

**федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
имени Н.Н.Блохина»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*на правах рукописи*

**ТАБАКОВ ДМИТРИЙ ВЯЧЕСЛАВОВИЧ**

**ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК  
ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**

14.01.12 — Онкология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук

**Заботина Татьяна Николаевна**

Москва — 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	10
1.1. Натуральные киллеры.....	12
1.1.1 Характеристика натуральных киллеров .....	12
1.1.2 Механизм цитотоксичности НК-клеток .....	14
1.1.2.1 Распознавание клеток-мишеней НК-клетками .....	14
1.1.2.2 Формирование иммунологического синапса .....	16
1.1.2.3 Роль перфорина и Fas-L в цитотоксичности НК-лимфоцитов.....	17
1.2 Т-лимфоциты .....	19
1.2.1 Субпопуляции Т-клеток .....	21
1.2.2 Цитотоксические Т-лимфоциты .....	21
1.2.3 Цитотоксический ответ эффекторных Т-лимфоцитов.....	24
1.2.4 Fas-зависимый цитолиз.....	28
1.2.5 Роль цитотоксических Т-лимфоцитов при онкологических заболеваниях ....	29
1.3 НКТ - лимфоциты .....	33
1.3.1 Субпопуляции НКТ-клеток.....	36
ГЛАВА 2.МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	42
2.1. Используемые материалы .....	42
2.2. Доноры и онкологические больные .....	43
2.1. Прямая реакция флуоресценции.....	43
2.2. Исследование цитотоксического потенциала клеток-эффекторов .....	44
2.3 Метод проточной цитометрии .....	45
2.4 Статистическая обработка результатов .....	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	50
3.1 Субпопуляционное соотношение CD45+лимфоидных клеток здоровых доноров и онкологических больных .....	50

3.2 Субпопуляционное соотношение CD45+лимфоидных клеток с высокой и низкой плотностью поверхностного антигена CD8 у здоровых доноров и онкологических больных.....	59
3.3 Субпопуляционное соотношение CD45+лимфоидных клеток с экспрессией поверхностного антигена CD16 у здоровых доноров и онкологических больных	62
3.4 Коэкспрессия CD8, CD16 и CD3 на лимфоидных CD45+ клетках у здоровых доноров и онкологических больных .....	62
3.5 Субпопуляционное содержание внутриклеточного перфорина в CD45+CD8+high, CD45+CD8+low, CD45+CD16+high, CD45+CD16+low, CD45+CD8+CD16+ клетках здоровых доноров и онкологических больных .....	67
3.6 Сравнение субпопуляционной структуры эффекторных лимфоцитов доноров и онкологических больных с различными стадиями опухолевого процесса .....	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	81
ВЫВОДЫ .....	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	108

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность проблемы и степень ее разработанности**

Успехи в лечении онкологических больных зависят от уровня и точности диагностических мероприятий, в том числе от результатов клинико-лабораторных исследований. Методом предпочтения в научной и практической работе клинико-иммунологической лаборатории сегодня является проточная цитометрия, которая позволяет проводить многопараметровые количественные исследования на уровне «единственной клетки» в пределах многоклеточного организма.

Разработка и создание широкого спектра высокоспецифичных иммунодиагностических зондов и тест-систем на основе моноклональных антител, конъюгированных различными флуорофорами, а так же усовершенствование технических характеристик проточных цитометров в сочетании с возможностями программного обеспечения и цифровой обработки данных, послужили толчком для проведения мультипараметрического субпопуляционного анализа клеток иммунной системы.

До недавнего времени, изучение структуры клеточного звена иммунитета проводилось с применением однопараметрового анализа поверхностных антигенов цитоплазматической мембраны. Однако, согласно современным представлениям, отличительной особенностью клеток иммунной системы является их фенотипическая гетерогенность. Оказалось, что для большинства иммунокомпетентных клеток, участвующих в генерации как специфического, так и неспецифического иммунного ответа, не существует единичного специфического белка-маркера, а их идентификация возможна только при одновременном изучении коэкспрессии антигенов с применением стратегии последовательного гейтирования белок-специфических клеток.

Например, установлено, что поверхностный антиген CD8 не является строго специфичным для цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) и представлен не только на ЦТЛ, но и на Т-лимфоцитах с супрессорной активностью. Известно так же, что CD8 экспрессируют не только эти субпопуляции лимфоцитов, но и отдельные клоны других клеток: макрофаги, тучные клетки, дендритные клетки, а также

натуральные киллеры (NK-клетки). Не существует также единственного белка, характерного для NK-клеток и для фенотипической идентификации этих клеток требуется наличие целого ряда дополнительных маркеров.

При столь высокой степени фенотипической гетерогенности, тем не менее, основные механизмы цитотоксического действия ЦТЛ и NK-клеток сходны и реализуются путем экзоцитоза литических гранул, в частности, перфорина и гранзимов, с последующим осмотическим «взрывом» и гибелью клеток мишеней. Известно, что действие тандема этих молекул необратимо. Функционирование цитотоксических эффекторных Т-лимфоцитов является антигенспецифическим, в то время как, NK клетки не обладают иммунологической памятью, и проявление их функциональной активности не связано с антигенами главного комплекса гистосовместимости МНС. Более того, обнаружено, что и CD8 лимфоциты, и NK-клетки, в зависимости от количества белка или степени (плотности) экспрессии антигенов на мембране, наличия на поверхности клеток ко-стимулирующих, адгезивных молекул и многих других факторов, способны к реализации различной функциональной активности [114].

Известно, что эффекторное звено клеточного иммунитета является одним из важнейших компонентов противоопухолевой защиты при солидных новообразованиях, что делает планируемое изучение структурной и функциональной гетерогенности субпопуляций клеток-эффекторов периферической крови в норме и у онкологических больных с различными локализациями актуальным и при этом высокотехнологичным исследованием.

### **Цель исследования**

Цель работы – выявить фенотипическую гетерогенность, опосредующую функциональную активность эффекторных клеток у здоровых доноров и онкологических больных.

### **Задачи исследования**

1. Изучить субпопуляционное соотношение CD45+лимфоидных клеток с высокой и низкой плотностью поверхностного антигена CD8 у здоровых доноров и онкологических больных.
2. Изучить субпопуляционное соотношение CD45+лимфоидных клеток с высокой и низкой плотностью поверхностного антигена CD16 у здоровых доноров и онкологических больных.
3. Определить коэкспрессию CD8, CD16 и CD3 на лимфоидных CD45+ клетках у здоровых доноров и онкологических больных.
4. Изучить цитотоксический потенциал эффекторных лимфоцитов с различной плотностью поверхностных антигенов CD8 и CD16 по оценке уровня внутриклеточного перфорины у доноров и онкологических больных.
5. Выявить особенности популяционной и субпопуляционной структуры эффекторных клеток у онкологических больных различных нозологических форм (рак яичников, рак молочной железы, рак слизистой оболочки полости рта, меланома).

### **Научная новизна**

Впервые подробно описана фенотипическая и функциональная гетерогенность эффекторных иммунокомпетентных клеток у здоровых доноров и онкологических больных, что делает эту работу базовой для дальнейших исследований субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток.

### **Практическая и теоретическая значимость**

Полученные знания о субпопуляционной структуре, особенностях иммунофенотипа и функциональной активности эффекторных клеток иммунной системы при различных нозологиях позволяют установить направление генерации иммунных реакций у больных онкологическими заболеваниями. Оценены отличия структуры эффекторных субпопуляций онкологических больных и доноров, так и между больными с различными нозологическими формами

опухолей. Выяснение баланса иммунокомпетентных клеток, контролирующих процессы активации и/или супрессии, в сочетании с клинико-патологическими данными послужит основой для определения прогностических факторов клинического течения заболевания и противоопухолевого контроля заболевания.

### **Методология и методы исследования**

Исследованы образцы периферической крови 389 больных, находившихся на обследовании и лечении в НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, среди них 91 больной первично-операбельным раком яичника (РЯ), 82 – диссеминированной меланомой, 72 – первично-операбельным раком слизистой оболочки полости рта (РСОПР) и 144 – первично-операбельным раком молочной железы (РМЖ). Средний возраст пациентов составил 52,9. Группы онкологических больных раком молочной железы и раком яичников составили женщины со средним возрастом 56,7 и 51,1 соответственно. Среди пациентов, страдающих раком слизистой полости рта, было 39 женщин (54,1%) и 33 мужчины (45,9%). Средний возраст составил 54,8. В группе больных меланомой средний возраст равнялся 49,3, количество женщин составило 50 (60,9%), а мужчин – 32 (39,1%). Большинство пациентов имело T1-T3 стадии опухолевого роста. Контрольную группу составили 64 практически здоровых донора. Кровь забирали из локтевой вены натощак, в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА.

Выделение мононуклеарных клеток осуществляли стандартным методом разделения на градиенте плотности фиколла-верографина (1,077г/см). Окрашивание выделенных клеток проводили методом реакции прямой иммунофлуоресценции, для чего использовались моноклональные антитела производства Beckman Coulter и BD Biosciences (США). Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови больных онкологическими заболеваниями и здоровых доноров проводили методом многопараметрового цитометрического анализа. В работе использовали двухлазерный пятипараметровый проточный цитометр аналитического типа FACS Calibur BD Biosciences (США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистических программ «Статистика» на персональном компьютере. Данные анамнеза, клинических проявлений, местного статуса, лабораторных иммунологических исследований, операций, а также цитологических и гистологических заключений для каждого пациента были внесены в специально разработанную базу, на основе которой проводился анализ полученного материала и результатов.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Фенотипические, функциональные характеристики клеток адаптивного и приобретенного иммунитета, их субпопуляционная структура, сильно варьируют у онкологических больных.

2. У онкологических больных выявлен широкий диапазон значений  $CD8^+$  лимфоцитов от 7% до 60%, при этом для большинства (>45%) пациентов каждой нозологической формы характерны повышенные уровни маркера, 20-40% пациентов – нормальные значения. Установлено, что высокая плотность антигена CD8 характерна для  $CD3^+CD8^+$  ЦТЛ, низкая плотность CD8 – для НК-клеток.  $CD3^+CD16^+CD56^+$  NKT-лимфоциты экспрессируют CD8 как с высокой, так и низкой плотностью.

3. НК-лимфоциты экспрессируют антиген CD16 со средней и низкой плотностью и характеризуются фенотипом  $CD3^-CD16^{ow}$ . NKT-лимфоциты экспрессируют CD16 с низкой плотностью и представлены фенотипом  $CD3^+CD16^{low}$ . У больных раком молочной железы выявлено повышенное процентное содержание  $CD3^+CD16^+$  NKT-лимфоцитов. Для больных раком яичников характерно повышение  $CD3^-CD16^{low}$  НК-клеток.

4. У онкологических больных всех нозологических форм с высокими уровнями маркера CD8 повышено число  $CD8^+CD16^+$  клеток за счет увеличения содержания НК- и/или  $CD3^+CD8^{high}CD16^{low}$  NKT-клеток (до 20%  $CD3^+$  лимфоцитов).



5. У онкологических больных выявлено наличие перфорин-содержащей популяции  $CD8^{low}$  лимфоцитов (7,7 (5,4; 12)%), отсутствующей у здоровых лиц.

6. Для онкологических больных с высоким уровнем  $CD8$ -клеток характерно повышение медианы значений ЦТЛ и НКТ-лимфоцитов по сравнению с показателями здоровых лиц.

7. Для онкологических больных с нормальным уровнем  $CD8^+$  лимфоцитов установлено снижение медианы количества ЦТЛ. Количество НК и НКТ-лимфоцитов соответствует показателям здоровых лиц.

8. Для онкологических больных с пониженным уровнем  $CD8^+$  клеток показано резкое уменьшение медианы количества ЦТЛ. Количество НК-клеток в данной группе соответствует показателям здоровых доноров (число НКТ-лимфоцитов снижено).

9. Для онкологических больных с высоким уровнем  $CD8$ -клеток выявлены статистически достоверные повышенные значения  $CD8^+Perforin^+$  клеток. При нормальном содержании  $CD8^+$  лимфоцитов количество перфорин-содержащих  $CD8^+Perforin^+$  клеток снижено или соответствует показателям здоровых. У больных с низким уровнем  $CD8^+$  клеток количество  $CD8^+Perforin^+$  лимфоцитов резко снижено по сравнению с донорами.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

При проведении исследований использовано сертифицированное современное оборудование. Для иммунофенотипического анализа применялись антитела, предназначенные для клинических исследований с помощью проточной цитометрии. Методами статистической обработки установлена воспроизводимость и правильность результатов исследований, что позволяет считать их статистически значимыми. Полученные данные были изложены в трех статьях, пяти тезисах, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК, и представлены на конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» в 2016 году. Полученная в результате исследования информация используется в работе лаборатории.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Образование злокачественных клеток происходит в организме человека непрерывно, но они своевременно распознаются и уничтожаются иммунной системой. Концепция иммунного надзора включает в себя три фазы, названные фазами элиминации, равновесия и выхода из-под надзора [66]. Фаза элиминации представляет собой состояние, при котором иммунная система обнаруживает и уничтожает опухолевые клетки, развивающиеся как сбой клеточных механизмов апоптоза и пролиферации. Фаза элиминации может быть полной, когда все опухолевые клетки уничтожены, или частичной, когда уничтожена только часть. В случае частичного уничтожения наступает временная фаза равновесия между иммунной системой и развивающейся опухолью. В течение этого периода предполагается, что опухолевые клетки либо остаются бездействующими, либо продолжают развиваться, накапливая дальнейшие изменения (такие как мутации ДНК или изменения в экспрессии генов), которые могут модулировать опухолеспецифические антигены и индуцированные стрессом антигены, которые они экспрессируют. По мере продолжения этого процесса иммунная система оказывает избирательное давление, если это возможно, путем уничтожения чувствительных клонов опухоли. Воздействие, оказываемое иммунной системой во время этой фазы, является достаточным для контроля прогрессирования опухоли, но в конечном итоге, если иммунный ответ все еще не полностью устраняет опухоль, процесс приводит к выбору вариантов опухолевых клеток, которые способны противостоять, избегать, или подавлять противоопухолевый иммунный ответ, приводя к выходу из-под иммунологического надзора. На этом этапе иммунная система больше не может сдерживать опухолевый рост, а прогрессивно растущая опухоль с помощью различных механизмов подавляет ее активность [104]. Одним из важнейших компонентов противоопухолевой защиты при солидных новообразованиях является эффекторное звено клеточного иммунитета [13]. К нему относятся НК-лимфоциты, цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) и НКТ-клетки. НК-лимфоциты представляют собой первую линию защиты человека против опухоли. Было подтверждено, что отсутствие

иммуногенности опухоли - это следствие неспособности иммунной системы к активации, что является более частой причиной развития онкологии, чем отсутствие опухолевых антигенов [224]. Роль адаптивной иммунной системы в подавлении роста опухоли была выявлена, когда было показано, что у 129 / Sv RAG2-дефицитных мышей, у которых отсутствуют как В, так и Т-клетки, развивается спонтанная аденокарцинома кишечника и легкого (35% и 15%, соответственно среди всех анализируемых мышей) в возрасте 15-16 месяцев, а еще у 50% мышей развиваются аденомы кишечника. Интересно отметить, что, когда мыши Rag2 - / - также были дефицитными по STAT1, важному медиатору сигнализации, активирующемуся IFN типа I и II типа, частота опухолей еще больше увеличивается, а спектр опухолей расширяется, включая аденокарциномы молочной железы (~ 40% Мышей), аденокарциномы толстой кишки (~ 10% мышей) или оба заболевания (~ 20% мышей) [196]. Вместе эти результаты показывают, что как врожденное, так и адаптивное звено иммунной системы вовлечены в профилактику опухолей, поскольку мыши, у которых отсутствуют как сигналы IFN, так и адаптивная иммунная система, развивают более широкий спектр опухолей, чем мыши, у которых отсутствует только адаптивная иммунная система.

