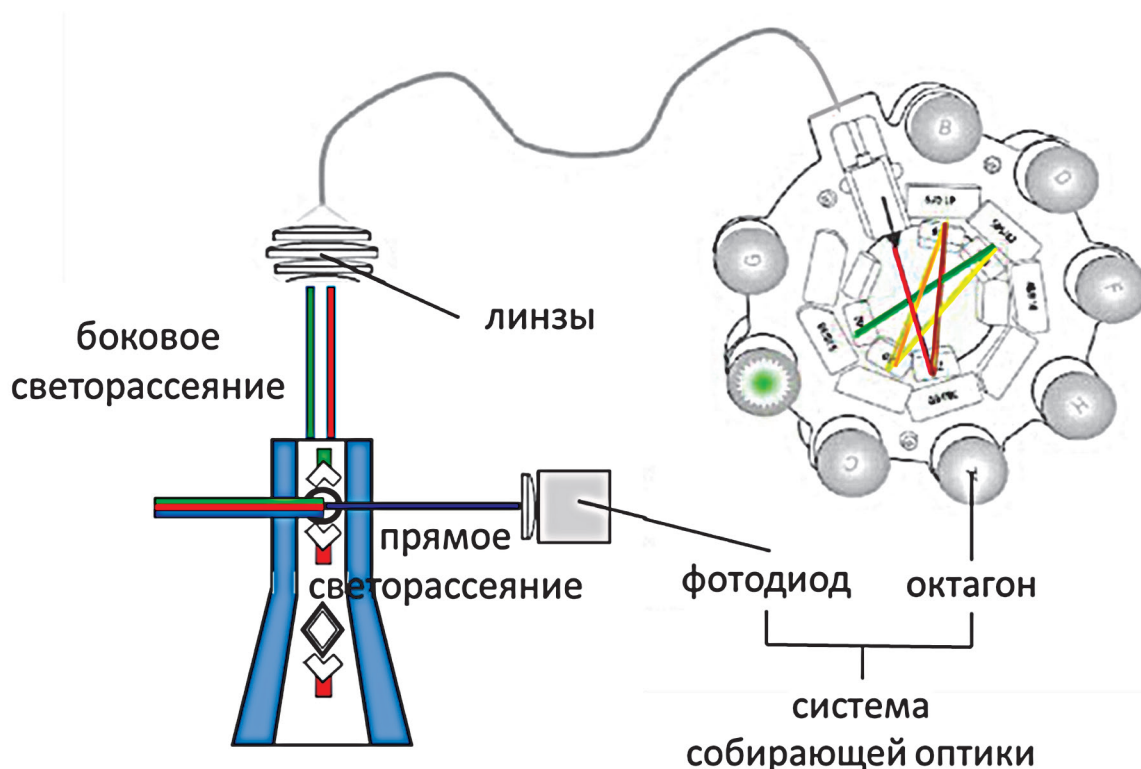


Рис. 5. Схема оптической системы.

