



БУДУЩЕЕ ИММУНОЛОГИИ И АЛЛЕРГОЛОГИИ



Андрей Гончаров,
директор Института биофизики
и клеточной инженерии
НАН Беларуси, кандидат
медицинских наук, доцент

По поручению Председателя Президиума НАН Беларуси В.Г. Гусакова в 2021 г. в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси был создан Центр иммунологии и аллергологии, деятельность которого направлена на комплексное изучение на молекулярно-клеточном уровне механизмов функционирования иммунитета живых организмов в норме и при патологии.

Иммунитет исходно запрограммирован защищаться от генетически чужеродных организмов и веществ, к которым относятся микроорганизмы, вирусы, бактерии, раз-

личные белки, клетки, в том числе и собственные измененные (опухолевые). В последние десятилетия мир столкнулся со значительным ростом заболеваний, связанных с дисфункцией иммунной системы. Одна из актуальных проблем практического здравоохранения – аллергические заболевания. ВОЗ назвала наступившее столетие веком аллергии, а саму болезнь – эпидемией. Согласно прогнозам, к 2025 г. страдать от этого недуга будет уже 50% мирового населения. По данным Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (ЕААСИ), в Европе уже

насчитывается 150 млн хронических аллергиков (20% населения). Еще одна значимая проблема для человечества – заболевания, обусловленные количественными или функциональными изменениями в различных механизмах реализации как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа, – иммунодефициты. Причинами их возникновения могут стать обширные травмы, операции, последствия других заболеваний, включая аутоиммунные, онкологические и инфекционные (ВИЧ, туберкулез, герпес-вирусы), метаболические нарушения, прием цитостатиков

и глюкокортикостероидов, воздействие неблагоприятных факторов внешней среды, жесткие диеты и голодание, приводящие к дефициту витаминов и белка.

Нельзя не отметить, что проблемы иммунологии неразрывно связаны с вопросами противодействия инфекционным заболеваниям. Вспышки эпидемий и пандемии опасных инфекций, которые возникали в последние десятилетия (лихорадка Зика, Эбола, Ласса, грипп, коронавирус, корь, ВИЧ и др.), диктуют необходимость разработки новых высокоэффективных средств иммунодиагностики, лечения и медицинской профилактики, среди которых особое внимание уделяется вакцинам.

События конца 2019 г., связанные с пандемией COVID-19, свидетелями которой мы являемся, заставили взглянуть на проблемы иммунитета особенно пристально. Возбудитель новой коронавирусной инфекции – вирус SARS-CoV-2 – совершенно уникален по своим биологическим свойствам, что потребовало пересмотра многих устоявшихся представлений об инфекционном и эпидемиологическом процессах.

Таким образом, создание Центра обусловлено требованиями времени, повышенным интересом исследователей к проблемам иммунитета. Безусловно, эта тематика не нова для ученых Беларуси. Изысканиями в данном направлении занимаются в Институте физиологии, Институте генетики и цитологии, Институте биологической химии, Институте микробиологии, Институте экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского и ряде других академических организаций. Однако впервые в Беларуси организована струк-

тура, которая комплексно занялась исследованием иммунитета всех живых организмов.

Борьба с коронавирусной инфекцией

Еще до объявления пандемии в 2020 г. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси активно приступил к поиску путей противодействия COVID-19.

В кратчайшие сроки были разработаны методы лечения тяжелых пневмоний с помощью донорских стволовых клеток. В мае 2021 г. завершились клинические испытания, проведенные совместно с БГМУ, показавшие высокую эффективность метода: 57% пациентов с пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, не нуждались в переводе на ИВЛ в ближайшие 7 дней после применения стволовых клеток, а долгосрочные результаты свидетельствуют о том, что в группе исследования выжило на 40% больше пациентов по сравнению с контрольной. По результатам иссле-

дований Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждена соответствующая инструкция по применению (№083–0721 от 22.06.2021 г.).

В апреле – мае 2020 г. совместно с кафедрой пропедевтики внутренних болезней и кафедрой инфекционных болезней БГМУ на инициативной основе комплексно исследована система иммунитета пациентов с пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (в группу было включено 57 человек со среднетяжелым и тяжелым течением болезни). На основании анализа более 100 показателей установлены основные закономерности функционирования иммунной системы пациентов, отмечена гиперактивация миелоидного звена иммунитета, анергия и истощение Т-клеток.

