

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.831-006.487-097-085.371:577.213.32
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-3-323-330>

Поступила в редакцию 09.09.2017
Received 09.09.2017

М. В. Стёганцева, В. А. Шинкевич, Е. П. Вашкевич, Т. М. Михалевская, А. Н. Мелешко

*Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
д. Боровляны, Республика Беларусь*

ПОЛИЭТИЛЕНИМИН УСИЛИВАЕТ ИММУНОГЕННОСТЬ ДНК-ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ГЕНА ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ

Аннотация. Нейробластома – самая распространенная детская солидная опухоль с плохим прогнозом на IV стадии заболевания. Характерным маркером нейробластомы является высокая экспрессия тирозингидроксилазы (ТГ).

ДНК-вакцинация является сопутствующим методом терапии онкологических заболеваний, которые характеризуются высокой вероятностью достижения ремиссии и риском последующего рецидива.

Нами проведена ДНК-вакцинация мышей линии А/Ж с использованием конструкции ТГ в качестве опухолевого антигена. Для доставки вакцины применяли синтетический носитель полиэтиленимин (ПЭИ). Показано, что конъюгирование ДНК-вакцины с ПЭИ увеличивает эффективность разработанной вакцины, что проявляется в замедлении опухолевой прогрессии и активации клеточного ответа, включающего цитотоксический Т-клеточный ответ и продукцию гамма-интерферона.

Ключевые слова: ДНК-вакцины, нейробластома, тирозингидроксилаза, иммуногенность, полиэтиленимин

Для цитирования: Полиэтиленимин усиливает иммуногенность ДНК-вакцины на основе гена тирозингидроксилазы в мышинной модели нейробластомы / М. В. Стёганцева [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2018. – Т. 15, № 3. – С. 323–330. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-3-323-330>

M. V. Stegantseva, V. A. Shinkevich, K. P. Vashkevich, T. M. Mikhaleuskaya, A. N. Meleshko

*Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
v. Borovliany, Minsk Region, Republic of Belarus*

POLYETHYLENIMINE INCREASES THE IMMUNOGENICITY OF DNA-VACCINE BASED ON THE THYROSINE HYDROXYLASE GENE IN THE MOUSE MODEL OF NEUROBLASTOMA

Abstract. Neuroblastoma is one of the most common solid tumors in children with a poor prognosis at the IV stage. A common marker of neuroblastoma is a high expression of tyrosine hydroxylase.

DNA vaccination is a concomitant method of treatment of oncological diseases that are characterized by a high probability of long-term remission and a risk of subsequent relapse.

We performed the DNA vaccination of A/J mice using a tyrosine hydroxylase (TH) design as a tumor antigen. Polyethylenimine was used as a synthetic carrier for vaccine delivery. It was shown that the conjugation of the developed vaccine with polyethylenimine increases the vaccine immunogenicity, which is manifested both in slowing the tumor progression and in activating the cellular immunity, including the cytotoxic T-cell response and the gamma-interferon production.

Keywords: DNA-vaccine, neuroblastoma, tyrosine hydroxylase, immunogenicity, polyethylenimine

For citation: Stegantseva M. V., Shinkevich V. A., Vashkevich K. P., Mikhaleuskaya T. M., Meleshko A. N. Polyethylenimine increases the immunogenicity of DNA-vaccine based on the tyrosine hydroxylase gene in the mouse model of neuroblastoma. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2018, vol. 15, no. 3, pp. 323–330 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-3-323-330>

Введение. Нейробластома (НБ) – наиболее часто встречаемая в детском возрасте солидная опухоль. Лечение НБ позволяет достичь ремиссии у ряда пациентов с I–III стадией, для лиц с IV стадией заболевания прогноз неблагоприятный [1].

Перспективным методом сопутствующей терапии онкологических заболеваний низкой и средней злокачественности, с высокой вероятностью длительной ремиссии и риском последующего рецидива является противоопухолевая ДНК-вакцинация, которая рассматривается в качестве дополнительного метода лечения, позволяющего снизить вероятность рецидива или образования метастазов [2].

Важным этапом при планировании вакцинации является выбор антигена, который и будет мишенью для иммунной системы. Для данного исследования была выбрана тирозингидроксилаза – фермент симпатической нервной системы, который превращает тирозин в диоксифенилаланин и регулирует скорость биосинтеза дофамина и норадреналина [3]. НБ происходит от симпатических нейроblastов, все случаи заболевания характеризуются высокой и стабильной экспрессией ТГ, независимо от стадии и N-Мус амплификации [4]. Продукция и метаболизм катехоламинов – установленный клинический маркер для диагностики и мониторинга пациентов с НБ [5]. Высокая экспрессия ТГ отсутствует во всех нормальных тканях и органах человека, кроме иммунопривилегированных органов (мозговое вещество надпочечников и центральная нервная система) [6]. Таким образом, ТГ оказывается подходящей мишенью для направленной иммунизации против НБ.