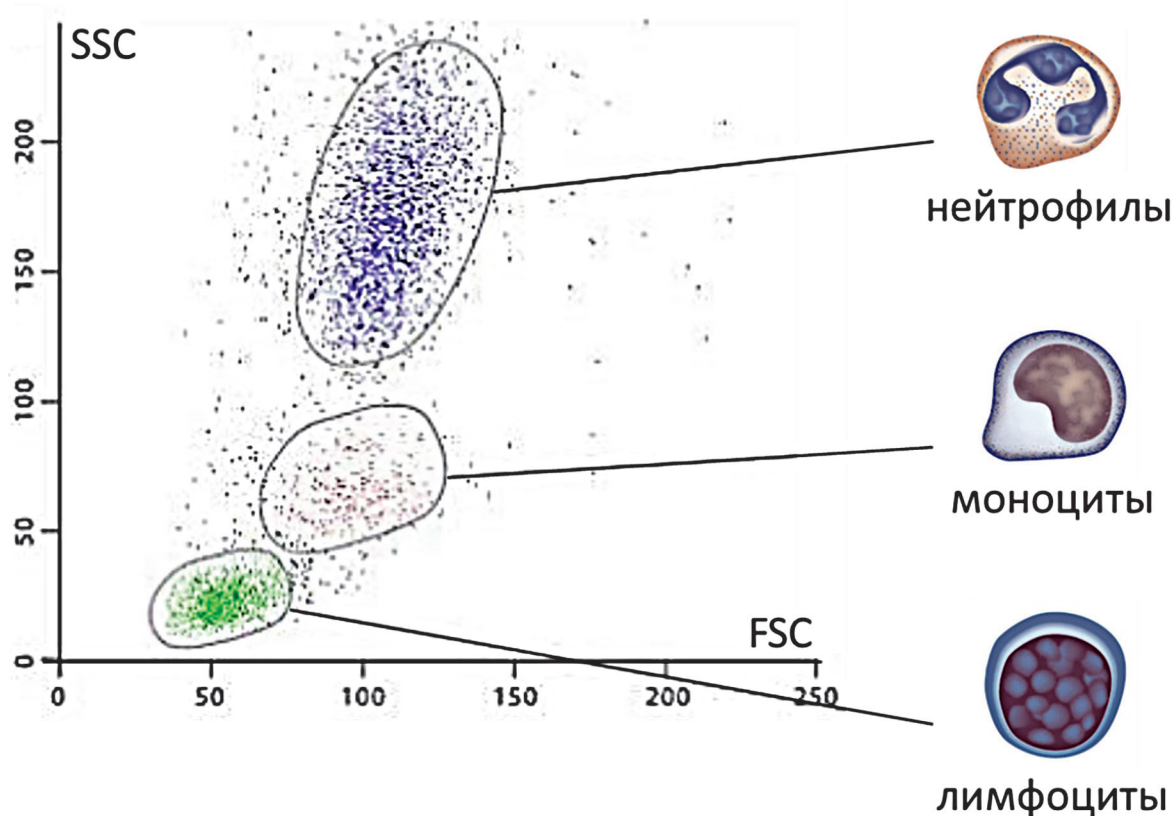


Рис. 6. Диаграмма бокового-прямого (SSC-FSC) светорассеяния для суспензии иммунокомпетентных клеток крови

очередь, этот метод позволяет осуществить быстрый анализ большого количества клеток и определить физико-химические показатели каждой конкретной клетки за счёт количественного измерения интенсивности флуоресценции. Такой результат достигается только при наличии высокоэффективных и высокочувствительных фотоприёмников, регистрирующих сигналы, полученные от оптической системы прибора. Кроме того, с помощью цитометрического анализа можно измерять физиологические внутриклеточные параметры: уровень pH, потенциал клеточной мембраны, концентрацию свободных ионов, а также оценить активность ферментов, входящих в состав клетки. Благодаря подобным возможностям проточная цитофлуориметрия применяется во многих областях медицины и биологии (рис. 7) [6, 7, 8, 9, 17]. К примеру, в биологической химии данный метод используется для определения уровня внутриклеточного кальция и синтеза в клетке активных форм кислорода, генерируемых во время респираторного «взрыва» [5, 13, 14]. Проточная цитометрия может быть использована для количественного анализа питательных веществ,

необходимых организму. Так, флуорохром «нильский красный» позволяет с хорошей воспроизводимостью регистрировать как накопление липидов в небольших по размеру липидных тельцах, так и уменьшение их уровня в живых клетках, не специализированных на создании жирового депо [5, 13, 15]. В цитологии с помощью цитометрического анализа можно исследовать практически все показатели фагоцитарного звена иммунной системы [5, 13]. Помимо этого, описываемый метод используется и в микробиологии при оценке бактерицидной функции фагоцитов периферической крови, причём по сравнению с классическими микробиологическими методами цитофлуориметрия сокращает время анализа в несколько раз [5, 14, 16]. Также на проточном цитометре проводится оценка апоптоза активированных лимфоцитов крови человека. При данном исследовании используется меченый флуорохромом аннексин V. Данный компонент связывается с фосфатидилсерин, который появляется на мембране клеток, подвергающихся апоптозу [5, 13]. Наиболее широко метод используется в иммунологии. Отдельное внимание стоит уде-

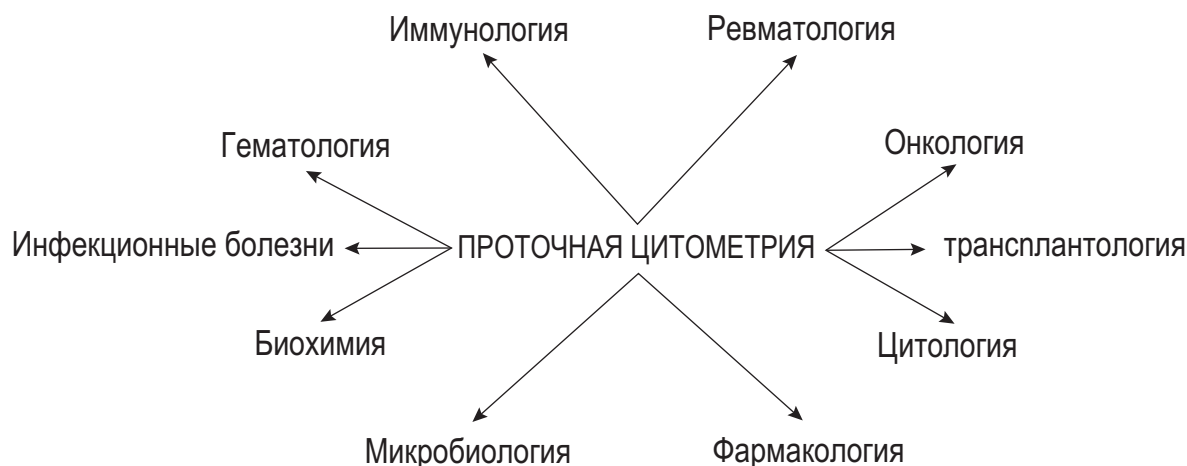


Рис. 7. Области применения проточной цитометрии

лить его применению в онкоиммунологических исследованиях.