Работа была продолжена в рамках проекта БРФФИ-COVID-19 совместно с Республиканским клиническим медицинским центром Управления делами Президента Республики Беларусь и кафедрой инфекционных болезней БГМУ. Новые исследования нацелены прежде всего



Сотрудники лаборатории иммунологии и клеточной биофизики Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (слева направо): научный сотрудник Елена Рында, аспирант Оксана Тимохина, младший научный сотрудник Яна Минич

на поиск иммунологических предикторов неблагоприятного исхода болезни и мер, направленных на коррекцию возникающих нарушений.

В 2020–2021 гг. сотрудники Центра изучали динамику состояния гуморального и клеточного иммунитета у пациентов после перенесенной внебольничной пневмонии, вызванной вирусом SARS-CoV-2 для прогнозирования продолжительности иммунной защиты. Исследование свыше 200 пациентов показало, что более чем у 95% из них длительно сохранялись антитела к S-белку вируса. В отношении антител к N- и M-белкам установлена тенденция к снижению процента серопозитивных лиц начиная с 6-го месяца. Количество пациентов, у которых выявлялись антигенспецифические T-клетки к S- и M-белку SARS-CoV-2, достоверно не изменялось на протяжении 9 месяцев наблюдения в пределах всех групп исследования (легкая, среднетяжелая, тяжелая). В то же время численность респондентов с клеточным иммунитетом к N-белку SARS-CoV-2 достоверно снижалась в группе перенесших заболевание в легкой и среднетяжелой форме начиная с 6-го месяца.

В ходе реализации данного проекта Министерством здравоохранения Республики Беларусь была разработана и утверждена инструкция «Метод определения содержания в периферической крови T-клеток, специфичных к антигенам вируса SARS-CoV-2» (рег. №013–0321 от 31.03.2021 г.).

По инициативе Председателя Президиума НАН Беларуси В.Г. Гусакова в 2020 г. Академия наук выступила инициа-

тором создания отечественной вакцины против новой коронавирусной инфекции. Распоряжением Главы государства разработка вакцины в части научных исследований и получения лабораторного образца была возложена на РНПЦ эпидемиологии и микробиологии и Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. В 2021 г. в нашем Институте, а именно в Центре иммунологии были разработаны алгоритмы оценки *in vitro* иммуногенных и токсических свойств инактивированного вирусного препарата, метод адсорбции вирусных антигенов на адъюванте. По результатам проведенных *in vitro* исследований отобраны перспективные адъюванты и изоляты SARS-CoV-2, обладающие наиболее выраженной иммуногенностью. Подготовлено более 900 доз кандидатного варианта вакцины для исследований на животных и проведен контроль их качества по ключевым показателям активности и безопасности. В доклинических испытаниях на 4 видах лабораторных животных показано, что вакцина безопасна, хорошо переносится и вызывает образование антител на уровне зарубежных аналогов, признанных ВОЗ. Технология производства позволяет оперативно актуализировать состав вакцины так, чтобы ее эффективность была максимальной. Можно говорить о разработке прототипа вакцины, показавшей на данном этапе исследований высокую эффективность и безопасность, Министерством здравоохранения Республики Беларусь проводится работа по организации ее опытно-промышленного производства.

Создание научной школы в области иммунологии и вак-

цинологии – составная часть обеспечения биологической безопасности страны. Данный проект позволил собрать команду вирусологов и иммунологов, обладающих уникальными знаниями и способных в кратчайшие сроки организовать разработку и выпуск вакцины против практически любой инфекции.

Клеточная иммунотерапия социально значимых заболеваний и создание для этого новых биомедицинских клеточных продуктов

В последние годы в Центре совместно с организациями Министерства здравоохранения Республики Беларусь начаты научно-исследовательские работы, нацеленные на развитие такого важного направления, как клеточная иммунотерапия. Под таковой понимают применение биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), аутологичных (собственных) или донорских, для коррекции нарушенной функции системы иммунитета. Их можно разделить на 2 группы: иммуностимулирующие (для усиления иммунного ответа) и иммуносупрессивные (для подавления иммунной реактивности). К первой относятся прежде всего иммуногенные дендритные клетки (ДК), которые усиливают специфический иммунитет против опухолеассоциированных антигенов при онкозаболеваниях либо антигенов микроорганизмов при хронических инфекциях (туберкулез, гепатиты). Дендритные клетки получают, как правило, из моноцитов крови пациента,

праймируют антигенами и вводят подкожно или внутривенно. Их первое клиническое применение в Беларуси начато автором статьи в 2008 г. под руководством академика НАН Беларуси Л.П. Титова. Дальнейшие исследования, проведенные сотрудниками Центра совместно с кафедрой онкологии БГМУ (проф. Прохоров А.В.), показали, что ДК предотвращают или позволяют отсрочить появление метастазов и значительно продлить жизнь даже тяжелым пациентам на поздних стадиях онкопроцесса. Разработанные и утвержденные методы по лечению рака различной локализации (молочной, поджелудочной железы, мочевого пузыря) активно используются на практике, в том числе в отделении клеточной терапии Института.