Известно, что введение низкоиммуногенного водного раствора плазмиды, кодирующей ген опухоль-ассоциированного антигена, может приводить к развитию иммунного ответа. Для увеличения иммуногенности ДНК-вакцин используют химические носители, способствующие стабилизации ДНК и увеличивающие эффективность трансфекции клеток. С этой целью применяют различные поликатиониды, сферообразующие полимеры, наночастицы [7]. Для доставки разработанной нами ДНК-вакцины использован линейный полиэтиленимин (ПЭИ) – катионный полимер с молекулярной массой 8 кДа.

Цель данного исследования – оценка иммуногенности ДНК-вакцины на основе гена тирозингидроксилазы на модели нейроblastомы у животных.

Материалы и методы исследования. *Дизайн и сборка ДНК-вакцины.* Ген ТГ мыши находится на 7-й хромосоме, включает 13 потенциальных экзонов. Согласно базе данных Ensembl, у мыши ген ТГ образует 6 транскриптов, из которых только 3 изоформы кодируют белки. Путем сравнительного анализа установлено, что для ТГ человека и мыши характерны высокая гомология белковой последовательности, а также ограниченное разнообразие белковых изоформ, из которых доминирует изоформа ТН-002, кодирующая полноразмерный транскрипт этого гена. Ее отличие от другой распространенной изоформы (ТН-001) является незначительным и заключается в отсутствии второго экзона.

Крайне важным фактором для иммуногенности вакцины является наличие в структуре антигена эпитопов для связывания с белками класса МНС-I. Для поиска эпитопов для белка ТГ мыши использовали онлайн-ресурс IEDB, а для поиска человеческого белка – онлайн-сервис NetCTL 1.2. Установлено, что количество потенциальных эпитопов ТГ с высокой аффинностью к белкам класса МНС-I мыши довольно велико, при этом обнаружены эпитопы, которые попадают в область максимально протяженной гомологии белков ТГ человека и мыши. Именно этот участок был выбран в качестве антигена и составил основу ДНК-конструкции (далее миниТГ).

В качестве исходного материала использованы надпочечники мыши линии BALB/c, полученные в стерильных условиях. Замороженные органы смешивали с 50 мкл RLT буфера (Qiagen, США) для предотвращения преждевременной деградации РНК в образце и растирали в ступке с жидким азотом до гомогенного состояния. К клеточной суспензии добавляли 1 мл TriReagent. РНК выделяли с помощью хлороформной преципитации. В синтез кДНК вносили 1 мкг РНК в конечном объеме 10 мкл. Реакционная смесь включала: 5×First Buffer (4 мкл), dNTP 2,5 мМ (1 мкл), Random Hexamer (1 мкл), RNase inhibitors (0,5 мкл), SuperScript III (1 мкл).

В качестве иммуностимулятора был выбран белок капсида вируса Х картофеля (PVXCP), который призван активировать врожденный иммунитет через паттерн-распознающие рецепторы и другие механизмы. Материалом для выделения вирусной РНК служили листья картофеля с характерными симптомами, вызываемыми этим вирусом. Собранные зараженные листья были перетерты в ступке с жидким азотом, 1 %-ным меркаптоэтанолом и смешаны с RLT буфером. Полученную кашицу с помощью шприца пропускали через бактериальный фильтр и использовали для очищения клеточного лизата.

Праймеры для амплификации подбирали с помощью программы Primer3Plus. Амплификацию проводили методом гнездовой ПЦР. ПЦР-реакция проводилась в объеме 25 мкл и включала 2,5 мкл 10×Buffer, 0,2 мкл 25 мМ dNTP, 1,5 мкл 25 мМ MgCl₂ (Promega Corporation, США), 0,15 мкл 5U PfxPol, по 5 мкл праймеров F/R 2,5 пмоль, 9,65 мкл H₂O.

Для рестрикции ПЦР-фрагментов, скрининга и проведения клонирования использовали рестриктазы BamHI, EcoRI, NotI, HindIII (Fast Digest, Thermo Scientific), в качестве векторов – плазмиды pTZ57R/T и pING. Трансформацию проводили кальций-холодовым методом. Выделение плазмидной ДНК осуществляли с помощью набора ChargeSwitch – Pro Plasmid mini kit (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию секвенирования проводили в объеме 10 мкл, используя 1 мкл Big Dye terminator v3.1 Buffer, 1 мкл BigDye, 4 мкл PrimerF/R, 3 мкл H₂O, 1 мкл ДНК. Протокол реакции: при 96 °С – 1 мин; при 96 °С – 10 с, при 50 °С – 5 с, при 60 °С – 4 мин (25 циклов). По результатам клонирования получена генетическая конструкция, представленная на рис. 1.