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В ИММУНОДИАГНОСТИКЕ

В настоящее время с помощью проточной цитофлуориметрии производится оценка пролиферативной активности лимфоцитов, необходимая для анализа иммунного статуса онкологических больных. Для определения состояния иммунитета необходимо количественное измерение продукции в организме внеклеточных и внутриклеточных цитокинов. Этот процесс осуществляется за счёт связывания конкретных цитокинов с моноклональными антителами: на проточном цитометре отражается интенсивность свечения частиц, коррелирующая с количеством искомого цитокина. Стимуляция цитокинов *in vitro* даёт возможность судить о функциональной активности тех или иных иммунокомпонентных клеток [5, 10, 12, 17]. Цитометрический анализ также позволяет исследовать различные параметры фагоцитарных клеток иммунной системы: он определяет не только поверхностные рецепторные молекулы фагоцитов, но их функциональную активность на этапе самого процесса фагоцитоза. Помимо этого, описываемый метод позволяет изучать активационный апоптоз лимфоцитов. С помощью флуоресцентного красителя PI выявляются гиподиплоидные клетки и анализируется количество клеток с утраченной частью ДНК. С клинической точки зрения исследование уровня апоптоза играет важную роль при оценке иммунного статуса пациента, поскольку апоптоз является одной из форм ответа лимфоцитов на патогенный стимул [5, 9]. Цитоме-

трический анализ может применяться также при исследовании функциональной активности естественных киллерных клеток, осуществляемой по экспрессируемым маркерам или же за счёт меченых радионуклидов. Во втором случае цитофлуориметрический анализ показывает высокую степень корреляции с радиоизотопным тестом оценки функциональной активности естественных киллерных клеток [9, 19]. Отдельно стоит выделить роль проточной цитометрии в иммунофенотипировании лимфоцитов. Основой для данного исследования является взаимодействие моноклональных антител, связанных флуоресцентной меткой. По интенсивности свечения анализируемых клеток иммунной системы определяется выраженность конкретного антигена на поверхности клеточной мембраны [5, 20, 21]. Подобные исследования с применением проточной цитометрии позволяют проводить мониторинг иммунной системы онкологических пациентов, оценивать их противоопухолевый ответ и на основе полученных данных определять стратегию лечения.

ВЫВОД

На примере вышеописанных данных можно убедиться, что возможности проточной цитофлуориметрии достаточно обширны. При наличии подходящих друг к другу моноклональных антител и флуорохромов можно определить не только концентрацию иммунокомпонентных клеток крови, но и факторы апоптоза и некротических образований, что имеет большое значение в иммунодиагностике онкологических больных. Проточная цитометрия — уникальная методика ла-

бораторной диагностики в биологии и медицине, которая, по нашему мнению, уже в ближайшем будущем займёт место среди передовых технологий наиболее точного клеточного и молекулярного анализа.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность сотрудникам научного отдела онкоиммунологии НМИЦ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова МЗ РФ за предоставленную информацию по основам метода проточной цитометрии и его использованию в лабораторной и клинической диагностике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Данилова А.Б., Данилов А.О., Нехаева Т.Л., Георгиев Г.П., Гнучев Н.В., Ларин С.С., Киселёв С.Л. Клеточные технологии в терапии злокачественных опухолей. Росс. имун. журнал. 2008; 2(11), 2–3: 303–4.
2. Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Новик А.В., Данилова А.Б., Авдонкина Н.А., Емельянова Н.В. Дендритноклеточные вакцины в иммунотерапии солидных опухолей: учебное пособие для врачей и обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования. М.: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова; 2019: 130.
3. Битанова Е.Ж., Тарабаева А.С. Проточная цитометрия — преимущества метода и области применения. Вестник КазНМУ. 2012; 4: 465–7.
4. Кисиличина Д.Г., Луговская С.А., Наумова Е.В., Почтарь М.Е., Никитин Е.А. Прогностическое значение оценки минимальной резидуальной болезни методом проточной цитофлюориметрии во время проведения терапии хронического лимфолейкоза. Российский иммунологический журнал. 2013; 7(16), 2–3: 345.
5. Мазуров Д.В., Дамбаева С.В., Климова С.В., Бахус Г.О., Ярилин А.А., Пинегин Б.В. Применение проточной цитометрии в иммунодиагностике. Медицинская иммунология. 2002; 4(4–5): 507–14.
6. Моисеенко В.М., Волков Н.М. История иммунотерапии рака. Практическая онкология. 2016; 17(2): 53–61.
7. Нехаева Т.Л. Оптимизация технологии и стандартизация получения противоопухолевых вакцин на основе аутологичных дендритных клеток. Автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата медицинских наук. 2014.
8. Николаева Т.Г., Добрынин Я.В., Басов Б.Н., Чиквашвили Б.М., Воротников И.К., Летягин В.П. Проточная ДНК-цитометрия в прогнозировании течения рака молочной железы. 1994.
9. Солнцева О.С., Калинина Н.М., Сысоев К.А., Калашникова А.А. Методические подходы к оценке синтеза цитокинов с использованием проточной цитометрии. М.: НИО клинической иммунологии Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины МЧС России. 2000; 2(1): 97–9.
10. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине. СПб Институт Биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, М.: Медицинская иммунология. 2007; 9(4–5): 373–8.
11. Шмагель К.В., Черешнёв В.А. Клетки врождённого иммунитета. М.: ГОУ ВПО ПГМА им. акад. Е.А. Вагнера. 2011: 242.
12. Banchereau J., and Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998; 392: 245–52.
13. Hed J., Hallden G., Johansson S.G., Larsson P. The use of fluorescence quenching in flow cytofluorometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. J Immunol Methods. 1987; 101(1): 119–25.
14. Hume D.A., Weidemann M.J. Mitogenic Lymphocyte Transformation. Elsevier. 1980.
15. Jackson A, Warner N. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3rd ed. Washington DC: American Society for Microbiology. 1986: 226–35.
16. Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: Selection and testing of agents and interpretation of data. Clin. Immunol. Newslett. 1990; 10: 43–55.
17. Janeway Ch. Immunobiology 5E: The immune system in health and disease. Garland Publishing. 2001: 307–9.
18. Jung T., Schauer U. et al. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. J. Immunol. Meth. 1993; 159: 197–207.
19. Kaplan D.H., Shankaran V., Dighe A.S., Stockert E., Aguet M., Old L.J., Schreiber R.D. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(13): 7556–61.
20. Redelman-Sidi G., Glickman M.S., Bochner B.H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer— a current perspective. Nat Rev Urol. 2014; 11(3): 153–162.
21. Shankaran V., Ikeda H., Bruce A.T., White J.M., Swanson P.E., Old L.J., Schreiber R.D. IFNγ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. Nature. 2001; 410(6832): 1107–11.