Однако применение собственных дендритных клеток не всегда возможно и эффективно по причине малого числа моноцитов в крови пациентов – исходного материала для получения ДК. Одно из важных направлений работы Центра – разработка методов применения аллогенных донорских ДК. Идет поиск наиболее эффективных способов их хранения в низкотемпературных условиях, разрабатывается алгоритм подбора донорских клеток для их успешного применения.

Второй тип БМКП, который используется для клеточной терапии онкозаболеваний, – цитокин-индуцированные киллерные клетки (ЦИИК), которые обладают способностью уничтожать опухоли. Накопление большого количества ЦИИК в лабораторных условиях и введение пациенту, как правило, дает значимые клинические эффекты. В Инсти-



Директор Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, кандидат медицинских наук, доцент Андрей Гончаров и завлабораторией иммунологии и клеточной биофизики, кандидат биологических наук Наталья Антоневиц

туте разработаны методы получения ЦИИК для клинического применения, а сами исследования пройдут на базе минского онкодиспансера в 2022–2023 г.

Ведется активная работа с БМКП, которые применяют для клеточной терапии заболеваний, ассоциированных с избыточным иммунным ответом. Для этого используют клеточные продукты с иммуномодулирующими свойствами – мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Ранние доклинические и клинические исследования были направлены преимущественно на решение задач регенеративной медицины – лечение трофических язв, ожогов, рубцов, заболеваний опорно-двигательного аппарата. Но основная функция МСК – иммуносупрессивная и противовоспалительная, именно поэтому в настоящее время в Центре их применяют по новому назначению: для коррекции иммунопатологических нарушений. Совместно с БГМУ на базе 10-й ГКБ прошли успешные клинические испытания метода лечения COVID-19-ассоциированных пневмоний, в МПНЦ хирургии, трансплан-

тологии и гематологии – серьезного аутоиммунного заболевания – системной красной волчанки (СКВ) с поражением почек. Доказана эффективность клеточной терапии, при которой СКВ не прогрессирует, снижается общая ее активность, что выражается в двукратном снижении индекса SELENA-SLEDAI, улучшении функции почек. Разработаны и утверждены инструкции по применению.

Проект, реализуемый Центром совместно с РНПЦ оториноларингологии с 2021 г. по настоящее время, – лечение тяжелого аллергического ринита, не поддающегося стандартной терапии, и хронического полипозного риносинусита. В ходе клинических исследований клетки вводятся под слизистую оболочку полости носа для снижения иммунного воспаления и облегчения симптомов болезни.

Важно отметить, что для лечения перечисленных заболеваний мы используем донорские стволовые клетки: это дает возможность лучше стандартизировать клеточный продукт по функциональным свойствам. Низкая иммуногенность

стволовых клеток позволяет применять БМКП на их основе без подбора пары «донор – реципиент». Кроме того, с помощью аллогенных клеток проводится лечение в течение нескольких часов после назначения, в то время как срок подготовки собственных МСК составляет от 3 до 5 недель.

Совершенно новые клеточные продукты для терапии аутоиммунных заболеваний, разработанные в центре в 2019–2021 гг., – это толерогенные дендритные и Т-регуляторные клетки. В марте 2022 г. начинаются клинические исследования по терапии сахарного диабета 1-го типа с помощью толерогенных дендритных клеток, а также системного склероза – с применением Т-регуляторных клеток. С учетом исследований *in vitro* имеются все основания надеяться на клинический успех.

Необходимо отметить, что все проводимые в Институте клинические исследования зарегистрированы в международной базе данных clinicaltrials.gov, и краткая информация о них доступна для всех. С 2019 г. проводятся исследования, направленные на разработку новых

биомедицинских клеточных продуктов на основе генетически модифицированных клеток. Несмотря на то что потенциал применения генетически не модифицированных БМКП еще далеко не исчерпан, будущее клеточной иммунотерапии – за внесением в геном клеток точечных изменений, которые позволят существенно скорректировать их функции для достижения желаемого терапевтического эффекта: усилить продукцию важных для лечения конкретных заболеваний биологически активных веществ, эффективно представлять опухолевые белки или уничтожать раковые клетки.