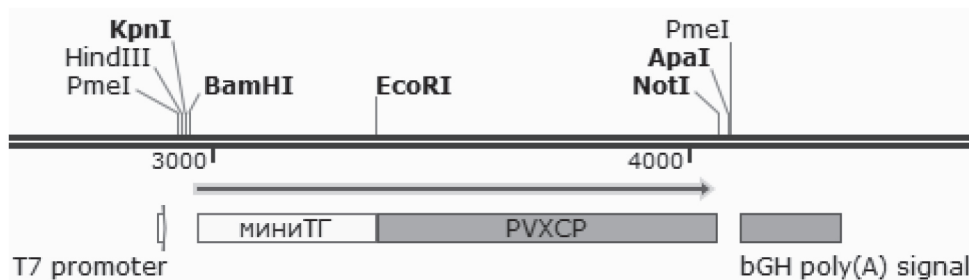


Рис. 1. Схема ДНК-вакцины на основе ТГ в векторе pING

Fig.1. Scheme of a DNA-vaccine based on the tyrosine hydroxylase in the vector pING

Клеточные линии, мыши. Для моделирования опухоли использовали клеточную линию мышиной нейробластомы NB41A3. Клетки культивировали в среде F10 с содержанием 10 % ЭТС, 1 % пенициллина/стрептомицина, 1 % L-глутамина. Данная линия не метастазирует, поэтому поиск удаленных метастазов не проводили. Объектом исследования являлись 53 мыши линии A/J – 16 самцов и 37 самок в возрасте 8–10 недель. Мышам ($n = 36$) прививали клетки NB41A3 в количестве 1 млн в объеме 100 мкл. На 5, 10 и 15-е сутки после прививки опухоли внутримышечно вводили ДНК-вакцину pING-миниТГ-PVXCP в водном растворе и в комплексе с линейным ПЭИ молекулярной массой 8 кДа в массовом соотношении 6:1 (соотношение N/P – 13.3) или пустой вектор pING (далее группа плацебо) в количестве 50 мкг в объеме 100 мкл. Для оценки безопасности вакцины группу здоровых мышей ($n = 8$) вакцинировали по указанной выше схеме с водным раствором плазмидной ДНК. Контрольная группа здоровых животных включала 9 мышей. Выведение животных из эксперимента осуществляли по показаниям, а при их отсутствии – по истечении 2-месячного периода мониторинга.

Цитотоксический тест. В стерильных условиях селезенку мышей изымали, гомогенизировали и пропускали через фильтр 40 мкм. Спленциты инкубировали в RPMI с содержанием 10 % ЭТС, 1 % пенициллина/стрептомицина, 1 % глутамина, 50 мкМ бета-меркаптоэтанола, 100 МЕ/мл ИЛ-2, при этом клетки-мишени NB41A3 облучали рентгеновскими лучами в течение 1–2 сут для рестимуляции. Соотношение эффекторы:мишени составляло 100:1, 30:1, 10:1. После рестимуляции к клеточной суспензии добавляли NB41A3, окрашенные красителем CFSE, и инкубировали 18 ч. Затем все клетки окрашивали витальным красителем пропидиум йодидом и инкубировали не более 5 мин. Анализ проводили в триплетах. Процент лизиса клеток-мишеней определяли методом проточной цитофлуориметрии на анализаторе FC500 (Becton Dickinson, США).

Иммуноферментный анализ. Кровь собирали на 30-е и 60-е сутки после иммунизации на момент эвтаназии. Сыворотку хранили при –80 °С. 96-луночный планшет (Grainer Bio-One, США) покрывали белком PVXCP в объеме 100 мкл и инкубировали в течение ночи. Планшет отмывали раствором PBS-0,05 % Tween. Сыворотку тестировали в разведениях 1:100 и 1:500. Антитела, связавшиеся с иммобилизованным антигеном, детектировали с помощью козьих антимышинных IgG антител, меченных пероксидазой. В качестве стоп-реагента использовали раствор тетраметилбензидина. Экспериментальные и контрольные образцы ставили в дублях.