REFERENCES:

1. Baldueva I.A., Moiseenko V.M., Danilova A.B., Danilov A.O., Nekhaeva T.L., Georgiev G.P., Gnuchev

- N.V., Larin S.S., Kiselyov S.L. Kletochnye tekhnologii v terapii zlokachestvennyh opuholej. [Cellular technologies in the treatment of malignant tumors]. Ross. immun. zhurnal. 2008; 2(11), 2–3: 303–4. (In Russian).
2. Baldueva I.A., Nekhaeva T.L., Novik A.V., Danilova A.B., Avdonkina N.A., Emel'yanova N.V. Dendritnokletochnye vakciny v immunoterapii solidnyh opuholej: uchebnoe posobie dlya vrachej i obuchayushchihsya v sisteme vysshego i dopolnitel'nogo professional'nogo obrazovaniya. [Dendritic cell vaccines in immunotherapy of solid tumors: a training manual for doctors and students in the system of higher and additional professional education]. M.: NMIC onkologii im. N.N. Petrova; 2019: 130. (In Russian).
 3. Bitanova E.ZH., Tarabaeva A.S. Protochnaya citometriya — preimushchestva metoda i oblasti primeneniya. [Flow cytometry — the advantages of the method and scope]. Vestnik KazNMU. 2012; 4: 465–7. (In Russian).
 4. Kisilichina D.G., Lugovskaya S.A., Naumova E.V., Pochtar' M.E., Nikitin E.A. Prognosticheskoe znachenie ocenki minimal'noj rezidual'noj bolezni metodom protochnoj citofluorimetrii vo vremya provedeniya terapii hronicheskogo limfolejkoza. [The prognostic value of assessing the minimum residual disease by flow cytometry during the treatment of chronic lymphocytic leukemia]. Rossijskij immunologicheskij zhurnal. 2013; 7(16), 2–3: 345. (In Russian).
 5. Mazurov D.V., Dambaeva S.V., Klimova S.V., Bahus G.O., YArilin A.A., Pinegin B.V. Primenenie protochnoj citometrii v immunodiagnostike. [The use of flow cytometry in immunodiagnostics]. Medicinskaya immunologiya. 2002; 4(4–5): 507–14. (In Russian).
 6. Moiseenko V.M., Volkov N.M. Istoriya immunoterapii raka. [History of cancer immunotherapy]. Prakticheskaya onkologiya. 2016; 17(2): 53–61. (In Russian).
 7. Nekhaeva T.L. Optimizaciya tekhnologii i standartizaciya polucheniya protivopuholevyh vakcin na osnove autologichnyh dendritnyh kletok. [Optimization of technology and standardization of the production of antitumor vaccines based on autologous dendritic cells]. Avtoreferat dissertacii na soiskanie uchyonoj stepeni kandidata medicinskih nauk. 2014. (In Russian).
 8. Nikolaeva T.G., Dobrynin YA.V., Basov B.N., CHikvashvili B.M., Vorotnikov I.K., Letyagin V.P. Protochnaya DNK-citometriya v prognozirovanii tekheniya raka molochnoj zhelezy. [Flow DNA cytometry in predicting the course of breast cancer]. 1994. (In Russian).
 9. Solnceva O.S., Kalinina N.M., Sysoev K.A., Kalashnikova A.A. Metodicheskie podhody k ocenke sin-teza citokinov s ispol'zovaniem protochnoj citometrii. [Methodological approaches to the assessment of cytokine synthesis using flow cytometry]. M.: NIO klinicheskoy immunologii Vserossijskogo centra ekstrennoj i radiacionnoj mediciny MCHS Rossii. 2000; 2(1): 97–9. (In Russian).
 10. Hajdukov S.V., Zurochka A.V. Protochnaya citometriya kak sovremennyy metod analiza v biologii i medicine. [Flow cytometry as a modern method of analysis in biology and medicine]. SPb Institut Bioorganicheskoy himii im. akad. M.M. SHemyakina i YU.A. Ovchinnikova RAN, M.: Medicinskaya immunologiya. 2007; 9(4–5): 373–8. (In Russian).
 11. SHmagel' K.V., Cheresnyov V.A. Kletki vrozhdynogo immuniteta. [The cells of innate immunity]. M.: GOU VPO PGMA im. akad. E.A. Vagnera. 2011: 242. (In Russian).
 12. Banchereau J., and Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998; 392: 245–52.
 13. Hed J., Hallden G., Johansson S.G., Larsson P. The use of fluorescence quenching in flow cytofluorometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. J Immunol Methods. 1987; 101(1): 119–25.
 14. Hume D.A., Weidemann M.J. Mitogenic Lymphocyte Transformation. Elsevier. 1980.
 15. Jackson A., Warner N. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3rd ed. Washington DC: American Society for Microbiology. 1986: 226–35.
 16. Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: Selection and testing of agents and interpretation of data. Clin. Immunol. Newslett. 1990; 10: 43–55.
 17. Janeway Ch. Immunobiology 5E: The immune system in health and disease. Garland Publishing. 2001: 307–9.
 18. Jung T., Schauer U. et al. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. J. Immunol. Meth. 1993; 159: 197–207.
 19. Kaplan D.H., Shankaran V., Dighe A.S., Stockert E., Aguet M., Old L.J., Schreiber R.D. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(13): 7556–61.
 20. Redelman-Sidi G., Glickman M.S., Bochner B.H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer— a current perspective. Nat Rev Urol. 2014; 11(3): 153–162.
 21. Shankaran V., Ikeda H., Bruce A.T., White J.M., Swanson P.E., Old L.J., Schreiber R.D. IFNγ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. Nature. 2001; 410(6832): 1107–11.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Утв. приказом и.о. ректора
ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России от 07.12.18