Как уже было сказано, методы подготовки ДК для лечения онкозаболеваний, как правило, предполагают получение аутологичных ДК из моноцитов или гемопоэтических стволовых клеток. Существенный недостаток такого подхода – небольшое количество клеток, которые можно получить из моноцитов крови, и недостаточно активная экспрессия опухолевых антигенов клетками. Все это, на наш взгляд, ограничивает возможности терапии.

Один из самых перспективных вариантов получения большого количества ДК для терапии – их генерация из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), что позволит иметь практически неограниченные объемы клеточной биомассы для терапевтического применения. Сотрудниками института уже созданы генно-инженерные конструкции, необходимые для сборки лентивирусных векторов, несущих гены плюрипотентности. Из фибробластов кожи созданы ИПСК, которые охарактеризованы в отношении экспрессии основных маркеров плюрипотентности и дифференцировочного потенциала.

Важное направление в этой области – разработка методов генетической модификации ДК при помощи лентивирусных векторов, кодирующих опухолеспецифические антигены, что позволит получить более значимый лечебный эффект. Работа в данном направлении будет завершена к 2023 г., и после доклинических испытаний клеточный продукт можно будет применять для лечения пациентов, страдающих меланомой.

Диагностика лекарственной аллергии

Сотрудники Центра разработали уникальную модификацию высокоэффективного метода диагностики реакций гиперчувствительности немедленного типа, в частности аллергии на пыльцу растений и лекарственной аллергии на антибиотики – так называемого теста активации базофилов. Этот клеточный метод *in vitro* диагностики аллергии основан на оценке измене-



Младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточной биофизики Дарья Бобрукевич

ния экспрессии маркеров активации или дегрануляции базофилов в ответ на воздействие аллергена с помощью метода проточной цитометрии. При оценке клинической значимости диагностируемого аллергена ВАТ служит таким же точным функциональным тестом, как и провокационная проба, но выполнение данного исследования исключает потенциальный риск для пациента.

В планах на ближайшую перспективу – создание инновационных тест-систем для диагностики аллергии немедленного и замедленного типов; совместно с НПЦ НАН Беларуси по продовольствию будут проведены научные исследования с целью разработки гипоаллергенных продуктов питания.

Иммунологическая лабораторная диагностика

Количественный анализ циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) и циркулирующих раковых стволовых клеток (ЦРСК), отделившихся от существующей в организме злокачественной опухоли и попавших в общий кровоток, представляет собой ценный независимый прогностический признак, позволяющий определить степень прогрессирования злокачественного процесса в организме пациента и прогнозировать исход болезни. В Центре разработаны и утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкции по применению, в которых изложены вышеуказанные методы диагностики онкозаболеваний, определяющие ЦОК и ЦРСК при помощи проточ-

ной цитометрии. С 2022 г. стартует проект, направленный на разработку молекулярно-биологических методов обнаружения опухолевых клеток в кровотоке, призванный увеличить точность диагностики.

С 2020 г. в Центре оказывают услуги по определению иммунного статуса (базовая и расширенная иммунограмма), что позволяет получить важную информацию о состоянии иммунитета и скорректировать лечение.

Коллекция культур клеток

В результате многолетней работы ученых в области клеточных технологий, иммунологии и биофизики в Институте была создана комплексная коллекция культур клеток. В ее состав вошли перевиваемые клеточные линии животных и человека, выделенные из злокачественных новообразований различной локализации, лимфоцитарных и миелоидных клеток-предшественников. Коллекция весьма востребована при выполнении научных и прикладных проектов, в том числе в вирусологии для культивирования вирусов, при разработке вакцин, противоопухолевых и противовирусных лекарственных средств, тест-систем для иммунодиагностики, контроля качества иммунобиологических лекарственных средств и др.

Нейроиммунология

Отсутствуют сомнения в том, что подавляющее большинство заболеваний нервной системы и психических расстройств возникают вследствие или на фоне повышенной иммунной реак-

тивности по отношению к клеткам нервной ткани. Исследования, начатые в Центре с 2020 г., направлены на углубленное изучение состояния иммунной системы пациентов с психическими расстройствами с целью поиска новых способов их лечения, диагностики и профилактики заболеваний. С этой целью нами разработан эффективный метод дифференцировки микроглиальных клеток из моноцитов периферической крови. Клетки микроглии служат хорошим модельным объектом для научно-практических изысканий в области нейробиологии и нейробиофизики. Проводятся исследования по иммунофенотипированию клеток крови пациентов с психическими расстройствами и здоровых добровольцев. Разработаны методы определения антигенспецифических Т-клеток при демиелинизирующих заболеваниях нервной системы.