В ходе развития методов исследования оказалось, что данные популяции гетерогенны, и в свою очередь, разделяются на несколько субпопуляций, способные выполнять как эффекторные, так и регуляторные функции. Обнаружено, что и CD8 Т-лимфоциты, и NK-клетки, в зависимости от количества белка или степени (плотности) экспрессии антигенов на мембране, наличия на поверхности клеток ко-стимулирующих, адгезивных молекул и многих других факторов, способны к реализации различной функциональной активности [56]. Нарушения баланса между этими субпопуляциями происходит при многих заболеваниях, в том числе онкологических.

Таким образом, планируемое изучение структурной и функциональной гетерогенности субпопуляций клеток-эффекторов периферической крови в норме

и у онкологических больных с различными локализациями актуальным и при этом высокотехнологичным исследованием.

## **1.1. Натуральные киллеры**

### **1.1.1 Характеристика натуральных киллеров**

НК-клетки являются важной частью врожденного иммунитета и представляют собой большие гранулярные лимфоциты. Одной из наиболее важных их функций является способность распознавать и уничтожать опухолевые клетки, постоянно образующиеся в организме [185], при этом регулируя активность адаптивного звена иммунитета путем секреции цитокинов [230], что делает их первой линией противоопухолевой защиты человека. Отличительной характеристикой НК-лимфоцитов является их способность к активации без предварительной стимуляции антигеном [122]. Классический фенотип НК-клеток CD3-CD56+ и/или CD16+ при отсутствии линейных маркеров Т- и В-клеток (CD3 и CD19). CD56 или NCAM (Neural cell adhesion molecule) – связывающий гликопротеин, экспрессированный на нейронах, клетках глии, скелетной мускулатуры и натуральных киллерах, играющий роль в межклеточной адгезии, росте нервов и образовании синапсов [122].

CD16 представляет собой мембранный низкоаффинный IgG рецептор III типа. Эта молекула участвует в антителозависимой клеточной цитотоксичности, осуществляемой НК-клетками [150]. Поверхностные антигены CD16 и CD56, представленные на мембране НК-клеток, играющих важную роль в цитотоксическом иммунном ответе, не являются строго специфичными для данных клеток и представлены и на так называемых НКТ-лимфоцитах, несущих признаки как Т-лимфоцитов, так и НКТ-клеток.

В периферической крови содержание НК-клеток у здоровых доноров 2-20% [77, 34].

Однако во многих работах показано существенное увеличение количества НК-лимфоцитов при вирусных и онкологических заболеваниях [50].

Инфильтрация опухоли НК-клетками и высокая их активность связаны с продолжительной выживаемостью и сниженным риском развития опухоли [99, 228]. При этом важную роль имеет баланс между соотношением линейных популяций Т- и НК-лимфоцитов. Недавно была обнаружена способность НК-клеток регулировать количество антиген-специфических Т-клеток в процессе различных вирусных и онкологических заболеваний. Так, было показано, что при уменьшении количества НК-лимфоцитов резко возрастает количество антиген-специфических Т-лимфоцитов. Эта особенность может нести как вредный, так и полезный вклад в развитие иммунного ответа. При низких дозах вирусной нагрузки, низкое количество Т-клеток являлось губительным для организма из-за низкой способности к элиминации вируса. При более высоких количествах вируса, Т-клетки вызывали иммунопатологические реакции из-за чрезмерной силы иммунного ответа. Таким образом, при высокой вирусной нагрузке, НК-клетки снижают иммунопатологические эффекты, развивающиеся из-за сверхреактивных Т-клеток. Эти регуляторные эффекты НК-лимфоцитов могут иметь определяющее значение для противоопухолевой роли Т-клеток. Фактически, НК-клетки могут препятствовать иммунному ответу на опухоли путем прямого уменьшения количества Т-клеток [232].

По степени экспрессии белков CD56 и CD16 выделяют три субпопуляции НК-лимфоцитов. Основной субпопуляцией являются CD56<sup>low</sup>+CD16<sup>low</sup>+ клетки со средней экспрессией данных маркеров. Они обладают высокой способностью к цитотоксичности, и меньшей к продукции цитокинов, и являются эффекторными. Минорная субпопуляция CD56<sup>high</sup>+CD16<sup>-</sup> клеток практически не способна к секреции перфорина, но обладает высокой способностью к пролиферации и секреции цитокинов. Данные субпопуляции ранее рассматривались как независимые, однако позднее было выявлено, что клетки с экспрессией CD56<sup>low</sup> могут быть получены из CD56<sup>high</sup> клеток *in vitro*, и для клеток со средней экспрессией CD56 (CD56<sup>low</sup>) характерна более короткая длина теломер. Таким образом, они представляют собой разные стадии дифференцировки НК-клеток.

Цитокины, секретируемые НК-клетками, относятся, в основном, к

провоспалительному ряду (TNF-alpha, IF-gamma). В то же время, некоторые NK-клетки способны синтезировать IF-10, подавляющий иммунный ответ [91, 71, 34].

CD56-CD16high+ клетки также секретируют цитокины, но слабо способны продуцировать перфорин и пролиферировать [60, 57, 73, 174, 248].

Клетки с фенотипами CD56-CD16high+ CD56high+CD16- обладают регуляторными функциями. Различный фенотип субпопуляций NK-клеток отражает их различия по функциональной активности и изменение их соотношения может обладать прогностическим и клиническим значением при различных заболеваниях. Так, были описаны изоформы активационного рецептора NKp30, который обеспечивал выраженный ответ на гастроинтестинальные стромальные опухоли. NK-клетки, экспрессирующие NKp30a или NKp30b имеют более выраженную способность к цитотоксичности и продукции цитокинов в ответ на опухолевые мишени. Однако, NK-лимфоциты, экспрессирующие изоформу NKp30c являются супрессивными и секретируют высокие уровни IL-10, что связано с худшим прогнозом и возрастающей смертностью среди пациентов, имеющих высокую долю естественных киллеров с данной изоформой [61].

## **1.1.2 Механизм цитотоксичности NK-клеток**

### **1.1.2.1 Распознавание клеток-мишеней NK-клетками**

CD16 – низкоафинный рецептор к Fc-фрагментам иммуноглобулинов класса IgG. Существуют две формы данного антигена – CD16a (FcIIIa и FcIIIb ), NK-клетки экспрессируют только первую. Иммуноглобулины IgG опсонизируют клетки-мишени и через взаимодействие Fc-фрагментов с молекулой CD16 на поверхности натуральных киллеров вовлекают их в реакцию антителозависимой клеточной цитотоксичности.

NK-клетки являются клетками врожденного иммунитета. Их мишенями являются клетки, утратившие частично или полностью молекулы MHC-I, и экспрессирующие повышенное количество белков клеточного стресса, вызванное инфицированием вирусом или опухолевой трансформацией [14]. Также они могут

принимать участие в реакции антителозависимой клеточной цитотоксичности, вызывая гибель клеток-мишеней, опсонизированных IgG. Уничтожение чужеродных клеток может происходить без предварительной активации натуральных киллеров. Узнавание «своих» МНС-I молекул на нормальных клетках защищает их от НК-опосредованного лизиса. Однако злокачественные или инфицированные клетки уходят от распознавания клетками иммунной системы путем снижения количества МНС-I на мембране, что отменяет ингибирование НК-клеток и ведет к активации рецепторов для осуществления лизиса. Вместе с тем, одного отсутствия молекулы МНС-I недостаточно для развития цитотоксического ответа. Цитотоксичность НК-клеток управляется балансом между активационными и ингибиторными рецепторами и взаимодействиями между их лигандами. Сигналами для активации НК-клеток служат стресс-индуцированные молекулы клетки-мишени или вирусные белки, представленные на мембране последней. Ингибиторные рецепторы KIR (Killer-cell immunoglobulin-like receptors) распознают классические МНС-I молекулы (HLA- A, -B, и -C), лектиновое семейство рецепторов C-типа (CD94 и NKG2s–NKG2A, -B, -C, -D, -E, и -F) распознают неклассические МНС-I (HLA-E). Активирующие KIR практически неизвестны, хотя и содержат ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs)-мотивы, характерные для активационных молекул и служащие для прикрепления киназ, транслирующих сигнал в ядро. Ингибиторные рецепторы содержат ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs)-мотивы, связывающие фосфатазы, которые дефосфорилируют активационные сигнальные белки. KIR дублируются также KLR (killer-cell lectin-like)-семейством рецепторов. По аналогии с предыдущими, они также способны активировать и ингибировать ответ натуральных киллеров. KLR распознают молекулу HLA-E (нетипичную молекулу МНС-I класса), наличие которой на мембране потенциальной мишени подавляет ответ НК-клетки. В случае распознавания рецепторов семейства KLR молекул MICA и MICB (характерных для опухолевых клеток) или молекулы ULBP (рецепторы для антигена UL-16 цитомегаловируса), происходит активация НК-клетки. Еще одну

группу активационных молекул составляют рецепторы натуральной цитотоксичности NCR (natural cytotoxicity receptors) - NKp46, NKp30, NKp44, NKp80. Они распознают антигены В7-Н6 на поверхности опухолевых клеток и белок pp65 цитомегаловируса, гемагглютинины и гепарансульфат. Показано, что при опухолевых заболеваниях и метастазировании их экспрессия снижается по сравнению со здоровыми донорами и неметастатическими формами, что ведет к снижению иммунного ответа на опухоль [170].

Также на поверхности НК-клеток находятся молекулы адгезии, участвующие в образовании иммунологического синапса (ИС) с клеткой-мишенью. Они относятся к суперсемействам иммуноглобулинов (LFA-2, LFA-3, ICAM-1) и интегринов (CD11a, CD11b, CD11c) [157, 151].

### **1.1.2.2 Формирование иммунологического синапса**

Формирование ИС начинается со сближения НК-клетки и клетки-мишени за счет действия хемокинов и цитокинов. Образуется непрочный контакт, за время которого лимфоцит «сканирует» поверхность мембраны клетки на предмет активационных и ингибиторных сигналов. В случае распознавания ингибиторных лигандов, образуется ингибиторный синапс, дефосфорилируются сигнальные молекулы, не происходит активации цитоскелета и НК-клетка отсоединяется от мишени. В случае преобладания активационных сигналов, фосфорилируются домены ITAM рецепторов данных лигандов, запускается каскад киназ, которые переводят молекулу адгезии LFA-1 из неактивной конформации в активную. Вследствие этого формируется более прочный межклеточный контакт [39]. Ни один из активационных рецепторов, тем не менее, не способен вызывать дегрануляцию НК-клеток (за исключением CD16). Дегрануляция происходит лишь в случае распознавания комбинации таких сигналов [38]. Эффективный киллинг же происходит только при направленной дегрануляции в случае активации молекулы LFA-1. После распознавания активационных лигандов происходит перестройка синапса за счет перехода актина из глобулярной формы в фибриллярную (f-актин). Формируются две структуры – центральный и



периферический супрамолекулярные комплексы (cSMAC и pSMAC соответственно) [162]. Перестройка ИС ведет к усилению активационного сигналинга (за счет концентрации рецепторов в центральном супрамолекулярном комплексе (cSMAC)) и изоляции полости синапса от окружающей среды. В НК-клетке активируется фосфолипаза C, расщепляющая фосфатидилинозитол бифосфат (PIP<sub>2</sub>) на диацилглицерол (DAG) и инозитолтрифосфат (IP<sub>3</sub>), вызывающего вход в лимфоцит свободного кальция. Это вызывает индукцию дегрануляции лимфоцита. Движение литических гранул происходит от (+) конца микротрубочек к (-) концу, в сторону центра организации микротрубочек (ЦОМТ), который движется в свою очередь к ИС [39]. Перед прикреплением к клеточной мембране, литически гранулы сливаются с везикулами, содержащими белки Rab27 и Munc13-4. За счет них и происходит прикрепление. Затем мембраны сливаются благодаря действию белков v-SNARE и t-SNARE, происходит собственно процесс дегрануляции в полость ИС [72]. После этого НК-клетка примерно в течение часа остается прикрепленной к поверхности клетки-мишени для наиболее полного поглощения цитотоксических факторов. Затем лимфоцит отделяется за счет интернализации активационных рецепторов НК-клетки и достаточно быстро восстанавливает свой цитотоксический потенциал.