НАСТОЯЩИЕ ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЯВЛЯЮТСЯ ИЗДАТЕЛЬСКИМ ДОГОВОРОМ

Условия настоящего Договора (далее «Договор») являются публичной офертой в соответствии с п. 2 ст. 437 Гражданского кодекса Российской Федерации. Данный Договор определяет взаимоотношения между редакцией журнала «Forcipe» (далее по тексту «Журнал»), зарегистрированного Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (РОСКОМНАДЗОР), ПИ № ФС77–74242 от 02 ноября 2018 г., именуемой в дальнейшем «Редакция» и являющейся структурным подразделением ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России, и автором и/или авторским коллективом (или иным правообладателем), именуемым в дальнейшем «Автор», принявшим публичное предложение (оферту) о заключении Договора.

Автор передает Редакции для издания авторский оригинал или рукопись. Указанный авторский оригинал должен соответствовать требованиям, указанным в разделах «Представление рукописи в журнал», «Оформление рукописи». При рассмотрении полученных авторских материалов Журнал руководствуется «Едиными требованиями к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» (Intern. committee of medical journal editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals // Ann. Intern. Med. 1997; 126: 36–47).

В Журнале печатаются ранее не опубликованные работы по профилю Журнала (хотя бы один из соавторов статьи должен быть либо студентом, либо молодым ученым — до 35 лет).

Журнал не рассматривает работы, результаты которых по большей части уже были опубликованы или описаны в статьях, представленных или принятых для публикации в

другие печатные или электронные средства массовой информации. Представляя статью, автор всегда должен ставить редакцию в известность обо всех направлениях этой статьи в печать и о предыдущих публикациях, которые могут рассматриваться как множественные или дублирующие публикации той же самой или очень близкой работы. Автор должен уведомить редакцию о том, содержит ли статья уже опубликованные материалы и предоставить ссылки на предыдущую, чтобы дать редакции возможность принять решение, как поступить в данной ситуации. Не принимаются к печати статьи, представляющие собой отдельные этапы незавершенных исследований, а также статьи с нарушением «Правил и норм гуманного обращения с биообъектами исследований».

Размещение публикаций возможно только после получения положительной рецензии.

Все статьи, в том числе статьи аспирантов и докторантов, публикуются бесплатно.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РУКОПИСИ В ЖУРНАЛ

Авторский оригинал принимает редакция. Подписанная Автором рукопись должна быть отправлена в адрес редакции по электронной почте на адрес sovetsno.gpmu@gmail.com. Автор должен отправить конечную версию рукописи и дать файлу название, состоящее из фамилии первого автора и первых 2–3 сокращенных слов из названия статьи.

СОПРОВОДИТЕЛЬНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

К авторскому оригиналу необходимо приложить экспертное заключение о возможности опубликования в открытой печати (бланк

можно запросить sovetsno.gpmu@gmail.com).

Рукопись считается поступившей в Редакцию, если она представлена комплектно и оформлена в соответствии с описанными требованиями. Предварительное рассмотрение рукописи, не заказанной Редакцией, не является фактом заключения между сторонами издательского Договора.

При представлении рукописи в Журнал Авторы несут ответственность за раскрытие своих финансовых и других конфликтных интересов, способных оказать влияние на их работу. В рукописи должны быть упомянуты все лица и организации, оказавшие финансовую поддержку (в виде грантов, оборудования, лекарств или всего этого вместе), а также другое финансовое или личное участие.