ELISPOT. Интенсивность продукции мышинового гамма-интерферона (ИФН γ) определяли методом ELISPOT с помощью набора BD™ ELISPOT mouse IFN- γ ELISPOT Set (BD Biosciences, США). Анализ проводили в триплетах. В качестве положительного контроля использовали фитогемагглютинин (конечная концентрация 5 мкг/мл). Конечная концентрация антигена PVXCP составила 10 мкг/мл. Анализ проводили в триплете. Спленциты брали в количестве 300 тыс. на лунку. Результаты детектировали с помощью CTL ImmunoSpot® S5 UV Analyzer (C.T.L., США). Данные представлены в виде отношения количества пятен экспериментального образца к контролю.

Статистический анализ. Статистический анализ данных проводили на базе программы Statistica 7.0 и R Graphics Device 3 Active. Различия между группами оценивали по Манну–Уитни, а для определения динамики роста опухоли использовали критерий Тьюки с поправкой Хольма.

Результаты и их обсуждение. *Переносимость ДНК-вакцинации животными.* Проведена инъекция мышам плазмидной ДНК (50 мкг) в водном растворе и в комплексе с ПЭИ в соотношении 1:6. Объем инъекции составил 100 мкл. По результатам морфологического анализа гематомы, нарушения целостности мышечной ткани, а также воспалительной инфильтрации в месте инъекции не обнаружены. Поведенческих нарушений, местных и системных побочных эффектов, вызванных препаратом вакцины, не выявлено. При введении вакцины, конъюгированной с ПЭИ, наблюдалась незначительная нейтропения.

Динамика опухолевой прогрессии. Первую вакцинацию после прививки опухоли (0-е сутки) проводили на 5-е сутки независимо от наличия пальпируемого очага опухоли (рис. 2). Первые признаки роста опухоли с доступным для измерения первичным очагом появлялись на 13–17-е сутки.



Рис. 2. Схема вакцинации. ИО – иммунный ответ

Fig. 2. Vaccination schedule. ИО – immune response

На момент завершения эксперимента после инъекции опухолевых клеток в группе плацебо опухоль не прижилась у 1 (10 %) из 10 мышей; в группе, получавшей водный раствор вакцины, – у 5 (33,3 %) из 15; в группе, получавшей препарат, комплексированный с ПЭИ, – у 7 (63,6 %) из 11 мышей. Эти результаты указывают, что у ряда вакцинированных животных иммунный ответ вызвал отторжение опухолевых клеток до формирования опухолевого узла. После приживания опухоли развитие иммунного ответа подавляло рост опухоли, в результате чего скорость прогрессии последней у вакцинированных мышей была значительно меньше, чем в группе плацебо ($p < 0,05$) (рис. 3).

В группе мышей, получавших препарат вакцины с ПЭИ, наблюдалась самая низкая скорость прогрессии опухоли по сравнению с группой плацебо ($p = 0,0015$). Промежуточное положение занимала группа животных, получавших водный раствор вакцины. В связи с тем что неконъюгированная плаزمиды не защищена от внешних воздействий, большая ее часть разрушалась в межклеточном пространстве, так и не достигнув транскрипционного аппарата клетки. Тем не менее, скорость прогрессии опухоли у животных данной группы была достоверно ниже, чем в группе плацебо ($p = 0,03$).

Уровень анти-PVXCP антител. Во всех исследуемых группах титр анти-PVXCP антител был выше, чем в контрольной группе (медиана – 1), но различия не достоверны (рис. 4). Максимальный уровень антител зафиксирован у мышей после противоопухолевой вакцинации как в виде водного раствора (медиана – 1,53), так и в комплексе с ПЭИ (медиана – 1,47; $p > 0,05$). Титр антител в группе плацебо характеризовался достаточно широким диапазоном значений, при этом большинство из них находилось на уровне контроля (медиана – 0,7).