### **1.1.2.3 Роль перфорины и Fas-L в цитотоксичности НК-лимфоцитов**

Лизис клеток-мишеней осуществляется за счет выработки НК-клетками перфоринов и гранзимов, находящихся в литических гранулах и выбрасывающих на поверхность клетки-мишени при взаимодействии натурального киллера с последней. Перфорин секретируется в комплексе с серглицином, однако, попав в слабощелочную среду, освобождается от него [144]. Свободный Ca<sup>2+</sup> [103], взаимодействуя одним из доменов перфорины, переводит его в активную конформацию. Перфорины, встраиваясь в мембрану клетки-мишени, образуют пору, что может вызвать осмотическую гибель патологической клетки, и служат каналом для попадания в клетку-мишень гранзимов, индуцирующих апоптоз клетки-мишени. Однако гранзимы могут попадать в клетку-мишень и независимо

от перфорина – благодаря электростатическим взаимодействиям комплекс гранзима и серглицина связывается с мембраной клетки-мишени, после чего эндоцитируется [144]. Из эндосом гранзимы попадают в цитоплазму клетки благодаря сублитическим концентрациям перфорина, образующим поры уже в эндосомах. Существует модель, согласно которой перфорин сначала наносит незначительное повреждение клетке. Та пытается закрыть дефект с помощью образования «гигантосом», в которые попадают гранзимы и перфорин. Затем перфорин проделывает поры в эндосомах, через которые гранзимы выходят в цитоплазму, вплоть до полного разрыва «гигантосом». Одновременно с этим секретруется IFN- $\gamma$  и фактор активации тромбоцитов, связывающиеся с клеткой-мишенью и усиливающие цитолитическую активность перфорина. Гранзим В, попавший в цитозоль, подвергается ограниченному протеолизу, активируя белок BID, запуская митохондриальный путь апоптоза [52]. Другим механизмом является активация гранзимом В прокаспаз с превращением их в активные каспазы. Одновременно с этим гранзим В расщепляет ферменты репарации ДНК, структуры цитоскелета и ядерного матрикса. Фрагментация ДНК и гибель клетки наступает в результате активации эндонуклеаз.

Апоптоз также может быть вызван взаимодействием рецепторов клетки-мишени с молекулами семейства TNF (tumor necrosis factor) - Fas-лигандом, выходящим на поверхность активного NK-лимфоцита в результате дегрануляции, однако этот процесс играет гораздо меньшую роль в цитотоксичности NK-клеток. FasL доставляется к поверхности мишеней с помощью экзосом, взаимодействуя с рецептором Fas (CD95) и запуская апоптотический путь с помощью каспаз 8 и 10 [195]. Индуктором апоптоза может выступать молекула TRAIL, также относящаяся к семейству TNF. Она экспрессируется преимущественно на незрелых NK-клетках (CD56-CD161+) [247]. Апоптоз может вызывать и непосредственно секретруемый TNF-альфа путем связывания с рецептором TNFR1 (CD120a, pp55).

У онкологических больных NK-клетки обладают пониженной цитотоксической активностью, как следствие низкой экспрессии цитолитических

молекул, таких как перфорин, гранзимы, FasL и TRAIL, что ухудшает течение заболевания и прогноз [170]. Важной особенностью в NK-опосредованном иммунном ответе на опухоль является их постепенное истощение. Подобно Т-клеткам, продолжительное воздействие опухолевых антигенов приводит к истощению и падению количества естественных киллеров. NK-лимфоциты обладают сильной противоопухолевой функциональной активностью и способностью к секреции цитокинов. Однако, начиная с пятого дня после активации, отмечается существенное снижение продукции IFN $\gamma$  и цитотоксичности, несмотря на их присутствие в опухолевых узлах. Дополнительные введения аутологичных NK-лимфоцитов или иммунотерапия для поддержания функциональной активности NK-клеток может быть необходима для поддержания противоопухолевого ответа [84, 93, 167].

Натуральные киллеры обладают рядом свойств, которые сближают их с клетками адаптивного иммунитета: Т-лимфоциты и NK-клетки развиваются из общего лимфоидного предшественника, проходят сходный процесс обучения, вырабатывают практически одни и те же цитокины, обладают сходными механизмами цитотоксичности.

## 1.2 Т-лимфоциты

Т-клетки являются ключевым звеном адаптивного иммунитета. Их развитие и созревание включают в себя сложное разнообразие взаимодействий с нелимфоидными клетками и рецепторами. Т-клеточные предшественники возникают в костном мозге и через ряд определенных и скоординированных этапов развития, мигрируют в тимус, подвергаются дифференцировке и селекции, и, в конечном счете, созревают в функциональные Т-клетки, что и определило их название (тимусзависимые, или Т-лимфоциты). Высокоспецифичные к определенным бактериальным и вирусным инфекциям, Т-клетки также опосредуют реакции на чужеродные ткани и иммунный надзор за опухолевыми клетками, что представляет большой интерес для онкологов [117]. Для них

характерно распознавание комплекса антигенов с молекулами МНС и участие в реализации иммунного ответа в качестве эффекторных и регуляторных клеток.

Ввиду невозможности отличить морфологически Т-лимфоциты от других популяций, их дифференцируют по экспрессии на их поверхности маркерных молекул. Характерным и специфичным для всех разновидностей Т-лимфоцитов является молекулярный комплекс антигенраспознающего димера Т-клеточного рецептора (TCR), состоящего из  $\alpha\beta$  или  $\gamma\delta$ -цепей, и вспомогательного молекулярного комплекса CD3. Последний являются общими для всех субпопуляций Т-клеток и поэтому служат маркером для идентификации Т-клеток (моноклональные анти-CD3-антитела обычно распознают  $\epsilon$ -цепь этого комплекса). Относительное содержание Т-лимфоцитов в крови составляет в среднем около 73% (55–85%) от общего числа лимфоцитов; абсолютное —  $(950–2100) \times 10^9$  клеток на литр [14]. Они активно рециркулируют, также присутствуют в большом количестве в паракортикальных зонах лимфатических узлов и параартериальных муфтах селезенки, присутствуют в барьерных тканях и диффузно распределены в слизистых оболочках и эпидермисе [28].

На поверхности  $\alpha\beta$ Т-клеток экспрессируется примерно 30–40 тыс. молекул TCR на клетку, причем содержание комплексов CD3 примерно в 10 раз больше, чем TCR — около 300 000 молекул на клетку, что обозначает присутствие на мембране молекул CD3, не связанных с TCR. Зрелые Т-лимфоциты экспрессируют молекулы CD2, CD5, CD7 [24]. Так же, как CD3, их используют в качестве маркеров для определения Т-лимфоцитов, однако эти молекулы не строго специфичны и содержатся на некоторых других клетках (CD2 и CD7 — на NK-клетках, CD5 — на В1-лимфоцитах). Функциональная активность Т-лимфоцитов определяется корецепторами CD4 и CD8, служащими маркерами основных субпопуляций  $\alpha\beta$ Т-клеток, а также костимулирующая молекула CD28, экспрессируемая на большинстве (около 80%) Т-клеток [204].

Для наивных (не контактировавших с антигеном)  $\alpha\beta$ Т-клеток характерен высокий уровень экспрессии L-селектина (CD62L) и хемокинового рецептора CCR7, функция которых состоит в определении пути миграции Т-клеток. На Т-

клетках находятся  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -интегрины (в основном LFA-1 и VLA-4) и рецепторы для цитокинов (для IL-7, IL-1, IL-2, IL-4, IL-15 и др.). Специфичным маркером наивных Т-клеток, отличающим их от клеток памяти, служит полноразмерная форма молекулы CD45 — CD45RA [222].

### 1.2.1 Субпопуляции Т-клеток

Субпопуляции Т-клеток различны по функциям, мембранным маркерам и способу распознавания антигена. В составе  $\alpha\beta$ Т-клеток выявляют две основные субпопуляции, различающиеся по экспрессии корецепторов CD8 или CD4 и, соответственно, по способу распознавания антигена — в составе молекул МНС-I или МНС-II. При этом, функциональная гетерогенность Т-лимфоцитов значительно выше. Так, в 1986 году Mosmann и соавторы продемонстрировали, что мышинные CD4<sup>+</sup> Т-хелперные клетки могут быть разделены на 2 основных функционально разных подмножества на основе различных цитокинов, которые они производят (т. е. Th1 и Th2) [153]. Факт существования Th1 и Th2 клеток у людей был доказан через 5 лет [183]. Было установлено, что Th1 продуцируют IFN-g и лимфотоксин (LT) и направляют иммунный ответ по клеточно-опосредованному механизму, тогда как клетки Th2 секретируют IL-4, IL-5 и IL-13, запуская гуморальный иммунный ответ [184]. Затем, аналогичная дихотомия у цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), экспрессирующих молекулу CD8, была обнаружена как у мышей, так и у человека [154]. Данные субпопуляции были названы Tc1 и Tc2, соответственно. Клетки Tc2 отличались от цитотоксических клеток первого типа сильно уменьшенным цитолитическим потенциалом, были способны принимать участие в секреции иммуноглобулинов (включая IgE) нормальными В-клетками, и экспрессировали более высокие уровни CD30, CD28 и CD40-лиганда на их поверхностях [134]. Этим, однако, гетерогенность субпопуляций Т-лимфоцитов не исчерпывается [20].

### 1.2.2 Цитотоксические Т-лимфоциты

Важнейшей функцией эффекторных Т-лимфоцитов, экспрессирующих

корцептор CD8, является осуществление противоопухолевого цитотоксического иммунного ответа. Данный маркер имеет сродство к молекуле МНС-I, экспрессирующейся на всех ядродержащих клетках организма и в составе которой цитотоксическому Т-лимфоциту презентруется антигенный пептид. Иммунный ответ в данном случае осуществляется с помощью контактного цитолиза, т.е. механизмом, сходным с цитотоксичностью естественных киллеров. Важнейшим и определяющим отличием функциональной активности Т-киллеров и НК-клеток является то, что Т-клетки реализуют контактный цитолиз на основе специфического распознавания конкретных антигенов возбудителя или опухоли, и способны формировать иммунологическую память [53]. Т-клетки человека, накапливающиеся в опухолевой массе, в некоторых случаях могут специфически лизировать аутологические опухолевые клетки *in vitro* [44]. Они также обладают способностью секретировать интерлейкин-2, интерферон-гамма, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, а также пролиферировать в ответ на стимуляцию аутологичными опухолевыми клетками [85]. Противоопухолевые Т-клетки могут быть выращены в большом количестве *in vitro*, а затем перенесены человеку для успешного подавления роста опухоли [89, 29].

После активации наивных Т-лимфоцитов количество эффекторных Т-клеток, специфичных к инфекции или опухоли, может увеличиваться примерно в 10 000 раз. Лимфоцит совершает до 20 делений в течение недели, во время которых происходит дифференцировка, вследствие чего клетка приобретает эффекторные функции и способность мигрировать в очаги воспаления [27, 95, 239, 110]. Максимальная скорость деления обычно занимает 4-6 часов, хотя в одной работе приводится значение 2 часа [245]. После антигенной активации Т-клетки должны пройти через кардинальные изменения в метаболизме, такие как возрастающая потребность в глюкозе, аминокислотах и железе [145]. Другие изменения касаются перехода от окислительного фосфорилирования к аэробному гликолизу, смысл которого, по-видимому, заключается в удовлетворении возрастающих нужд в нуклеиновых кислотах, жирах и белках для строительства

новых клеток [145, 225]

Для достижения максимальной экспансии CD8<sup>+</sup> Т-клетки нуждаются в многочисленных сигналах, включая сигналы от TCR, костимулирующие сигналы и воспалительные цитокины, такие как IL-12 и IFN I типа [143, 166]. Важнейшую роль в запуске механизма цитотоксического иммунного ответа и развитии ЦТЛ играет IL-2, как CD8<sup>+</sup>, так и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами [168, 143]. Показано, что у клеток с отсутствующим CD25, рецептором к IL-2, клональная экспансия падает незначительно, но у них при этом выявляются функциональные и фенотипические нарушения [26, 161, 240].

В другом исследовании показано, что экспрессия CD25 на CD8<sup>+</sup> Т-клетках повышена на 3-5 день после инфицирования [111]. *In vitro* и *in vivo* было обнаружено, что активированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки, культивированные с высокими концентрациями IL-2, имеют более выраженные эффекторные функции по сравнению с клетками, выращенными при низких уровнях того же цитокина [43, 173]. В отсутствие или при понижении уровня IL-2 сигналинга, CD8<sup>+</sup> Т-клетки обладают дефектными эффекторными функциями и преимущественно становятся CD62L<sup>high</sup> клетками памяти. Этот вывод был в дальнейшем подтверждён экспериментами с  $\gamma$ c-дефицитными CD8<sup>+</sup> Т-клетками [58]. Таким образом, IL-2 представляется более фактором дифференцировки, нежели фактором роста в течение ответа на патоген *in vivo*. В случае, если CD8<sup>+</sup> Т-клетки при распознавании презентируемого им дендритными клетками пептида получают достаточно сильный сигнал, развивающиеся цитотоксические Т-лимфоциты активно продуцируют IL-2 и полностью удовлетворяют свою потребность в этом факторе. При более слабой стимуляции синтез IL-2 Т-киллерами менее интенсивный, поэтому возникает потребность в экзогенном IL-2, источником которого служат CD4<sup>+</sup> Т-хелперы [136].

В процессе дифференцировки наивной Т-клетки в эффекторный цитотоксический Т-лимфоцит меняется фенотипический профиль маркеров, представленных на клеточной мембране. Происходит сплайсинг участков РНК, кодирующей молекулу CD45, что отражается на строении внеклеточных доменов

[222]. На мембране наивных клеток экспрессируется молекула, несущая все три домена и обозначаемая как CD45RA. Промежуточные продукты, представленные на мембране эффекторных лимфоцитов, носят названия CD45RB, CD45RC. Продукт конечной модификации, CD45R0, присутствует и на эффекторных клетках, и на клетках памяти при дальнейшей дифференцировке ЦТЛ [204]. Утрачивается рецептор хоминга во вторичные лимфоидные органы CD62L и хемокиновый рецептор CCR7, направляющий клетки в Т-зоны [199]. Появляются маркеры миграции лимфоцитов в барьерные ткани и очаги воспаления – CCR4, CCR6 и другие [45]. Отмечено снижение экспрессии CD27 и CD127 по сравнению с наивными Т-лимфоцитами при повышении уровня лектиноподобного рецептора G1 (KLRG1), характерного для цитотоксических клеток [113]. Возрастает количество молекул LFA-1, обуславливающих реализацию киллерной функции ЦТЛ [227]. В качестве возможного механизма дифференцировки эффекторных Т-лимфоцитов указывается возрастающая концентрация транскрипционного фактора T-bet в ответ на провоспалительные сигналы, такие как IL-12 [108, 100].