АВТОРСКОЕ ПРАВО

Редакция отбирает, готовит к публикации и публикует переданные Авторами материалы. Авторское право на конкретную статью принадлежит авторам статьи. Авторский гонорар за публикации статей в Журнале не выплачивается. Автор передает, а Редакция принимает авторские материалы на следующих условиях:

- 1) Редакции передается право на оформление, издание, передачу Журнала с опубликованным материалом Автора для целей реферирования статей из него в Реферативном журнале ВИНТИ, РНИЦ и базах данных, распространение Журнала/авторских материалов в печатных и электронных изданиях, включая размещение на выбранных либо созданных Редакцией сайтах в сети Интернет в целях доступа к публикации в интерактивном режиме любого заинтересованного лица из любого места и в любое время, а также на распространение Журнала с опубликованным материалом Автора по подписке;
- 2) территория, на которой разрешается использовать авторский материал, — Российская Федерация и сеть Интернет;
- 3) срок действия Договора — 5 лет. По истечении указанного срока Редакция оставляет за собой, а Автор подтверждает бесспорное право Редакции на продолжение размещения авторского материала в сети Интернет;
- 4) Редакция вправе по своему усмотрению без каких-либо согласований с Автором заключать договоры и соглашения с третьими ли-

цами, направленные на дополнительные меры по защите авторских и издательских прав;

- 5) Автор гарантирует, что использование Редакцией предоставленного им по настоящему Договору авторского материала не нарушит прав третьих лиц;
- 6) Автор оставляет за собой право использовать предоставленный по настоящему Договору авторский материал самостоятельно, передавать права на него по договору третьим лицам, если это не противоречит настоящему Договору;
- 7) Редакция предоставляет Автору возможность безвозмездного получения справки с электронными адресами его официальной публикации в сети Интернет;
- 8) при перепечатке статьи или ее части ссылка на первую публикацию в Журнале обязательна.

ПОРЯДОК ЗАКЛЮЧЕНИЯ ДОГОВОРА И ИЗМЕНЕНИЯ ЕГО УСЛОВИЙ

Заключением Договора со стороны Редакции является опубликование рукописи данного Автора в журнале «Forcipe» и размещение его текста в сети Интернет. Заключением Договора со стороны Автора, т. е. полным и безоговорочным принятием Автором условий Договора, является передача Автором рукописи и экспертного заключения.

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСИ

Статья должна иметь (НА РУССКОМ И АНГЛИЙСКОМ ЯЗЫКАХ):

1. Заглавие (Title) должно быть кратким (не более 120 знаков), точно отражающим содержание статьи.
2. Сведения об авторах (публикуются). Для каждого автора указываются: фамилия, имя и отчество, место работы, почтовый адрес места работы, e-mail. Фамилии авторов рекомендуется транслитерировать так же, как в предыдущих публикациях или по системе BGN (Board of Geographic Names), см. сайт <http://www.translit.ru>.
2. Резюме (Summary) (**1500–2000 знаков, или 200–250 слов**) помещают перед текстом статьи. Резюме не требуется при публикации рецензий, отчетов о конференциях, информационных писем.

Авторское резюме к статье является основным источником информации в отечественных и зарубежных информационных системах

и базах данных, индексирующих журнал. Резюме доступно на сайте журнала «Forcipe» и индексируется сетевыми поисковыми системами. Из аннотации должна быть понятна суть исследования, нужно ли обращаться к полному тексту статьи для получения более подробной, интересующей его информации. Резюме должно излагать только существенные факты работы.

Рекомендуемая структура аннотации: введение (Background), цели и задачи (Purposes and tasks), методы (Materials and methods), результаты (Results), выводы (Conclusion). Предмет, тему, цель работы нужно указывать, если они не ясны из заглавия статьи; метод или методологию проведения работы целесообразно описывать, если они отличаются новизной или представляют интерес с точки зрения данной работы. Объем текста авторского резюме определяется содержанием публикации (объемом сведений, их научной ценностью и/или практическим значением) и должен быть в пределах 200–250 слов (1500–2000 знаков).

3. Ключевые слова (Key words) от 3 до 10 ключевых слов или словосочетаний, которые будут способствовать правильному перекрестному индексированию статьи, помещаются под резюме с подзаголовком «ключевые слова». Используйте термины из списка медицинских предметных заголовков (Medical Subject Headings), приведенного в Index Medicus (если в этом списке еще отсутствуют подходящие обозначения для недавно введенных терминов, выберите наиболее близкие из имеющихся). Ключевые слова разделяются точкой с запятой.

4. Литература (References). Список литературы должен представлять полное библиографическое описание цитируемых работ в соответствии с NLM (National Library of Medicine) Author A. A., Author B. B., Author C. C. Title of article. Title of Journal. 2005;10(2):49–53. Фамилии и инициалы авторов в пристатейном списке приводятся в алфавитном порядке, сначала русского, затем латинского алфавита. В описании указываются ВСЕ авторы публикации. Библиографические ссылки в тексте статьи даются цифрой в квадратных скобках. Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

Книга: Автор(ы) название книги (знак точка) место издания (двоеточие) название издательства (знак точка с запятой) год издания.

Если в качестве автора книги выступает редактор, то после фамилии следует ред.