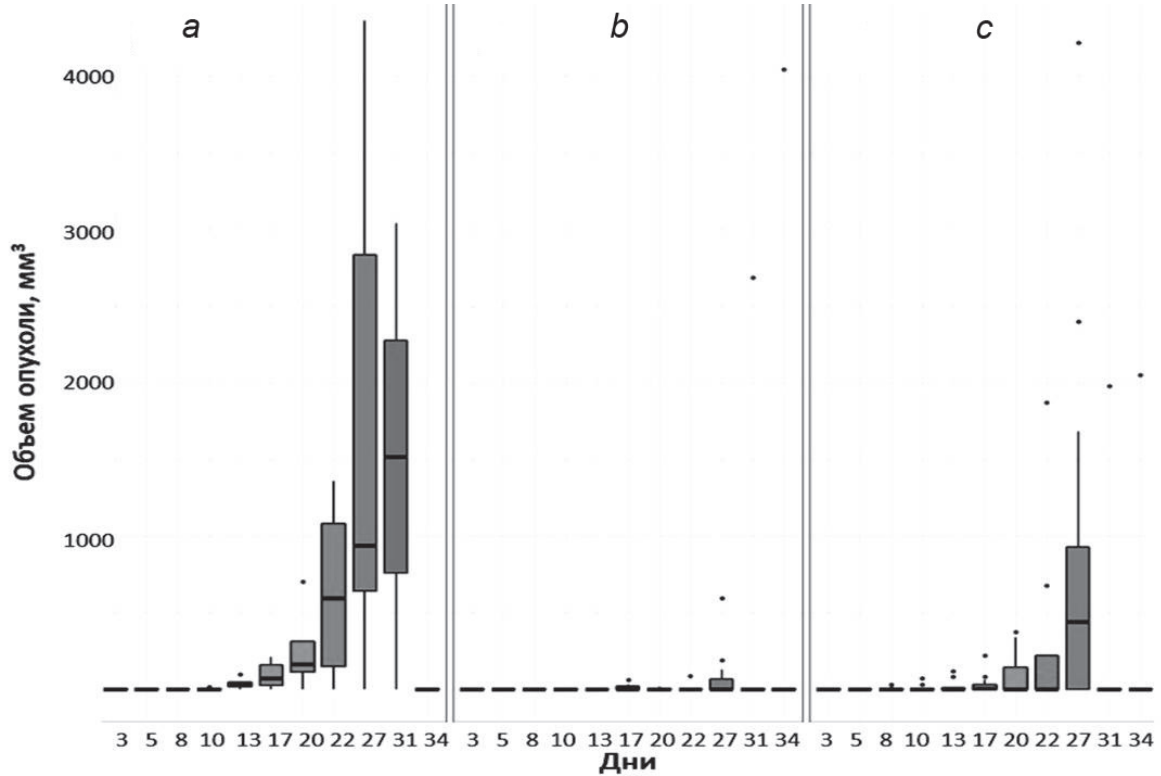


Рис. 3. Динамика роста опухоли в группах: *a* – плацебо, *b* – pING-миниТГ-PVXCP в комплексе с ПЭИ, *c* – водный раствор pING-миниТГ-PVXCP

Fig. 3. Dynamics of a tumor growth in groups: *a* – placebo, *b* – pING-miniTH-PVXCP conjugated with polyethylenimine, *c* – water solution of pING-miniTH-PVXCP

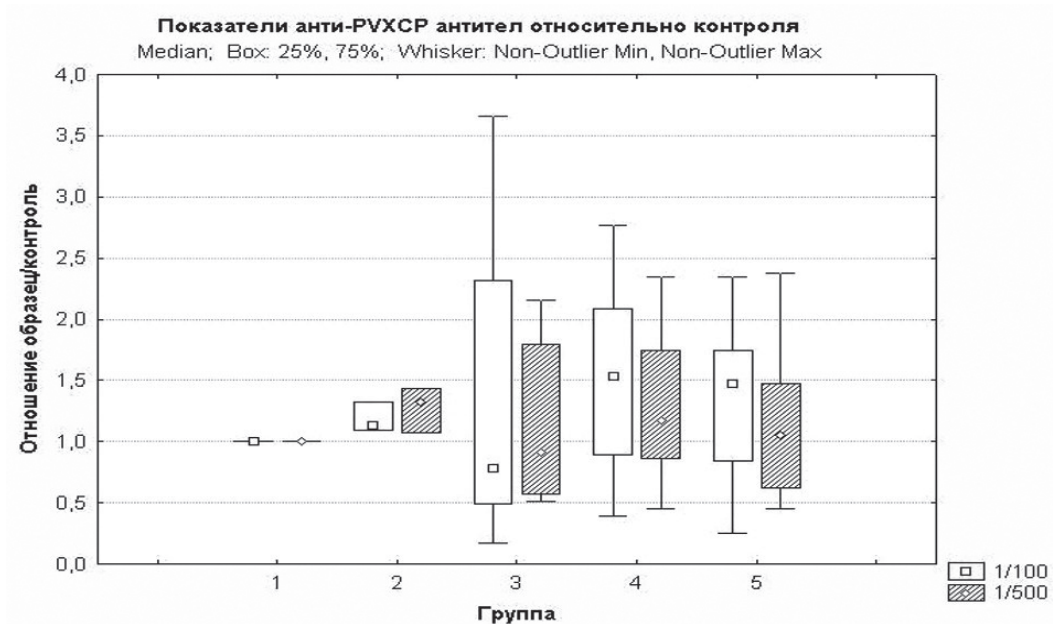


Рис. 4. Уровень анти-PVXCP антител в группах: 1 – здоровые мыши, 2 – здоровые вакцинированные мыши, 3 – плацебо (пустой вектор pING), 4 – pING-миниТГ-PVXCP водный раствор, 5 – pING-миниТГ-PVXCP + ПЭИ, * – $p < 0,01$