На пике первичного ответа на патоген, популяция CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток фенотипически и функционально гетерогенна. Так называемые короткоживущие эффекторные клетки формируют основную массу популяции, но большинство из них погибает (90-95%), подвергаясь апоптозу, когда инфекция побеждена. Вторая популяция долгоживущих клеток представляет собой предшественников клеток памяти, получающих меньше стимуляции к пролиферации [143]. У этих клеток увеличена способность контролировать вторичное воздействие антигену вследствие способности к быстрой реализации эффекторной функции и локализации в периферийных участках инфекции [239].

### **1.2.3 Цитотоксический ответ эффекторных Т-лимфоцитов**

Выделяют 4 этапа цитотоксического иммунного ответа:

1. Презентация дендритными клетками антигена CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам, приводящая к их активации.



2. IL-2-зависимая пролиферация CD8<sup>+</sup> Т-клеток, аутокринная или индуцируемая CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами.
3. Дифференцировка CD8<sup>+</sup> Т-клеток в цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), сопутствующая пролиферации.
4. Реализация цитолиза клеток-мишеней.

Важнейшим звеном инициации первичного и вторичного иммунного ответа, осуществляемого Т-лимфоцитами являются антигенпрезентирующие клетки (АПК), что было продемонстрировано при истощении дендритных клеток, являющихся АПК, с помощью дифтерийного токсина. При этом существенно снижался иммунный ответ на малярию и вирус лимфоцитарного хориоменингита [109, 176]. Имеются также свидетельства того, что вторичный ответ ЦТЛ на некоторые эпитопы вируса гриппа может быть активирован эпителиальными клетками, также способными к презентации антигена [51]. Были визуализированы непосредственно взаимодействия CD8 Т-клеток с АПК в интактных лимфатических узлах с помощью двухфотонной микроскопии. После периода коротких взаимодействий (~ 8 ч), образуются стабильные и долгосрочные контакты между CD8 + Т-клетками и дендритными клетками. Затем, через 48 ч после начального внедрения антигена и этих взаимодействий, происходила экспансия CD8<sup>+</sup> Т-клеток и их дифференциация [142]. Активация эффекторной функции CD8 + ЦТЛ в основном происходит в течение первых 2-3 дней после заражения. Т-клетки сканируют дендритные клетки (ДК), формируя с ними антиген-специфичные контакты, ведущие к Т-клеточной активации [37, 142, 146]. Было показано, что первый контакт наивного Т-лимфоцита с антиген-несущей ДК происходит в области субкапсулярного синуса или внутрифолликулярной области близлежащего к очагу воспаления лимфатического узла [96, 106].

Вскоре после проникновения инфекции в ответ на градиент «родственного» антигена и/или изменение структуры и хемокинового состава лимфатического узла, наивные CD8<sup>+</sup> лимфоциты быстро мигрируют к периферии Т-клеточной зоны, близко к области субкапсулярного синуса и популяции инфицированных макрофагов. При этом ДК также перемещаются в ту же область и приобретают

антигены инфицированных клеток путем прямого заражения или кросс-презентации. В этой периферической области лимфатических узлов и происходит активация CD8<sup>+</sup> Т-клеток, ведущая к их дифференцировке и пролиферации. Поскольку субкапсулярная область богата антигеном в течение раннего периода инфекции, это может быть наиболее эффективной стратегией иммунного ответа [251].

В распознавании комплекса пептид–МНС-I в качестве корцептора участвует молекула CD8. В соответствии с особенностями строения антигенсвязывающей щели (закрытый тип), пептид, встраиваемый в молекулу МНС-I, имеет размер 8–10 остатков, заякорен в двух позициях и не выходит за пределы щели. Отличие между МНС-I от молекулы МНС-II заключается, в том числе, в расположении варьирующих остатков, формирующих участки, распознаваемые TCR и корцептором CD8<sup>+</sup> Т-клетки. Презентация пептида CD8<sup>+</sup> Т-клетке также осуществляется с участием иммунного синапса и включает обязательную костимуляцию за счет взаимодействия молекулы CD28 Т-лимфоцита с костимулирующими молекулами CD80 и CD86 АПК [90]. Вспомогательная роль в костимуляции принадлежит гуморальным факторам, вырабатываемым дендритными клетками (IL-12, IFN $\alpha$ ). Сигналинг в ядро происходит за счет связи корцептора CD8 с тирозинкиназами Lck. Известно, что часть CD8<sup>+</sup> Т-клеток не экспрессирует CD28. Механизм презентации антигена таким клеткам не установлен. По некоторым данным, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Т-лимфоциты являются не эффекторными, а регуляторными Т-клетками [197].

Цитолиз клеток-мишеней эффекторными Т-лимфоцитами по механизму практически не отличается от натуральных киллеров. Ключевым событием этого этапа является распознавание комплекса антигенного пептида с молекулой МНС-I Т-клеточным рецептором и костимулирующей молекулой CD8 [79, 253]. Костимуляция при данном процессе отсутствует, так как клетки-мишени лишены соответствующих молекул.

В качестве лимитирующего фактора при адгезии Т-лимфоцита и клетки-мишени было открыто взаимодействие молекул  $\beta$ 2-интегрина LFA-1 на Т-клетке и

его рецептора ICAM-1— на клетке-мишени [131]. Как и при цитоллизе, осуществляемом НК-клетками, между ЦТЛ и клеткой-мишенью формируется цитолитический синапс. Также было обнаружено, что блокада взаимодействия CD2/CD58 снижает эффективность Т-клеточного ответа до 80%, что указывает на важную роль данных молекул при инициации цитолиза [128]. В формировании иммунного синапса и роллинга Т-лимфоцитов по эндотелию кровеносных сосудов была доказана роль молекулы VLA-4, также участвующую в метастазировании опухолей [188]. Молекулы, осуществляющие специфическое распознавание — TCR и CD8 на Т-клетке и MHC-I, несущей антигенный пептид, на клетке-мишени, находятся в центре образуемого иммунного синапса. Дальнейшая поляризация Т-клетки (как и клетки-мишени) ведет к ориентации элементов ее цитоскелета для осуществления экзоцитоза. При этом образуется центр, организующий микротрубочки (MTOS — Microtubule-organizing center), благодаря которому перфоринсодержащие гранулы перемещаются к мембране и освобождают свое содержимое в полость, сформированную в зоне контакта клеток [192].

Механизм действия перфорина при Т-клеточной цитотоксичности также не отличается от подобного процесса у НК-лимфоцитов. В присутствии ионов  $Ca^{2+}$  перфорин, поступивший в микрополость синапса, изменяет свою конформацию. Затем молекулы перфорина внедряются в гидрофобные участки мембраны клетки-мишени, где он полимеризуется. Вследствие полимеризации возникают каналы диаметром около 16 нм (10–20 нм), состоящие из 10–20 молекул перфорина. По этим каналам в клетку проникает гранзим В, который является протеазой хемотрипсинового типа. Он расщепляет внутриклеточные сериновые протеазы (каспазы) и запускает тем самым механизм апоптоза клетки-мишени. Наиболее важным является митохондриальный путь, запускающийся действием гранзима В на фактор Bid. Молекулы гранулизина, содержащиеся в цитолитических гранулах Т-киллеров, также способны разрушать мембраны митохондрий клетки-мишени и активировать каспазы [21]. Этап проникновения в клетку-мишень ферментов и инициации апоптоза, традиционно называют программированием лизиса [223]. При этом, несмотря на то, что клетка-мишень еще жива, ее

отсоединение от цитотоксического Т-лимфоцита не способно предотвратить лизис. После отделения от обреченной клетки-мишени цитотоксический Т-лимфоцит способен провести еще несколько цитолитических актов (феномен рециклинга Т-киллеров).

На внутренней поверхности цитотоксических гранул и лизосом Т-киллеров присутствует молекула CD107 (LAMP —Lysosome-associated membrane protein), которая после реализации цитолиза по перфоринзависимому механизму оказывается на клеточной мембране и присутствует на ней некоторое время. По оценке экспрессии этой молекулы можно определить количество ЦТЛ, выполнивших свою функцию, что используется в том числе при первичных иммунодефицитных заболеваниях или болезнях, связанных с супрессией цитотоксического иммунного ответа эффекторных клеток [235].

#### **1.2.4 Fas-зависимый цитолиз**

Однако основным механизмом контактного киллинга для цитотоксических Т-лимфоцитов является передача летального сигнала без экзоцитоза гранул — путем прямого контактного взаимодействия клеток, реализуемого через специализированные рецепторы и лиганды. При этом включается рецепторный механизм индукции апоптоза.

Реализация данного апоптотического механизма цитолиза инфицированной клетки происходит с участием Fas-лиганда на поверхности Т-клетки, и Fas-рецептора, наличие которого на поверхности клетки-мишени служит условием реализации данного механизма апоптоза [156]. Fas-рецептор, относящийся к активационным молекулам, присутствует на поверхности многих клеток человека и млекопитающих. Его экспрессия вызывается инфицированием вирусом и опухолевой трансформацией. Еще одним механизмом индукции апоптоза является распознавание TNF $\alpha$  рецептором I типа — TNFRI (p55). Этот вариант апоптоза больше характерен для CD4<sup>+</sup> Т-клеток, в определенных обстоятельствах способных индуцировать программированную гибель клеток.

Было обнаружено, что некоторые опухолевые клетки имеют мутации в сигнальных путях рецептора апоптоза (FAS и TRAIL) [214, 198], или они сверхэкспрессируют антиапоптотические молекулы, такие как Bcl-xL и FLIP [97], которые делают их более устойчивыми к киллингу иммунными эффекторными клетками.

### **1.2.5 Роль цитотоксических Т-лимфоцитов при онкологических заболеваниях**

Клеточные иммунные реакции играют важную роль в иммунологическом отторжении васкуляризированной ткани у животных и человека [193]. В моделях иммунотерапии мышей передача иммунных Т-лимфоцитов, но не антител, защищает мышей от опухолевого заражения. Элиминация эндогенных CD8 + Т-клеток аннулирует как защитные, так и терапевтические противоопухолевые эффекты. Обширные инфильтраты Т-клеток обычно наблюдаются в опухолях и аллотрансплантатах, подвергающихся иммунологическому отторжению [193]. Индукция клеток CD8+ с определенной иммунной реактивностью может зависеть от взаимодействия с другими типами клеток, такими как CD4+ и антигенпредставляющие клетки, хотя конечным эффектором в большинстве моделей является CD8+ лимфоцит. Таким образом, большинство работ по лечению онкологических заболеваний с помощью иммунотерапии посвящено стимулированию клеточных иммунных реакций против растущей опухоли.

Была обнаружена сильная корреляция между присутствием Т-клеток в опухолевом микроокружении и общей выживаемостью пациента у больных раком яичников и толстой кишки, что позволило говорить о роли Т-лимфоцитов в контроле опухолевого роста. В некоторых случаях прогностическая ценность инфильтрирующих Т-клеток выше обычного стадирования заболевания и гистологических прогностических факторов [78, 252]. Хороший прогноз и меньший размер опухоли также наблюдались у больных раком молочной железы при инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами [189].

С помощью методов молекулярного клонирования были идентифицированы опухолевые антигены, распознаваемые аутологичными Т-клетками человека. В

совокупности все эти данные свидетельствуют о возможности развития Т-клеточного иммунного ответа, направленного против аутологичной опухоли [2]. На данный момент количество известных Т-клеточных эпитопов к опухоль-ассоциированным антигенам достигает 200 и постоянно увеличивается [158].

Показано, что презентация опухолевых антигенов цитотоксическим Т-клеткам вместе со стимуляцией IFN, ведет к развитию противоопухолевого иммунного ответа [63, 171].

Кроме того, цитотоксические Т-лимфоциты продуцируют интерфероны, которые обладают способностью напрямую индуцировать апоптоз, подавлять клеточный рост и ингибировать ангиогенез. При повреждении или утере кластеров генов, кодирующих интерфероны, наблюдается корреляция с развитием лимфопролиферативных заболеваний, карцином и глиом [242, 212, 133].

Хотя иммунные Т-клетки, способные распознавать опухолевые антигены, могут быть получены путем прямой иммунизации у мышей, несущих опухоль, не существует моделей вакцины против рака, которые воспроизводимо демонстрируют, что васкуляризированные опухоли могут быть уничтожены этим подходом [212]. Быстрый рост широко распространенных мышечных опухолей, которые часто вызывают ретровирусы, представляет собой препятствие для изучения онкологических вакцин, которые могут потребовать обширной иммунизации в течение длительного периода времени. Таким образом, большинство моделей мышечных вакцин против рака оценивают их способность предотвращать рост опухоли, введенной после вакцинации, или попытки лечить опухоли через несколько дней после трансплантации, когда опухоли еще не васкуляризованы. Наличие даже большого количества иммунных Т-клеток, способных распознавать опухолевые антигены у мышей, недостаточно для опосредования регрессии опухоли [163, 208]. Т-клетки должны находиться в правильном состоянии активации и дифференцировки, чтобы опосредовать противоопухолевые эффекты. Этот факт часто недооценивается при анализе испытаний иммунотерапии человека. Для иммунологического разрушения опухолей требуются три критерия:

1. Достаточное количество иммунных клеток, которые смогут распознать опухолевые антигены, должно быть получено *in vivo*;
2. Эти клетки должны проникать в строму опухоли;
3. Иммунные клетки должны быть активированы в опухоли для реализации соответствующих эффекторных механизмов, таких как прямой лизис или секреция цитокинов, способных вызвать разрушение опухоли.

Так, у больных метастатической меланомой, перенос *in vitro*-активированных и размноженных аутологичных противоопухолевых лимфоцитов вместе с введением IL-2 пациентам с низким уровнем лимфоцитов опосредовал объективные регрессии рака у 6 из 13 пациентов. Персистенция переносимых клеток наблюдалась на протяжении четырех месяцев после их введения [65]. В дальнейшем исследовании наблюдались объективные регрессии рака у 18 (51%) из 35 пациентов. Для лечения больных раком яичников также широко применяют вакцинирование как опухолевыми пептидами для стимуляции собственного противоопухолевого ответа, так и уже стимулированных аутологичных Т-клеток и опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, при этом отмечена большая продолжительность периода без прогрессирования заболевания и общей выживаемости [124, 254].