Преображенский Б. С., Тёмкин Я. С., Лихачёв А. Г. Болезни уха, горла и носа. М.: Медицина; 1968.

Радзинский В. Е., ред. Перинеология: учебное пособие. М.: РУДН; 2008.

Brandenburg J.H., Ponti G.S., Worring A.F. eds. Vocal cord injection with autogenous fat. 3rd ed. NY: Mosby; 1998.

Глава из книги: Автор (ы) название главы (знак точка) В кн.: или In: далее описание книги [Автор (ы) название книги (знак точка) место издания (двоеточие) название издательства (знак точка с запятой) год издания] (двоеточие) стр. от и до.

Коробков Г.А. Темп речи. В кн.: Современные проблемы физиологии и патологии речи: сб. тр. Т. 23. М.; 1989: 107–11.

Статья из журнала

Автор (ы) название статьи (знак точка) название журнала (знак точка) год издания (знак точка с запятой) том (если есть в круглых скобках номер журнала) затем знак (двоеточие) страницы от и до.

Кирющенков А. П., Совчи М. Г., Иванова П. С. Поликистозные яичники. Акушерство и гинекология. 1994; N 1: 11–4.

Brandenburg J. H., Ponti G. S., Worring A. F. Vocal cord injection with autogenous fat: a long-term magnetic resonance. Laryngoscope. 1996; 106 (2, pt 1): 174–80.

Тезисы докладов, материалы научных конф.

Бабий А. И., Левашов М. М. Новый алгоритм нахождения кульминации экспериментального нистагма (миниметрия). III съезд оториноларингологов Респ. Беларусь: тез. докл. Минск; 1992: 68–70.

Салов И.А., Маринушкин Д.Н. Акушерская тактика при внутриутробной гибели плода. В кн.: Материалы IV Российского форума «Мать и дитя». М.; 2000; ч. 1: 516–9.

Авторефераты

Петров С. М. Время реакции и слуховая адаптация в норме и при периферических поражениях слуха. Автореф. дис... канд. мед. наук. СПб.; 1993.

Описание Интернет-ресурса

Щеглов И. Насколько велика роль микрофлоры в биологии вида-хозяина? Живые системы: научный электронный журнал. Доступен по: http://www.biorf.ru/catalog.aspx?cat_id=396&d_no=3576 (дата обращения 02.07.2012).

Kealy M. A., Small R. E., Liamputtong P. Recovery after caesarean birth: a qualitative

study of women's accounts in Victoria, Australia. BMC Pregnancy and Childbirth. 2010. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2393/10/47/>. (accessed 11.09.2013)

Для всех статей, имеющих DOI, индекс необходимо указывать в конце библиографического описания.

По новым правилам, учитывающим требования международных систем цитирования, библиографические списки (References) входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в латинице (романским алфавитом). Поэтому авторы статей должны давать список литературы в двух вариантах: один на языке оригинала (русскоязычные источники кириллицей, англоязычные латиницей), как было принято ранее, и отдельным блоком тот же список литературы (References) в романском алфавите для Scopus и других международных баз данных, повторяя в нем все источники литературы, независимо от того, имеются ли среди них иностранные. Если в списке есть ссылки на иностранные публикации, они полностью повторяются в списке, готовящемся в романском алфавите.

В романском алфавите для русскоязычных источников требуется следующая структура библиографической ссылки: автор(ы) (транслитерация), перевод названия книги или статьи на английский язык, название источника (транслитерация), выходные данные в цифровом формате, указание на язык статьи в скобках (in Russian).

Технология подготовки ссылок с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика.

На сайте <http://www.translit.ru> можно бесплатно воспользоваться программой транслитерации русского текста в латиницу. Программа очень простая.

1. Входим в программу Translit.ru. В окошке «варианты» выбираем систему транслитерации BGN (Board of Geographic Names). Вставляем в специальное поле весь текст библиографии на русском языке и нажимаем кнопку «в транслит».
2. Копируем транслитерированный текст в готовящийся список References.
3. Переводим с помощью автоматического переводчика название книги, статьи, постановления и т.д. на английский язык, переносим его в готовящийся список. Перевод, безусловно, требует редактирования, поэтому данную часть необходимо

готовить человеку, понимающему английский язык.

4. Объединяем описания в соответствии с принятыми правилами и редактируем список.
5. В конце ссылки в круглых скобках указывается (in Russian). Ссылка готова.

Примеры транслитерации русскоязычных источников литературы для англоязычного блока статьи

Книга: Avtor (y) Nazvanie knigi (znak tochka) [The title of the book in english] (znak tochka) Mesto izdaniya (dvoetochie) Nazvanie izdatel'stva (znak tochka s zapyatoy) god izdaniya.

Preobrazhenskiy B. S., Temkin Ya. S., Likhachev A. G. Bolezni ukha, gorla i nosa. [Diseases of the ear, nose and throat]. M.: Meditsina; 1968. (in Russian).

Radzinskiy V. E., ed. Perioneologiya: uchebnoe posobie. [Perineology tutorial]. M.: RUDN; 2008. (in Russian).

Глава из книги: Avtor (y) Nazvanie glavy (znak tochka) [The title of the article in english] (znak tochka) In: Avtor (y) Nazvanie knigi (znak tochka) Mesto izdaniya (dvoetochie) Nazvanie izdatel'stva (znak tochka s zapyatoy) god izdaniya]. (dvoetochie) stranisi ot i do.