Fig. 4. Level of anti-PVXCP antibody in groups: 1 – healthy mice, 2 – healthy vaccinated mice, 3 – placebo (empty vector pING), 4 – water solution of pING-miniTH-PVXCP, 5 – pING-miniTH-PVXCP + polyethylenimine, * – $p < 0.01$

Иммунный ответ оценивали в промежутке от 30 до 60 сут после вакцинации животных. В связи с этим проведен сравнительный анализ титра антител у мышей, выведенных из эксперимента до 30-х суток включительно и ближе к 60-м суткам. По результатам сравнительного анализа титр антител ближе к 60-м суткам был выше, чем до 30-х суток (медиана – 1,67 против 1,31 для водного раствора вакцины и 1,45 против 1,05 для вакцины с ПЭИ, $p > 0,05$).

Цитотоксическая активность CD8⁺ Т-лимфоцитов. Специфическая цитотоксическая активность по отношению к клеткам-мишеням NB41A3 во всех исследуемых группах была выше, чем в контроле (рис. 5). В группе, которая получала водный раствор вакцины, процент лизиса незначительно выше, чем в группе плацебо (медиана составила 23,1 и 17,6 % соответственно, $p > 0,05$), что свидетельствует о низкой иммуногенности водного раствора.

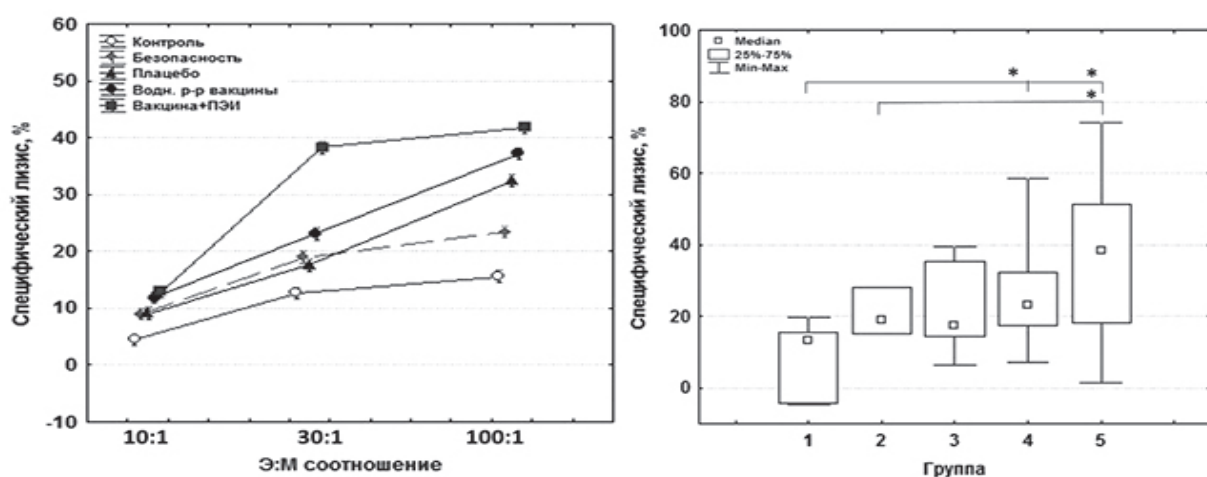


Рис. 5. Специфическая цитотоксическая активность спленоцитов: слева – динамика цитотоксической активности, справа – специфический лизис мишени при соотношении 30:1, Э:М – эффекторы:мишени, 1 – здоровые мыши, 2 – здоровые вакцинированные мыши, 3 – плацебо (пустой вектор pING), 4 – pING-миниТГ-PVXCP водный раствор, 5 – pING-миниТГ-PVXCP + ПЭИ, * – $p < 0,01$

Fig. 5. Specific cytotoxic activity of splenocytes: left side – dynamics of the cytotoxic activity, right side – specific lysis of target cells in the ratio of 30:1, E:T – effectors: targets, 1 – healthy mice, 2 – healthy vaccinated mice, 3 – placebo (empty vector pING), 4 – water solution of pING-miniTH-PVXCP, 5 – pING-miniTH-PVXCP + polyethylenimine, * – $p < 0.01$

Самая высокая активность CD8⁺ Т-лимфоцитов по отношению к NB41A3 зафиксирована в группе, получавшей препарат вакцины pING-миниТГ-PVXCP в комплексе с ПЭИ (медиана – 38,3 % против 13,4 % у здоровых мышей, $p < 0,05$). ПЭИ способен предохранять плазмидную ДНК от разрушительного действия экзо- и эндонуклеаз, а также облегчает эндоцитоз конструкции через отрицательно заряженную липидную мембрану клетки.