При изучении иммунофенотипа и субпопуляционной структуры линейных популяций лимфоцитов периферической крови первичных больных раком яичников до и после хирургического лечения было обнаружено, что происходит нарушение линейности, то есть у таких больных снижено количество Т-лимфоцитов по сравнению с контрольной группой доноров ( $62,5 \pm 3,1\%$  и  $73,9 \pm 2,5\%$  соответственно), в том числе за счет повышения количества НК-лимфоцитов [5]. При подобном исследовании у первичных больных раком молочной железы оказалось, что происходит повышение ряда регуляторных популяций, таких как Т-регуляторные клетки (CD4+CD25+CD127-FoxP3+), CD8+CD28-CD11b- лимфоциты и НКТ-лимфоциты, причем в подавляющем большинстве случаев повышается именно количество НКТ-клеток [9].

Существует множество механизмов, с помощью которых опухоль подавляет активность Т-лимфоцитов. Показано, что на клетках опухоли молекула МНС-I представлена на 25-94% меньше, что позволяет ей избегать распознавания ЦТЛ [25]. Опухоль активно вырабатывает цитокины и хемокины, привлекающие и активирующие клетки, которые обладают ингибирующим воздействием на иммунную систему, например миелоидные супрессорные клетки (MDSC) или Т-регуляторные лимфоциты (Treg) [178].

Один из механизмов подавления опухолью иммунного ответа включает экспрессию внутриклеточных антицитотоксических белков, которые модулируют процесс гибели клеток. Ингибитор сериновой протеазы (serpin) SPI-6, который инактивирует цитотоксическую протеазу гранзим В (GrB), способен предотвращать апоптоз цитотоксическим Т-лимфоцитом. Несмотря на свою сильную антиапоптотическую активность SPI-6 не предотвращает мембранолиз, вызванный цитотоксическими лимфоцитами. Несколько клеточных линий карциномы толстой кишки противостоят мембранному лизису, и эта защита зависит от SPI-6, но также требует экспрессии близкородственного серпина, называемого SPI-C1 (ингибитор сериновой протеазы, участвующий в ингибировании цитотоксичности). Экспрессия SPI-C1 отсутствует в нормальной толстой кишке, но наблюдается в плаценте, яичке, во время эмбриогенеза и в цитотоксических лимфоцитах. SPI-C1 кодирует химотрипсинспецифический ингибитор и необратимо взаимодействует с гранзимом М. Кроме того, SPI-C1 может защищать клетки от перфорина / GrM-индуцированного лизиса. SPI-C1 представляет собой молекулу, которая действует совместно с SPI-6 для предотвращения опосредованного цитотоксическим лимфоцитом убийства опухолевых клеток [36].

Также Т-клеточная толерантность может быть связана с экспрессией ингибиторных регуляторных факторов (ингибиторных костимулирующих молекул, Е3 убиквитин-лигазы и транскрипционных репрессоров) и эпигенетической модуляцией. Недавние открытия новых ингибирующих костимулирующих молекул указывают на сложные механизмы, с помощью которых организм



человека предотвращает чрезмерную иммунную активацию. Повышенная экспрессия этих молекул обнаружена в микроокружении опухоли, что свидетельствует об их участии в развитии иммунной толерантности и опухолевом росте. Модуляция этих костимуляторных путей остается одним из привлекательных подходов к контролю Т-клеточной толерантности [159]. Опухоль может непосредственно инактивировать Т-лимфоциты путем передачи сигнала путем взаимодействия PD-L1, представленного на клетках опухоли, и рецептора PD-1, запускающего апоптоз лимфоцита [129]. Инактивация этого механизма значительно усиливает противоопухолевый иммунный ответ, что отмечено при терапии опухолевых заболеваний. Для рака яичников показано, что в 33% случаев блокада PD-1 улучшает результаты терапии, в том числе зарегистрированы случаи полного излечения опухоли [31]. Двойная блокада PD-1, и CTLA-4 рецепторов, была проанализирована для рака яичников на мышах, где была отмечена существенная регрессия опухоли [88, 67]. Этот же подход широко применяется для лечения меланомы [241]. Таким образом, целый пласт иммунотерапии онкологических больных направлен на активацию собственных цитотоксических Т-лимфоцитов организма, что ведет к улучшению эффективности терапии заболевания. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования для точного определения фенотипа и роли опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов, установления клинического значения прогностических маркеров иммунного ответа и оптимизации стандартных методов лечения для эффективного использования иммунотерапии в тандеме с другими методами лечения опухолевых заболеваний.

### **1.3 НКТ - лимфоциты**

НКТ клетки представляют собой особую небольшую популяцию лимфоцитов, отличающуюся экспрессией как  $\alpha\beta$  T-cell рецепторов (TCR), так и линейных маркеров натуральных киллеров (NK). При этом НКТ-лимфоциты экспрессируют TCR в меньшей степени, чем классические Т-клетки. Термин НКТ был введен из-за того, что молекула NK1.1 использовалась в качестве маркера для

этих клеток. Были получены данные, согласно которым НКТ-лимфоциты одни из первых отвечают на патоген, так же как и НК-клетки, но поскольку многие из них являются NK1.1 отрицательными, определение изменилось. Теперь определяющим свойством является способность распознавания антигенов липидов или гликолипидов, представленных молекулой CD1d [86].

Иммунофенотип НКТ-клеток, применяемый для их идентификации методом проточной цитометрии, представляет собой CD3+CD16+ и/или CD56+. Необходимо подчеркнуть, что они являются особой субпопуляцией Т-лимфоцитов, а не НК-клеток. Как и Т-лимфоциты, НКТ-клетки развиваются в тимусе, но отходят от основного пути дифференцировки Т-клеток на стадии двойных позитивных клеток (CD4+CD8+), зрелые формы могут экспрессировать оба корцептора CD4 и CD8, один из них, или, ни одного [86, 169]. На НКТ-клетках представлены мембранные маркеры, свойственные активированным Т-лимфоцитам: CD69, CD95, CD44 [68, 87]. Подобно НК-лимфоцитам, они не требуют предварительной активации с помощью молекулы МНС, и основную роль в поддержании численности этих клеток служит ИЛ-15. Вместе с тем, как и ЦТЛ, и НК-клетки, НКТ-лимфоциты обладают способностью к цитотоксичности. Количество НКТ-клеток в тимусе составляет 0,5-0,6%, среди покидающих тимус Т-клеток — 5%, среди лимфоцитов крови и лимфатических узлов — менее 1%, в селезенке — 1-2% [132]. Большое число НКТ-клеток содержится в костном мозгу и печени (у мышей — соответственно 40 и 30% от числа лимфоцитов, у человека почти в 10 раз меньше). При этом, в тимусе находятся преимущественно CD4+CD8- НКТ-лимфоциты и двойные негативные по данным маркерам (65% и 34% соответственно), в селезенке — CD4+CD8-, двойные негативные и CD4-CD8+ (68%, 20%, 10%), в печени подавляющее большинство составляют CD4+CD8- лимфоциты (80%) [87]. Рецепторы хемокинов CXCR6 (CXCL16), CCR2(MCP-1 или CCL2) и CCR7, экспрессируемые НКТ-лимфоцитами, определяют их тканевую специфичность, направляя их в печень, селезенку или Т-зависимые зоны лимфоидных органов [86].

НКТ-лимфоциты, как и НК-клетки, относят к клеткам врожденного иммунитета. Они выполняют цитотоксическую функцию и служат основным источником цитокинов на первом этапе внедрения патогена. Описано, что в НКТ-лимфоцитах присутствует предварительно сформированная мРНК цитокинов, что позволяет быстро воспроизводить их при развитии инфекции и задавать направление дальнейшему адаптивному иммунному ответу [210]. Функция, наиболее характерная для CD4<sup>+</sup> и двойных негативных тимических НКТ-клеток - быстрое производство высоких уровней иммунорегуляторных цитокинов IL-4, IFN-g и TNF после стимуляции *in vitro*. Хотя CD4<sup>+</sup> НКТ-клетки селезенки также продуцируют эти цитокины после краткосрочной стимуляции *in vitro* в меньшей степени. Кроме того, двойные негативные и CD8<sup>+</sup> НКТ-клетки выделяют даже более низкие уровни цитокинов, чем CD4<sup>+</sup> лимфоциты. В дополнение к производству цитокинов клетки НКТ могут проявлять сильную цитолитическую активность. Они экспрессируют на своей поверхности Fas-L и могут участвовать в уничтожении опухолевых клеток по перфорин-зависимому механизму [87].

По-видимому, в процессе дифференцировки Т-клеток обособление субпопуляции НКТ-клеток происходит после перестройки генов TCR. НКТ-клетки подвергаются положительной селекции, осуществляющейся кортикальными CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> тимоцитами, поскольку они несут на поверхности молекулу CD1d. Дальнейшее развитие определяется комбинацией молекулярных сигналов, когда НКТ-клетки начинают экспрессировать дифференцировочные факторы ROR $\gamma$ t, T-bet и PLZF. В совокупности с факторами Id2 и Id3, эти молекулы направляют лимфоциты по пути дифференцировки в одну из конечных форм зрелых НКТ-клеток [40]. Лаборатория Хогквиста предложила использовать факторы транскрипции, T-bet, PLZF и ROR $\gamma$ -t, чтобы отличить функциональные подмножества клеток НКТ типа I, особенно в тимусе [126]. Они показали, что аналогичные подмножества CD4<sup>+</sup> Т-клеток, клетки НКТ типа I могут быть разделены на функциональные подмножества NKT1, NKT2 и NKT17, соответствующие соответственно Th1, Th2 и Th17 [127]. О существовании отрицательной селекции аутореактивных НКТ-клеток свидетельствует снижение

их численности при введении их лиганда  $\alpha$ -галактозилцерамида в культуру клеток эмбрионального тимуса. Вместе с этим, при истощении популяции NKT-лимфоцитов ПК, возникает волна пролиферации этих клеток в костном мозге, причем это явление наблюдается даже у тимэктмированных мышей, что указывает на частичную независимость их развития от тимуса [87]. На периферии секреция  $IFN\gamma$  усиливается, тогда как секретировать  $IL-4$  продолжает только  $CD4+$  фракция этих клеток.  $CD8+$  NKT-лимфоциты приобретают способность к осуществлению цитотоксичной активности [56].

### 1.3.1 Субпопуляции NKT-клеток

NKT клетки делятся на два типа в зависимости от структуры их TCR. Клетки I типа экспрессируют каноническую  $\alpha$ -цепь, ассоциированную с ограниченным спектром  $\beta$  цепей, и называются инвариантными (iNKT). Другая популяция обладает большей гетерогенностью  $\alpha\beta$  цепей [172].

iNKT клетки распознают гликолипидные антигены, представленные на молекулах  $CD1d$  путем связывания с ней  $\alpha$ -цепи TCR. Роль клеток NKT типа I в защите от аутоиммунитета осуществляется главным образом за счет продуцирования цитокинов Th2, таких как  $IL-4$  и  $IL-13$ . При этом было установлено, что их способность защищать от опухолевых клеток в значительной степени зависит от производства Th1-цитокинов, особенно интерферона- $\gamma$  ( $IFN-\gamma$ ), хотя клетки NKT обладают литической активностью и могут потенциально непосредственно лизировать опухоли, которые экспрессируют  $CD1d$  [32]. Хотя iNKT-клетки могут прямо распознавать и уничтожать  $CD1d$  экспрессирующие опухолевые клетки, большинство солидных опухолей имеет либо сниженное количество этих молекул, либо полное их отсутствие. Таким образом, опухоли чаще всего иммунологически невидимы для NKT-опосредованной цитотоксичности. Основная роль NKT-лимфоцитов в иммунологическом надзоре за опухолью заключается в индукции секреции множества цитокинов, включая Th1 цитокины ( $IFN-\gamma$ ) и Th2 ( $IL-4$  и  $IL-13$ ) при стимуляции NKT-клеток I типа  $\alpha$ -галактоцерамидом ( $\alpha GalCer$ ). Это наблюдалось как в исследованиях, связанных с

лечением  $\alpha$ -GalCer и его аналогами, так и в исследованиях спонтанного иммунодефицита без лечения. Действительно,  $\alpha$ -GalCer, как было обнаружено, обладает сильной противоопухолевой активностью еще до того, как он был обнаружен как мощный агонист для клеток NKT типа I [116]. Было обнаружено, что дендритные клетки (DCs), обработанные  $\alpha$ -GalCer, обладают терапевтическим действием против метастазов в печени меланомы B16 и имеют то преимущество, что они менее способны индуцировать анергию NKT-клеток [74]. Аналоги  $\alpha$ -GalCer, которые были более склонны к индукции IFN- $\gamma$ , такие как С-гликозид, были еще более эффективными [190]. Кроме того, защита, обеспечиваемая  $\alpha$ -GalCer, зависела от последовательной индукции NK-клеток клетками NKT, обе популяции которых могли продуцировать IFN $\gamma$  и обеспечивать литическую противоопухолевую активность [202].