Структурная биология и компьютерный дизайн

Апоптоз можно охарактеризовать как форму клеточной гибели, которая играет стабилизирующую роль в поддержании оптимального количества клеток в организме. При некоторых тяжелых заболеваниях критическое значение имеет массивная апоптотическая потеря лимфоцитов, что приводит к развитию вторичных иммунодефицитов. Сотрудники Центра методом математического моделирования разработали линейку соединений с потенциальной противоопухолевой активностью, эффекты которых основаны на модуляции проапоптотического и антиапоптотического действия белков семейства Bcl-2.

Смоделированы полноцепочечные структуры белков CD80 и CD86, участвующие в иммунновоспалительных процессах в организме человека, установлены механизмы костимулирующего действия с их участием и иммуно-ингибирующее действие белков PD-L1 и PD-L2, находящихся на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Осуществлен компьютерный дизайн высокоэффективных низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия PD-L1 с PD-1 в качестве противоопухолевых препаратов.

Исследование биобезопасности и биосовместимости наноматериалов

Во всем мире бурно развиваются нанотераностика и персонализированная медицина. Создание новых адресных носителей лекарственных средств невозможно без доказательств их безопасности для иммунной системы человека. В нашем Институте изучается возможность направленной доставки генетического материала (siRNA, shRNA, miRNA) с использованием наноструктур с целью генетической таргетной терапии. Выявлены механизмы взаимодействия дендримеров с проапоптотическими миРНК, с помощью которых можно разработать основы генной терапии злокачественных новообразований. Кроме того, изучена возможность применения карбосилановых и фосфорных дендримеров в качестве носителей антивирусных ОДН и миРНК, направленных против ВИЧ. Проведены модельные исследования по связыванию дендримерами различных веществ, в результате которых показана

возможность применения первых для нейтрализации эндогенных и экзогенных токсинов.

Иммунотоксикология и металломика

Одно из условий поддержания в норме состояния иммунной системы любого живого организма – сохранение в нем баланса макро- и микроэлементов. Сотрудники Института проводят исследования, направленные на изучение влияния токсичных и потенциально токсичных микроэлементов на развитие патологических процессов.

Иммунология и ветеринария

Для комплексной диагностики заболеваний домашних животных, ассоциированных с патологическими состояниями системы иммунитета (врожденные и приобретенные иммунодефициты, аутоиммунные заболевания, лимфопролиферативные заболевания, аллергия, хронические инфекционные заболевания), а также оценки эффективности и коррекции проводимого лечения в Институте впервые в стране разработаны методы иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови кошек и собак.

Растениеводство

Иммунитет растений постоянно подвергается испытаниям. Эволюционно многие культуры приобрели естественную устойчивость к патогенам, климатическим условиям и другим факторам, однако новые вирусы поражают растения, используя их для размножения своих популяций. По оценкам специалистов, потери

урожая от вирусных инфекций, особенно смешанного типа, могут достигать 50%. Сотрудники Института проводят исследования, направленные на изучение биологических механизмов взаимодействия патогенных грибов и вирусов с клетками растений, для разработки новых иммуномодулирующих препаратов, создания экологически чистых средств защиты и профилактики инфекционных заболеваний сельскохозяйственных культур. Уже разработаны инновационные препараты для их защиты от вредителей и неблагоприятных условий внешней среды.

Обучение и подготовка кадров

В ноябре 2021 г. ВАК согласовала открытие аспирантуры при Институте по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, отрасль «биологические науки». Таким образом, Институт готовит научные кадры высшей квалификации уже по 5 специальностям, связанным между собой.

Работа созданного в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси Центра иммунологии и аллергологии направлена на проведение фундаментальных и прикладных исследований, напрямую или опосредованно касающихся вопросов иммунологии и клеточной инженерии. Созданный Центр иммунологии и аллергологии расширил спектр нашей деятельности и позволит решать сложные научно-практические задачи в области медицины, биологии и сельского хозяйства, разрабатывать технологии и средства для противодействия инфекциям и социально значимым заболеваниям. ■