Также следует отметить, что специфическая анти-NB41A3 активность спленоцитов в группе здоровых вакцинированных животных была выше, чем у здоровых мышей, почти в 2 раза (медиана составила 23,4 % против 13,4 %, $p > 0,05$). Таким образом, показано, что ДНК-вакцинация индуцирует развитие клеточного иммунитета.

Продукция гамма-интерферона Т-лимфоцитами. Методом ELISPOT оценивали совокупную продукцию ИФН γ CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами. Самая высокая активность в отношении продукции ИФН γ наблюдалась в группе мышей, вакцинированных плазмидой в комплексе с ПЭИ (медиана в 3 раза выше, чем в группе плацебо, $p = 0,12$) (рис. 6). Во всех остальных группах полученные показатели были сопоставимы и/или достоверно не отличались друг от друга. Примечательно, что ДНК-вакцинация в отсутствие опухолевых клеток не вызывала индукции интерферона.

Таким образом, возможность индукции эффективного иммунного ответа с помощью ДНК-вакцины против нейробластомы выражается в достоверном замедлении роста опухоли и измеряемом уровне иммунного ответа.

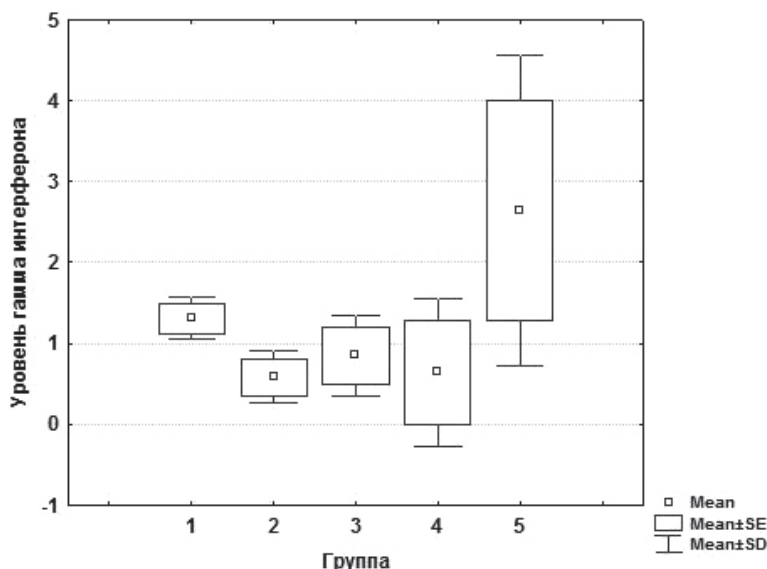


Рис. 6. Продукция гамма-интерферона Т-лимфоцитами в группах: 1 – здоровые мыши, 2 – здоровые вакцинированные мыши, 3 – плацебо, 4 – pING-миниТН-PVXCP водный раствор, 5 – pING-миниТН-PVXCP + ПЭИ

Fig. 6. Gamma-interferon production by T-lymphocytes in groups: 1 – healthy mice, 2 – healthy vaccinated mice, 3 – placebo (empty vector pING), 4 – water solution of pING-miniTH-PVXCP, 5 – pING-miniTH-PVXCP + polyethylenimine, * – $p < 0.01$

Выводы

1. Конъюгирование ДНК с синтетическим носителем ПЭИ значительно усиливает противоопухолевый иммунный ответ у мышей с привитой опухолью.

2. Иммунный ответ у мышей на конъюгат ДНК-вакцины с ПЭИ характеризуется слабой индукцией антителообразования и относительно высокой индукцией цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов, а также CD4+ Т-хэлперов первого типа и CD8+ Т-лимфоцитов, продуцирующих гамма-интерферон.

3. Более выраженный Т-клеточный иммунный ответ у мышей с привитой опухолью на конъюгат вакцины указывает на наличие бустерного эффекта вакцинации на иммунную систему мышей в отношении опухоли-ассоциированных антигенов.