Запускается цитокиновый каскад, вызывающий повышение экспрессии костимуляторным молекул на дендритных клетках (CD40, CD80), активацию цитотоксических CD8<sup>+</sup> и хелперных CD4<sup>+</sup> - клеток. Данное взаимодействие имеет большую роль в противоопухолевой функции iNKT-клеток. Кроме того, было обнаружено, что iNKT-клетки могут вырабатывать TNF- $\alpha$ , и прямо воздействовать на опухолевые клетки [191]. Также iNKT клетки способны специфически уничтожать CD1d-позитивные опухоль-ассоциированные макрофаги(TAM), развивающиеся из моноцитов и выполняющие иммуносупрессивные функции [199]. Показано, что  $\alpha$ -GalCer ингибирует опухолевые метастазы и подавляет развитие сарком и карцином. Эндогенные гликолипиды, такие как гликофосфатидилинозитол, ганглиозид и гликофинголипид, также способны активировать NKT-клетки, но физиологическая роль этих лигандов неясна. CD1d лиганды обнаружены также на патогенах. Бактериальные гликолипиды, такие как фосфатидилинозитол маннозит, альфа-галактуринозилцерамид и альфа-глюкуронозилцерамид, стимулируют продукцию цитокинов NKT-клетками. NKT-клетки распознают также аутологичные лиганды, в качестве которых может выступать изоглоботригексозилцерамид (iGB3). CD4<sup>+</sup> NKT-лимфоциты I типа способны осуществлять регуляторные функции путем секреции Th2 цитокинов и

имеют низкую цитотоксическую активность. Кроме того, они принимают участие в формировании опухолевого микроокружения, вызывая дифференцировку MDSC производством ИЛ-13 и подавлением Т-клеточного ответа [219]. ИЛ-12, производимый подвидом iNKT-клеток необходим для формирования герминативных центров, пролиферации В-лимфоцитов и продукции ими антител [40]. Также обнаружено, что клетки NKT I типа имеют решающее значение для защиты в моделях иммунологического надзора, зависящих от экзогенного продуцирования ИЛ-12. Это открытие согласуется с обнаружением того, что другой механизм, посредством которого NKT-клетки могут способствовать противоопухолевому иммунитету, заключается в активации дендритных клеток для активации секреции ИЛ-12, который является мощным индуктором IFN- $\gamma$  и более эффективен в привлечении CD4 + и CD8 + Т-клеток [75].

У онкологических больных наблюдались различные дефекты в системе NKT-клеток I типа. Их число уменьшалось у больных раком по сравнению со здоровыми донорами в ряде солидных опухолей [83]. Кроме того, продуцирование IFN- $\gamma$  клетками NKT было значительно снижено у пациентов с множественной миеломой. Высокое количество инфильтрирующих клеток I типа NKT было предиктором пролонгированной общей выживаемости при колоректальном раке, а низкие уровни циркуляции клеток NKT типа I были предиктором плохой выживаемости при плоскоклеточном раке головы и шеи. Однако, попытки использовать  $\alpha$ -GalCer в терапии при опухолевых заболеваниях человека не были успешными. Первоначальные исследования самого  $\alpha$ -GalCer или аутологичных DC, обработанных  $\alpha$ -GalCer, могли увеличить количество NKT-клеток и / или уровни цитокинов и оказались безопасными. Размножение NKT клеток I типа пациента *ex vivo* и реинфузии также было безопасным и данная популяция продолжала увеличиваться в организме пациента. Однако ни одно из этих методов лечения не приводило к полному или частичному ремиссии рака [218].

Тип II NKT клеток больше представлен у людей, чем I тип. Его клетки не распознают  $\alpha$ -меченные гликолипиды, но отвечают на сульфатид-аутоантиген, чаще всего представленный на мембране клеток центральной нервной системы,

поджелудочной железы, почек и печени. NKT-лимфоциты II второго типа распознают аутоантигены, такие как гликофинголипиды и фосфолипиды, представленные в тканях почки, печени и миелиновой оболочке центральной нервной системы. Также они способны распознавать бактериальные антигены, такие как фосфатидилглицерол, дифосфатидилглицерол и фосфатидилинозитол. NKT-лимфоциты II типа играют роль в защите от аутоиммунных заболеваний. Их регуляторная роль заключается в ингибировании NKT-лимфоцитов I типа, нейтрофилов, Th1 и Th17-клеток, костимуляции PD-1/ICOS опосредованной регуляции, выработке IL-4 и IFN $\gamma$  [59]. У больных онкологическими заболеваниями показана их роль в активации MDSC и T-reg клеток [179; 101]. Они считаются антагонистами клеток I типа и играют регуляторную роль в условиях угнетения иммунной системы, например при онкологических заболеваниях [19, 32]. NKT II типа клетки были мало изучены из-за отсутствия доступного специфического поверхностного маркера. В настоящее время изготовлены стабильные сульфаты типа сульфатид-CD1d, что позволяет характеризовать NKT типа II, которыми обогащены как легкие, так и печень. Эти две ткани являются основными мишенями для опухолевых метастазов [112]. Также была доказана роль клеток NKT типа II в моделях метастазования в легкие у сингенных мышей [220].

Таким образом, NKT-клетки играют двойственную роль при развитии опухоли.

Последние годы иммунотерапия как направление лечения онкологических больных выходит на одну из первых ролей. Она основана, прежде всего, на подавлении регуляторных механизмов, с помощью которых опухоль подавляет иммунный ответ, так и стимуляции эффекторного звена иммунитета [236, 244]. Существует масса различных подходов активации пролиферации и экспансии клеток эффекторного звена, обладающих противоопухолевой активностью [209]. Необходимо заметить, что как для адекватного назначения иммунотерапии, так для правильной оценки ее эффективности необходим мониторинг иммунологических показателей эффекторных клеток до лечения и в его процессе,

так как каждый пациент обладает индивидуальными особенностями состояния и функционирования иммунной системы [203]. Также важную роль играет поиск прогностических иммунологических маркеров, коррелирующих с течением заболевания и эффективностью лечения. Показано, что изменение соотношения между популяциями эффекторных клеток может иметь прогностическое значение при терапии опухолевых заболеваний [50, 232]. В настоящее время, большинство исследователей концентрируются на изучении отдельных субпопуляций, не учитывая сопутствующие изменения баланса регуляторных и эффекторных клеток при онкологических заболеваниях. Для большинства иммунокомпетентных клеток, участвующих в генерации как специфического, так и неспецифического иммунного ответа, не существует единичного специфического белка-маркера, а их идентификация возможна только при одновременном изучении коэкспрессии антигенов с применением стратегии последовательного гейтирования белок-специфических клеток.

Таким образом, отсутствие специфических маркеров для отдельных популяций эффекторного звена значительно затрудняет анализ состояния иммунной системы. Кроме того, как было описано выше, эффекторные клетки способны к реализации различной функциональной активности в зависимости от степени экспрессии различных антигенов на мембране, что делает необходимым широкий анализ иммунокомпетентных клеток пациента на предмет их фенотипа и функциональной активности. Так, поверхностный антиген CD8 не является строго специфичным для цитотоксических Т-лимфоцитов и представлен не только на ЦТЛ, но и на Т-лимфоцитах с супрессорной активностью [30]. Показано, что количество CD8<sup>+</sup> супрессорных клеток коррелирует с размером опухоли и метастазированием [197]. Известно так же, что CD8 экспрессируют не только эти субпопуляции лимфоцитов, но и отдельные клоны других клеток: макрофаги, тучные клетки, дендритные клетки, а также НК-клетки. Вышеперечисленные факты делают вопрос о функциональной активности гетерогенных популяций иммунокомпетентных клеток принципиальным и указывают на необходимость подробного индивидуального анализа иммунной системы каждого пациента.



Таким образом, одномоментное подробное многопараметровое изучение баланса между всеми субпопуляциями эффекторных клеток в норме и патологии представляется актуальным и перспективным исследованием.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Используемые материалы

В работе использовали панель прямомеченых МКА (таблица 1) производства BD Biosciences (США). Моноклональные антитела BD Biosciences предназначены для анализа субпопуляций лейкоцитов человека, диагностики лейкозов, лимфом и других заболеваний системы крови путем количественного определения различных субпопуляций лейкоцитов периферической крови и клеток костного мозга человека *in vitro*.

**Таблица 1** — Специфичность моноклональных антител, используемых в исследовании

№ п/п	Кластер дифференцировки	Клетки-мишени	Флуоресцентный краситель
1.	CD45	Все лейкоциты	FITC
2.	CD14	Моноциты	PE
3.	CD3	Зрелые Т-клетки	FITC
4.	CD8	Субпопуляция цитотоксических Т-клеток, НК-, НКТ - клетки	FITC, PE, Cy5
5.	CD16	НК-клетки, НКТ-клетки	FITC, PE, Cy5
6.	CD16&56	НК-клетки, НКТ-клетки	PE

#### Реактивы:

Раствор фикола-верографина (1,077 г/см) (ООО «ПанЭко», Россия);

Фосфатно-солевой буфер (PBS) (ООО «ПанЭко», Россия) готовили по инструкции производителя, pH готового раствора 7,4;

Коммерческая тест-система для определения перфорина FIX&PERM (BD Biosciences, США);

FACS Lysing Solution (BDBiosciences, США) 1% раствор формалина (Россия).

## 2.2. Доноры и онкологические больные

Были исследованы 389 пациентов, находившихся на обследовании и лечении в НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, среди них 91 больной раком первично-операбельным раком яичников, 82 – диссеминированной меланомой, 72 – первично-операбельным раком слизистой оболочки полости рта и 144 – первично-операбельным раком молочной железы. Средний возраст пациентов составил 52,9. Группы онкологических больных раком молочной железы и раком яичников составили женщины со средним возрастом 56,7 и 51,1 соответственно (Таблица 2). Среди пациентов, страдающих раком слизистой полости рта, было 39 женщин (54,1%) и 33 мужчины (45,9%). Средний возраст составил 54,8. В группе больных меланомой средний возраст равнялся 49,3, количество женщин составило 50 (60,9%), а мужчин – 32 (39,1%). Большинство пациентов имело T1-T3 стадии опухолевого роста. Контрольную группу составили 64 практически здоровых донора, среди них – 10 мужчин (15,6%) и 54 женщины (84,4%). Средний возраст донорской группы составил 41,4 года. Кровь забирали из локтевой вены натощак, в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА.

**Таблица 2** — Характеристика исследуемых доноров и пациентов

	Доноры	Рак яичников	Меланома	Рак молочной железы	Рак слизистой оболочки полости рта
Количество мужчин	10 (15,6%)	0 (0%)	32 (39,1%)	0 (0%)	33 (45,9%)
Количество женщин	54 (84,4%)	91 (100%)	50 (60,9%)	144 (100%)	39 (54,1%)
Средний возраст	41,4	51,1	49,3	56,7	54,8

## 2.1. Прямая реакция флуоресценции

Было проведено исследование структуры иммунокомпетентных клеток, а также анализ субпопуляций, включая регуляторные и эффекторные лимфоциты,

путем многопараметрового иммунофенотипирования лимфоидных клеток периферической крови.

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови больных онкологическими заболеваниями и здоровых доноров проводили методом многопараметрового цитометрического анализа. Выделение лимфоцитов из периферической крови осуществляли с помощью разделения клеток на градиенте плотности фиколла-урографина (1,077г/см). Гепаринизированную кровь разводили в 2 раза PBS и осторожно наслаивали на фиколл в следующих соотношениях: 3 объема разведенной крови на 1 объем фиколла и центрифугировали при 1500 об/мин (30 мин) на центрифуге центрифуги СМ-6 (Elmi) при комнатной температуре. Мононуклеарные клетки собирали из интерфазы автоматической пипеткой. Клетки отмывали первый раз PBS (20 мин) при 1500 об/мин, а затем еще 2 раза по 10 мин при 1000 об/мин при комнатной температуре. Эритроциты при их наличии лизировали лизирующим раствором FACS Lysing Solution (BDBiosciences, США).

Окрашивание клеток осуществляли в прямой реакции иммунофлуоресценции с применением моноклональных антител (МКА), конъюгированных различными флуорохромами: FITC, PE, PE-Cy5 (Beckman Coulter, BD Biosciences). Использовали следующие комбинации МКА к дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека: CD45/CD14, CD3/8, CD3/CD56/CD16, CD3/CD16+CD56 (Таблица 1).

Клетки в количестве  $5 \times 10^5$  на один образец инкубировали с МКА в рабочем титре в течение 30 мин при 4°C. Несвязавшиеся МКА удаляли двукратной отмывкой фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) Осадок ресуспендировали в 300 мкл PBS, содержащем 1 % формалин, и анализировали методом проточной цитофлуориметрии.

## **2.2. Исследование цитотоксического потенциала клеток-эффекторов**

Цитотоксический потенциал клеток-эффекторов изучали с использованием коммерческой тест-системы, содержащей моноклональные антитела к

внутриклеточному белку перфорину (BD Biosciences). Применяли комбинированное окрашивание поверхностных антигенов в сочетании с окрашиванием внутриклеточного белка перфорина. Для субпопуляционного анализа экспрессии внутриклеточного белка использовали метод одновременного окрашивания поверхностных антигенов в сочетании с окрашиванием внутриклеточного маркера - CD8/Perforin, CD16/Perforin. Клетки в количестве  $5 \times 10^5$  помещали в пробирки BD Falcon clear polystyrene test tubes 12x75 mm и инкубировали с МКА, конъюгированными флуорохромами (или FITC, или PE, или PE Cy5) в течение 15 мин при 4°C, после чего добавляли по 100 мкл FIX&PERM раствора А и продолжали инкубацию еще 15 мин при тех же условиях. После этого клетки отмывали в 2,0 мл PBS, затем вносили МКА к внутриклеточным белкам по 10 мкл и по 100 мкл FIX&PERM раствора В. После 20-ти минутной инкубации клетки отмывали в 2,0 мл PBS и фиксировали в 300 мкл 1% раствора формалина. Анализировали готовые образцы методом проточной цитометрии.

### **2.3 Метод проточной цитометрии**

Проточная цитометрия, или flow cytometry – это метод регистрации оптических параметров находящихся в потоке клеток или частиц по сигналам светорассеяния и флуоресценции в режиме поштучного анализа.

Принцип проточной цитометрии заключается в том, что суспензия, приготовленная из клеток, предварительно помеченных флуоресцирующими моноклональными антителами или флуорохромами, помещается в поток дисперсионной среды, пропускаемый через проточную ячейку. Гидродинамическое фокусирование струи клеточной суспензии в струе дисперсионной среды приводит к тому, что исследуемые клетки или их ядра выстраиваются поодиночке и в таком порядке пересекают пучок сфокусированных световых (обычно лазерных) лучей. В момент прохождения через луч лазера клетки рассеивают свет во всех направлениях и испускают небольшое количество света за счет флуоресценции. Возбуждение флуоресценции

происходит при прохождении клеткой фокального пятна аргонного (для FITC, PE, Cy3, PC5) лазера (мощность 15 mW, длина волны 488 нм). Свет, исходящий от флуорохромов, фокусируется при помощи оптической системы, состоящей из нескольких зеркал и линз, а затем раскладывается на определенные компоненты. Полученные световые сигналы подвергаются анализу и преобразованию в электрические импульсы, а затем – в определенные формы, приемлемые для компьютерной обработки и хранения полученной информации. В проточной цитометрии измеряются следующие параметры:

- прямое светорассеяние (рассеяние света под малым углом, FSC) для определения относительного размера клеток или частиц;
- боковое светорассеяние (рассеяние света под прямым углом, SSC) для оценки неоднородности внутриклеточного содержимого клетки (например, размеры ядра и гранулярность цитоплазмы);
- флуоресценция – для изучения клеточных маркеров с помощью меченных флуорохромными красителями антител к поверхностным и внутриклеточным компонентам клеток. При этом по интенсивности флуоресценции можно судить об экспрессии антигенов (количестве рецепторов) на клетках.