Korobkov G. A. Temp rechi. [Rate of speech]. V kn.: Sovremennye problemy fiziologii i patologii rechi: sb. tr. T. 23. M.; 1989: 107–11. (in Russian).

Статья из журнала: Avtor (y) Nazvanie stat'i (znak tochka) [The title of the article in english] (znak tochka) Nazvanie zhurnala (znak tochka) god izdaniya (znak tochka s zapyatoy) tom (esli est' v kruglykh skobkakh nomer zhurnala) zatem (znak dvoetochie) stranitsy ot i do.

Kiryushchenkov A. P., Sovchi M. G., Ivanova P. S. Polikistoznye yaichniki. [Polycystic ovary]. Akusherstvo i ginekologiya. 1994; N 1: 11–4. (in Russian).

Тезисы докладов, материалы научных конф.

Babiy A. I., Levashov M. M. Novyy algoritn nakhozhdeniya kul'minatsii eksperimental'nogo nistagma (minimetriya). [New algorithm of finding of the culmination experimental nystagmus (minimetriya)]. III s'ezd otorinolaringologov Resp. Belarus': tez. dokl. Minsk; 1992: 68–70. (in Russian).

Salov I. A., Marinushkin D. N. Akusherskaya taktika pri vnutriutrobnoy gibeli ploda. [Obstetric tactics in intrauterine fetal death]. V kn.: Materialy IV Rossiyskogo foruma «Mat' i ditya». M.; 2000; ch.1:516–9. (in Russian).

Авторефераты

Petrov S. M. Vremya reaktsii i slukhovaya adaptatsiya v norme i pri perifericheskikh porazheniyakh slukha. [Time of reaction and acoustical adaptation in norm and at peripheral defeats of hearing]. PhD thesis. SPb.; 1993. (in Russian).

Описание Интернет-ресурса

Shcheglov I. Naskol'ko velika rol' mikroflory v biologii vida-khozyaina? [How great is the microflora role in type-owner biology?]. Zhivye sistemy: nauchnyy elektronnyy zhurnal. Available at: http://www.biorf.ru/catalog.aspx?cat_id=396&d_no=3576 (accessed 02.07.2012). (in Russian).

ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА ПРАВИЛЬНОСТЬ БИБЛИОГРАФИЧЕСКИХ ДАННЫХ НЕСЕТ АВТОР.

Остальные материалы предоставляются либо на русском, либо на английском языке, либо на обоих языках по желанию.

Структура основного текста статьи.

Введение, изложение основного материала, заключение, литература. Для оригинальных исследований — введение, методика, результаты исследования, обсуждение результатов, литература.

В разделе «методика» обязательно указываются сведения о статистической обработке экспериментального или клинического материала. Единицы измерения даются в соответствии с Международной системой единиц — СИ. Фамилии иностранных авторов, цитируемые в тексте рукописи, приводятся в оригинальной транскрипции.

Объем рукописей.

Объем рукописи обзора не должен превышать 25 стр. машинописного текста через два интервала, 12 кеглем (включая таблицы, список литературы, подписи к рисункам и резюме на английском языке), поля не менее 25 мм. Нумеруйте страницы последовательно, начиная с титульной. Объем рукописи статьи экспериментального характера не должен превышать 15 стр. машинописного текста; кратких сообщений (писем в редакцию) — 7 стр.; отчетов о конференциях — 3 стр.; ре-

цензий на книги — 3 стр. Используйте колонтитул — сокращенный заголовок и нумерацию страниц, для помещения вверху или внизу всех страниц статьи.

Иллюстрации и таблицы. Число рисунков рекомендуется не более 5. В подписях под рисунками должны быть сделаны объяснения значений всех кривых, букв, цифр и прочих условных обозначений. Все графы в таблицах должны иметь заголовки. Повторять одни и те же данные в тексте, на рисунках и в таблицах не следует. Рисунки, схемы, фотографии должны быть представлены в расчете на печать в черно-белом виде или уровнями серого в точечных форматах tif, bmp (300–600 dpi), или в векторных форматах pdf, ai, eps, cdr. При оформлении графических материалов учитывайте размеры печатного поля Журнала (ширина иллюстрации в одну колонку — 90 мм, в 2 — 180 мм). Масштаб 1:1.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ

Статьи, поступившие в редакцию, обязательно рецензируются. Если у рецензента возникают вопросы, то статья с комментариями рецензента возвращается Автору. Датой поступления статьи считается дата получения Редакцией окончательного варианта статьи. Редакция оставляет за собой право внесения редакторских изменений в текст, не искажающих смысла статьи (литературная и технологическая правка).

АВТОРСКИЕ ЭКЗЕМПЛЯРЫ ЖУРНАЛА

Редакция обязуется выдать Автору 1 экземпляр Журнала с опубликованной рукописью. Авторы, проживающие в Санкт-Петербурге, получают авторский экземпляр Журнала непосредственно в Редакции. Иногородним Авторам авторский экземпляр Журнала высылается на адрес автора по запросу от автора.

АДРЕС РЕДАКЦИИ

194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2
E-mail: sovetsno.gpmu@gmail.com.