Показанная нами принципиальная возможность терапевтической иммунизации против нейробластомы с ДНК-вакциной требует дальнейших доклинических экспериментальных исследований, направленных на усиление терапевтического эффекта, в том числе за счет использования разных антигенов и совершенствования способов доставки ДНК-вакцины.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

- Cheung, N.-K. V. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy / N.-K. Cheung, M. A. Dyer // Nature Rev. Cancer. – 2013. – Vol. 13, N 6. – P. 397–411. <https://doi.org/10.1038/nrc3526>
- Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer / J. A. Berzofsky [et al.] // J. of Clinical Investigation. – 2004. – Vol. 113, N 11. – P. 1515–1525. <https://doi.org/10.1172/JCI200421926>
- Тирозингидроксилаза мозга и ее регуляция глюкокортикоидами / Е. В. Сухарева [др.] // Вавилов. журн. генетики и селекции. – 2016. – Т. 20, № 2. – С. 212–219.
- Neuroblastoma initially presenting as a primary bone tumor: diagnostic value of molecular assays for tyrosine hydroxylase / M. J. Robles-Frías [et al.] // Med. Pediatr. Oncol. – 2003. – Vol. 40, N 3. – P. 167–170. <https://doi.org/10.1002/mpo.10119>
- A rationally designed tyrosine hydroxylase DNA vaccine induces specific antineuroblastoma immunity / N. Huebener [et al.] // Mol. Cancer Ther. – 2008. – Vol. 7, N 7. – P. 2241–2251. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0109>
- Tissue expression of TH [Electronic resource]. – Mode of access : <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000180176-TH/tissue>. – Date of access : 15.08.2017.
- Synthetic vehicles for DNA vaccination / J. H. van den Berg [et al.] // J. Drug Target. – 2010. – Vol. 18, N 1. – P. 1–14. <https://doi.org/10.3109/10611860903278023>

References

1. Cheung N.-K. V., Dyaer M. A. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 2013, vol. 13, no. 6, pp. 397–411. <https://doi.org/10.1038/nrc3526>
2. Berzofsky J. A., Tereba M., Oh S., Belyakov I. M., Ahlers J. D., Janik J. E., Morris J. C. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *Journal of Clinical Investigations*, 2004, vol. 113, no. 11, pp. 1515–1525. <https://doi.org/10.1172/JCI200421926>
3. Sukhareva E. V., Kalinina T. S., Bulygina V. V., Dygalo N. N. Tyrosine hydroxylase of the brain and its regulation by glucocorticoids. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii = Vavilov Journal of genetics and breeding*, 2016, vol. 20, no. 2, pp. 212–219 (in Russian).
4. Robles-Frías M., Segura D. I., Márquez C., Quiroga E., Álvarez A. M., Sáez C. Neuroblastoma initially presenting as a primary bone tumor: diagnostic value of molecular assays for tyrosine hydroxylase. *Medical and Pediatric Oncology*, 2003, vol. 40, no. 3, pp. 167–170. <https://doi.org/10.1002/mpo.10119>
5. Huebener N., Fest S., Strandsby A., Michalsky E., Preissner R., Zeng Y., Gaedicke G., Lode H. N. A rationally designed tyrosine hydroxylase DNA vaccine induces specific antineuroblastoma immunity. *Molecular Cancer Therapy*, 2008, vol. 7, no. 7, pp. 2241–2251. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0109>
6. *Tissue expression of TH*. Available at: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000180176-TH/tissue> (accessed 15.08.2017).
7. Van den Berg J. H., Nuijten B., Schumacher T. N., Haanen J. B. A. G., Storm G., Beijnen J. H., Hennink W. E. Synthetic vehicles for DNA vaccination. *Journal of Drug Targeting*, 2010, vol. 18, no. 1, pp. 1–14. <https://doi.org/10.3109/10611860903278023>

Информация об авторах

Стёганцева Мария Владимировна – магистр биол. наук, науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь). E-mail: stegantsevam@gmail.com

Шинкевич Вероника Александровна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь). E-mail: veroni.shinkevich@gmail.com

Вашкевич Екатерина Петровна – ст. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь). E-mail: katsiaryna.vashkevich@gmail.com

Михалевская Таисия Михайловна – патоморфолог. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь). E-mail: aisiat@tut.by

Мелешко Александр Николаевич – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь). E-mail: meleshko@tut.by

Information about the authors

Maria V. Stegantseva – Master of Biological Sciences, Researcher. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Borovliany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: stegantsevam@gmail.com

Veronika A. Shinkevich – Junior researcher. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Borovliany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: veroni.shinkevich@gmail.com

Katsiaryna P. Vashkevich – Senior researcher. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Borovliany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: katsiaryna.vashkevich@gmail.com

Taisiya M. Mikhaleuskaya – Pathomorphologist. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Borovliany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: aisiat@tut.by

Alexander N. Meleshko – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., v. Borovliany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: meleshko@tut.by