С помощью регистрации прямого и бокового светорассеяния (FSC и SSC) проточная цитометрия позволяет отделять популяции тромбоцитов, как обладающих самым незначительным размером клеток, от показателей фонового «шума». Манипулирование этими параметрами делает возможным анализ клеток размером 2-75μ, в том числе опухолевых клеток. Данные по прямому и боковому светорассеянию исследуемых клеток отражают на двумерных гистограммах FSC/SSC. При таком анализе параметров FSC и SSC появляется возможность визуализировать отдельные основные группы лейкоцитов человека по их морфологии (например, моноциты обладают большим размером, но низкой гранулярностью, нейтрофилы – большой степенью гранулярности, но меньшим размером). Лимфоцитарный гейт выделяется в области клеток с маленьким размером и низкой гранулярностью. При этом в лимфоцитарном гейте может

присутствовать до 2% базофилов, что необходимо учитывать при анализе. Выделение областей для анализа осуществляли как при использовании DotPlot анализа параметров прямого и бокового светорассеяния, так и смешанных линейно-логарифмических режимах (lin/log) (SSC vs FL1, FL2, FL3). При использовании многоцветного анализа данные по каналам флуоресценции отражены на двумерных четырехдекадных log/log гистограммах (FL1/ FL2, FL2/ FL3 и FL1/FL3). Квадранты в этих гистограммах (FL1/ FL2 (FITC/PE), FL2/ FL3 (PE/PE-Cy5) и FL1/ FL3 (FITC/PE-Cy5)) определяют две разделительные линии, фиксированные для всех измерений на одной четверти шкалы флуоресценции по абсциссе и ординате. В работе использовали антитела, меченные красителями FITC, PE и PE-Cy5. Длина волны для зеленой флуоресценции (FITC) устанавливалась в канале FL1 (517-530 нм), для оранжевой флуоресценции (PE) в канале FL2 (563-607 нм), для красной флуоресценции (PE-Cy5) в канале FL3 (670 нм). Данные получали в логарифмическом измерении для всех каналов - FL1, FL2, FL3 (FITC и PE, PE-Cy5 соответственно). Учитывается относительное количество позитивных клеток (%) и интенсивность среднего канала флуоресценции (MFI). Интенсивность флуоресценции напрямую зависит от используемого флуорохрома, а также от количества белка или антигенных детерминант на клетке.

Для контроля выбранного лимфоцитарного гейта на присутствие клеток других популяций или обломков клеток применяли окрашивание CD45/CD14. В выбранном гейте CD45+CD14+ лимфоцитарных клеток накапливали не менее 3000 событий. Количество клеток с данным фенотипом согласно международным стандартам пробоподготовки и анализа методом проточной цитометрии не должно быть меньше 95-97%, что также было учтено в работе.

Проточно-цитофлуориметрический анализ проводили на 5-ти параметровом проточном цитометре аналитического типа FACSCalibur (BDBiosciences), укомплектованного двумя лазерами с длиной волны 488 и 635 нм. Использовали стандартные настройки и протоколы сбора и анализа образцов CellQuestPRO

software. Клетки анализировали на основе параметров, измеряемых проточной цитофлуориметрией.

Для исключения неспецифического окрашивания проводили анализ негативного контроля, который представляет собой клетки, окрашенные неспецифическими антителами, мечеными теми же флуорохромами, с которыми предстоит работать в дальнейшем (изотипический контроль). В настоящее время принято, что негативные клетки должны попадать в первую декаду на логарифмической шкале интенсивности флуоресценции по всем задействованным каналам (левый нижний угол DotPlot). Следовательно, необходимо добиться того, чтобы клетки контроля легли, по возможности, в центре первой декады. Неспецифическое взаимодействие антител различных классов с поверхностью клеток мишеней не одинаково, поэтому антитела для контрольного образца должны быть того же изотипа, что и специфические антитела, используемые для анализа. В работе использовали следующие изотипические конъюгаты: IgG1FITC/IgG2aPE, IgG1FITC/IgG2aPE/IgG2a PC5. Для изучения экспрессии антигенов на клеточной поверхности клеток положение маркера устанавливали по отношению к изотипическому контролю, меченного напрямую флуорохромами в прямой РИФ.

Для компенсации и устранения спектрального перекрытия использовали показатель MEAN, отражающий среднестатистическое положение максимума пика распределения частиц на гистограммах в выбранном канале флуоресценции или светорассеяния. По правилам, MEAN левого верхнего квадранта в DotPlot должен быть равен MEAN левого нижнего квадранта 3 по оси X, а MEAN правого нижнего квадранта равен MEAN левого нижнего квадранта 3 по оси Y.

Дальнейшую обработку FSC файлов первичных цитометрических данных проводили с использованием программного пакета WinMDI версия 2.8.



## 2.4 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистических программ «Статистика» на персональном компьютере. Данные анамнеза, клинических проявлений, местного статуса, лабораторных иммунологических исследований, операций, а также цитологических и гистологических заключений для каждого пациента были внесены в специально разработанную базу, на основе которой проводился анализ полученного материала и результатов.

Нормальность распределения показателей определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильной широты (25-й и 75-й процентиля) в случае распределения отличного от нормального, или среднего значения и стандартного отклонения  $x(s)$  при нормальном распределении показателей. Статистическую значимость различий между сравниваемыми группами оценивали по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни и t-критерию Стьюдента для независимых групп и критерию Вилкоксона для зависимых групп. Различия между показателями считали статистически значимыми при  $P \leq 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Субпопуляционное соотношение CD45+лимфоидных клеток здоровых доноров и онкологических больных

Всего было охарактеризовано 453 человека, из них 64 донора, 91 больных раком яичников, 82 – больных меланомой, 72 – больных раком слизистой оболочки полости рта и 144 – больных раком молочной железы. У доноров были оценены значения CD8 (35,5 (30,6; 41,1)% от CD45+ лимфоцитов), CD3+CD8+ (27 (22,3; 30,7)%), CD3-CD8+ (8,1 (5,9; 12,1)%), CD3-CD16+CD56+ (15,9 (11,5; 19)%), CD3+CD16+CD56+ (9,4 (5,3; 14,2)%) клеток.

Количество CD8-положительных клеток (общего CD8) составило у больных раком яичников 34,7 (27,3; 40)%, у больных меланомой – 35,4 (28,6; 41,1)%, РСОПР – 36,3 (29,1; 45,4)%, РМЖ - 38,6 (33,4; 45,8)%).

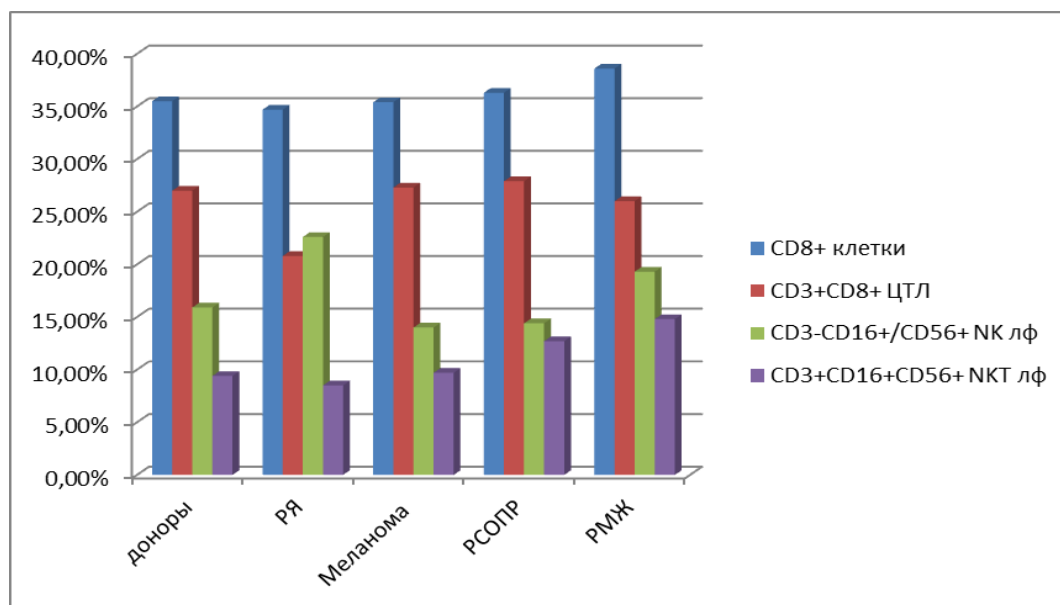
При анализе популяции CD3+CD8+ ЦТЛ было выявлено, что они представляют собой основную массу эффекторных клеток онкологических больных (рисунок 1). Значения данной субпопуляции при различных нозологиях составили: у больных раком яичников – 20,8 (12,5; 29,7)%, меланомой – 27,3 (16,3; 22,6)%, РСОПР – 27,9 (19,4; 39,7)%, РМЖ - 26 (19; 30,7)%).

Было зафиксировано небольшое повышение субпопуляции CD3-CD8+ (NK-лимфоцитов) у больных трех из четырех нозологий (рак яичников – 11,1 (6,7; 15,1)%, меланома – 7,7 (5,3; 11,1)%, РСОПР – 10,3 (6,2; 14,8)%, РМЖ - 12,6 (8,3; 16,8)%).

При анализе данной субпопуляции набором CD3/CD16&CD56, оказалось, что у больных раком яичников и раком молочной железы было повышено количество CD3-CD16+56+ NK-клеток (22,6 (14,5; 31,3)% и 19,3 (11,4; 26,3)%), а у больных остальных нозологических форм значения также были близки к нормальным (меланома - 14 (10,2; 20,5)%, РСОПР - 14,4 (10,3; 24,7)%). Все данные представлены в таблице 3.

Количество клеток с фенотипом CD3+16+56+ (NKT-лимфоциты) было повышено у больных РМЖ и РСОПР (рак яичников – 8,5 (4,6; 14,8)%, меланома –

9,7 (6,1; 14,7)%, РСОПР –12,7 (8; 19)%, РМЖ - 14,8 (8,9; 19,2)%), причем статистически значимое различие было показано только для больных РМЖ.

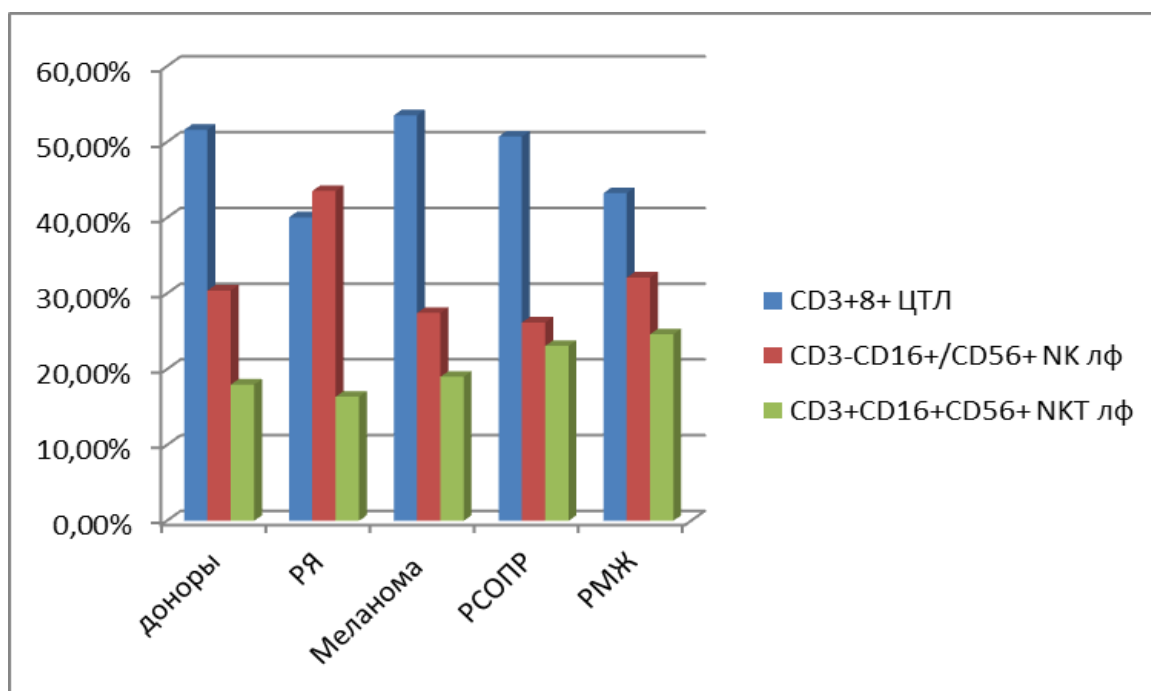


**Рисунок 1** — Соотношение субпопуляций эффекторных клеток у доноров и онкологических больных.

**Таблица 3** — Основные субпопуляции эффекторных лимфоцитов у доноров и онкологических больных. Данные представлены в форме медианы и квартилей. P - уровень значимости при сравнении: 1 - больных РЯ с донорами, 2 – больных меланомой с донорами, 3 - больных РСОПР с донорами, 4 – больных РМЖ с донорами.

	доноры	РЯ	Мелано ма	РСО ПР	РМЖ	p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>	p <sup>4</sup>
CD8 <sup>+</sup>	35,5 (30,6; 41,1)	34,7 (27,3; 40)	35,4 (28,6; 41,1)	36,3 (29,1; 45,4)	38,6 (33,4; 45,8)	0,82	0,76	0,49	0,33
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	27 (22,3; 30,7)	20,8 (12,5; 29,7)	27,3 (16,3; 22,6)	27,9 (19,4; 39,7)	26 (19; 30,7)	<b>0,04</b>	0,79	0,12	<b>0,00</b>
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	8,1 (5,9; 12,1)	11,1 (6,7; 15,1)	7,7 (5,3; 11,1)	10,3 (6,2; 14,8)	12,6 (8,3; 16,8)	0,08	0,95	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup>	15,9 (11,5; 19)	22,6 (14,5; 31,3)	14 (10,2; 20,5)	14,4 (10,3; 24,7)	19,3 (11,4; 26,3)	<b>0,00</b>	0,93	<b>0,02</b>	0,07
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup>	9,4 (5,3; 14,2)	8,5 (4,6; 14,8)	9,7 (6,1; 14,7)	12,7 (8; 19)	14,8 (8,9; 19,2)	0,94	0,19	0,19	<b>0,01</b>

При оценке соотношений субпопуляций эффекторных клеток у различных нозологий онкологических заболеваний и доноров, можно обнаружить следующие закономерности. Если принять общее количество эффекторов за 100%, то у здоровых доноров большинство эффекторных клеток, как и следует из приведенных ранее значений, представляют собой ЦТЛ, и составляют 51,6%. НК-лимфоциты занимают почти треть от всех эффекторов (30,4%), на долю НКТ-лимфоцитов приходится 17,9%. Подобная закономерность с преобладанием ЦТЛ обнаружилась и у больных меланомой, раком слизистой полости рта и раком молочной железы (53,5%, 50,7% и 43,3% соответственно). На НК-лимфоциты приходится 27,4% у больных меланомой, 26,1% у больных раком слизистой оболочки полости рта и 32,1% у больных раком молочной железы. НКТ-лимфоциты составляют 19,0%, 23,1% и 24,6% соответственно. Исключение представляет больные раком яичников, где среди эффекторов преобладают НК-лимфоциты (43,5%), ЦТЛ составляют 40,1%, а на долю НКТ-клеток приходится 16,3% (рисунок 2).



**Рисунок 2** — Процентное соотношение субпопуляций эффекторных клеток при различных нозологиях онкологических заболеваний.

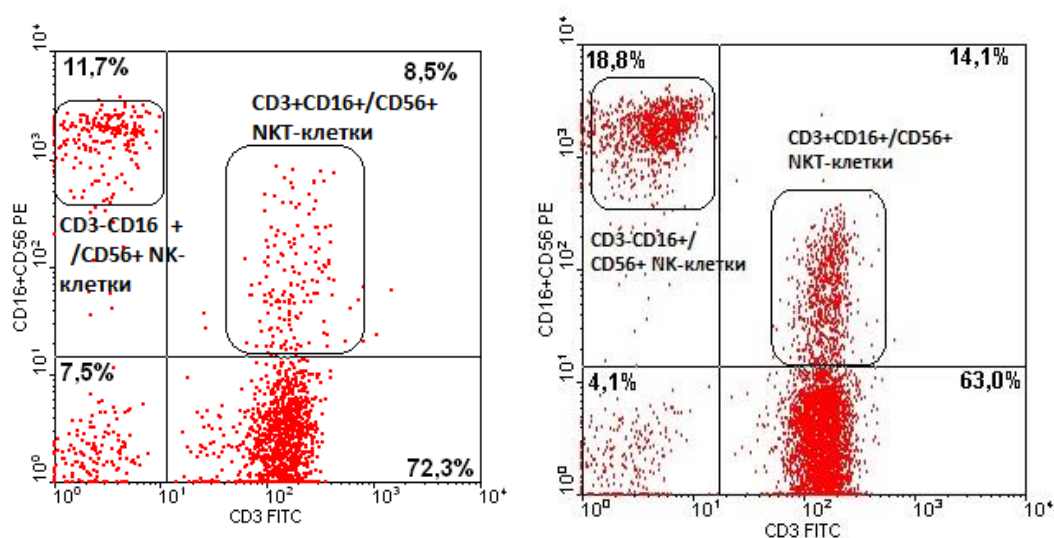
Однако при рассмотрении каждого заболевания отдельно выявлялся очень широкий диапазон количества CD8+ клеток (от 7% до 60% лимфоцитов), из-за чего больные каждой нозологической формой были разделены на подгруппы по значению этого маркера. Были отобраны подгруппы с высокими значениями количества CD8+ клеток (>35%), нормальными (25-35%) и низкими (<25%) согласно принятым в лаборатории нормам данного маркера. Во всех нозологических формах большинство пациентов оказалось с повышенным количеством CD8+ клеток (рак яичника – 44(48,3%), меланома – 43(52,4%), РСОПР – 50(69,4%), РМЖ – 75(52,1%)), средние значения экспрессии CD8 составили 41,7 (37,8; 48,2), 41,5 (38,9; 45), 41,2 (37,6; 45,5) и 45,3 (39,7; 49,5) соответственно. Подгруппы с нормальными значениями CD8 оказались меньше (рак яичников – 37(40,6%), меланома – 33 (40,2%), РСОПР – 17 (23,6%), РМЖ – 56 (38,8%)), при том, что и медиана экспрессии CD8 была ниже донорского уровня (рак яичника – 31 (28,8; 33,3)%, меланома – 30 (26,4; 33)%, РСОПР – 28,5 (25,1; 31,3)%, РМЖ - 30,5 (27,8; 33,6)%). Наименьшими были подгруппы с низкими значениями CD8+ клеток (рак яичников – 10 (10,9%), меланома – 6 (7,3%), РСОПР – 5 (6,9%), РМЖ – 13 (9,0%)) при средних значениях значительно ниже нормы (рак яичников – 22,9 (20,5; 23,5)%, меланома – 19,3 (14,6; 22,8)%, РСОПР – 21,1 (16,3; 22,6)%, РМЖ – 18,1 (15,9; 20,8)%). Видно, что процентное соотношение между группами совпадает в трех из четырех рассматриваемых нозологиях, и отличается только у больных раком слизистой оболочки полости рта в сторону увеличения группы с повышенным уровнем CD8-положительных клеток. Таким образом, однородные на первый взгляд нозологические группы оказались широко гетерогенными по экспрессии маркера CD8, и в дальнейшем каждая группа была проанализирована отдельно.

**Таблица 4** — Распределение больных по уровню экспрессии маркера CD8

	PCOПP	РЯ	Меланома	PMЖ
Высокий уровень CD8	50 (69,4%)	44 (48,3%)	43 (52,4%)	75 (52,1%)
Нормальный уровень CD8	17 (23,6%)	37 (40,6%)	33 (40,2%)	56 (38,8%)
Низкий уровень CD8	5 (6,9%)	10 (10,9%)	6 (7,3%)	13 (9,0%)

Было выявлено, что у больных с повышенным уровнем CD8+ клеток во всех нозологических формах наблюдается повышение медианы популяции CD3+CD8+ (рак яичников – 31 (25,3; 36)%, меланома – 32,8 (28,4; 37,1)%, PCOПP – 29,8 (22,8; 33,5)%, PMЖ – 29,9 (25,4; 33,8)%) и CD3+CD16+CD56+ клеток (рак яичников – 12,8 (8,2; 20,2)%, меланома – 12,9 (8,2; 21,3)%, PCOПP – 14,1 (10,3; 18,7)%, PMЖ – 15,9 (10,9; 21,4)%), причем с уменьшением количества CD8-положительных лимфоцитов, уменьшалось и количество ЦТЛ и НКТ-клеток. Так, у больных с нормальными значениями CD8+ лимфоцитов, количество клеток с фенотипом CD3+CD8+ было существенно ниже донорских показателей, что подтвердил статистический анализ по критерию Манна-Уитни (рак яичников – 19,2 (9,8; 23,6)%, меланома – 20,8 (13,6; 23,3)%, PCOПP – 18,6 (13,3; 23,1)%, PMЖ – 20,2 (15,9; 23,5)%), Уровень CD3+CD16+CD56+ НКТ-лимфоцитов был в 1,5-2 раза ниже значений в группе пациентов с повышенным CD8, выше или на уровне донорских (рак яичника – 8,4 (4,2; 11)%, меланома – 7,6 (5,6; 12,7)%, PCOПP – 6,9 (3; 10,5)%, PMЖ – 11,6 (7,8; 17,9)%). В подгруппе больных с низким уровнем CD8+ клеток тенденция к количественному снижению сохранялась (CD3+8+ ЦТЛ: рак яичников – 14,9 (12,5; 18,8)%, меланома – 15,9 (12,2; 20,2)%, PCOПP – 12,9 (12,5; 13,3)%, PMЖ – 9,5 (6,1; 11,2)%; CD3+CD16+CD56+ НКТ-лимфоциты: рак яичников – 5,5 (3,6; 7,7)%, меланома – 5,3 (3,8; 8,3)%, PCOПP – 2,2 (1,5; 8)%, PMЖ – 6,5 (4,9; 13,4)%). Такую же закономерность наблюдалась и для субпопуляции CD3-CD8+ клеток у больных всех изучаемых форм онкологических заболеваний, причем снижение количества клеток с данным фенотипом наблюдалось от значений выше донорских в группе с высоким уровнем CD8+

клеток (CD3-CD8+: рак яичников –11,1 (6,4; 15,5)%; меланома – 8,9 (6,3; 11,8)%, РСОПР – 13,3 (8,3; 20,2)%, РМЖ –12,8 (9,8; 19,2)%), в группе с нормальными значениями CD8+ лимфоцитов были чуть выше или соответствовали донорским показателям (CD3-CD8+: рак яичников – 11,7 (6,8; 16,1)%; меланома – 7,4 (4,6; 13,7)%, РСОПР – 8,2 (7,2; 12)%, РМЖ –10,6 (5,5; 14,3)%), а в группе с низким уровнем CD8 были ниже донорских (CD3-8+: рак яичников – 4,6 (3,9; 7,9)%; меланома – 7,4 (4,6; 13,7)%, РСОПР – 8,2 (7,3; 10,1)%, РМЖ - 7,4 (6,4; 9,4)%). Уровень NK-клеток у больных всех четырех нозологических форм оставался примерно одинаков во всех группах с различными значениями CD8+ лимфоцитов. Наблюдалось незначительное снижение значения медианы, при этом она оставалась выше донорских показателей (данные в таблице 5). Отличие было обнаружено только в подгруппе пациентов с меланомой с низкими значениями CD8, где происходило резкое снижение значения количества CD3-CD56+CD16+ почти в два раза с 14,6 (12,2; 22,9)% до 6,7 (5,4; 11,7)%. При этом, в группах с разным уровнем экспрессии CD8 статистически достоверной разницы в уровне NK-лимфоцитов не было обнаружено ни при одной нозологии. Таким образом, в большинстве случаев для онкологических больных характерно повышение субпопуляций NK- и NKT-клеток по сравнению с донорскими уровнями, что показано на рисунке 3.



**Рисунок 3** — Визуализация популяций NK- и NKT-лимфоцитов у доноров (слева) и онкологического больного меланомой (справа).

**Таблица 5** — Сравнение субпопуляций эффекторных лимфоцитов у здоровых доноров и онкологических больных. Данные представлены в форме медианы и квартилей.

	CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>
доноры	35,5 (30,6; 41,1)	27 (22,3; 30,7)	8,1 (5,9; 12,1)	15,9 (11,5; 19)	9,4 (5,3; 14,2)
РЯ	34,7 (27,3; 40)	20,8* (12,5; 29,7)	11,1 (6,7; 15,1)	22,6* (14,5; 31,3)	8,5 (4,6; 14,8)
↑ CD8	41,7* (37,8; 48,2)	31 (25,3; 36)	11,1* (6,4; 15,5)	21,6* (15,3; 27,5)	12,8* (8,2; 20,2)
N CD8	31 (28,8; 33,3)	19,2* (9,8; 23,6)	11,7 (6,8; 16,1)	20,9* (13,4; 33,6)	8,4 (4,2; 11)
↓ CD8	22,9* (20,5; 23,5)	14,9* (12,5; 18,8)	4,6* (3,9; 7,9)	15,7 (12; 30,6)	5,5* (3,6; 7,7)
Меланома	35,4 (28,6; 41,1)	27,3 (16,3; 22,6)	7,7 (5,3; 11,1)	14 (10,2; 20,5)	9,7 (6,1; 14,7)
↑ CD8	41,5* (38,9; 45)	32,8 (28,4; 37,1)	8,9 (6,3; 11,8)	14,6 (12,2; 22,9)	12,9* (8,2; 21,3)
N CD8	30 (26,4; 33)	20,8* (13,6; 23,3)	7,4 (4,6; 13,7)	14,1 (9,3; 19,8)	7,6 (5,6; 12,7)
↓ CD8	19,3* (14,6; 22,8)	15,9* (12,2; 20,2)	2,8* (2,2; 4,5)	6,7 (5,4; 11,7)	5,3* (3,8; 8,3)
PCOПP	36,3 (29,1; 45,4)	27,9 (19,4; 39,7)	10,3* (6,2; 14,8)	14,4* (10,3; 24,7)	12,7* (8; 19)
↑ CD8	41,2* (37,6; 45,5)	29,8 (22,8; 33,5)	13,3* (8,3; 20,2)	21,4* (11,5; 26,3)	14,1* (10,3; 18,7)
N CD8	28,5 (25,1; 31,3)	18,6* (13,3; 23,1)	8,2 (7,2; 12)	15,6 (13,1; 24,6)	6,9 (3; 10,5)
↓ CD8	21,1* (16,3; 22,6)	12,9* (12,5; 13,3)	8,2 (7,3; 10,1)	17,4 (11,5; 33,9)	2,2* (1,5; 8)
PMЖ	38,6 (33,4; 45,8)	26* (19; 30,7)	12,6* (8,3; 16,8)	19,3 (11,4; 26,3)	14,8* (8,9; 19,2)
↑ CD8	45,3 * (39,7; 49,5)	29,9 (25,4; 33,8)	12,8* (9,8; 19,2)	17,6 (11,4; 23,8)	15,9* (10,9; 21,4)
N CD8	30,5 (27,8; 33,6)	20,2* (15,9; 23,5)	10,6 (5,5; 14,3)	18,2 (11,5; 26,6)	11,6 (7,8; 17,9)
↓ CD8	18,1* (15,9; 20,8)	9,5* (6,1; 11,2)	7,4* (6,4; 9,4)	16,6 (9; 26,8)	6,5* (4,9; 13,4)

↑ — повышенные значения по сравнению с нормой

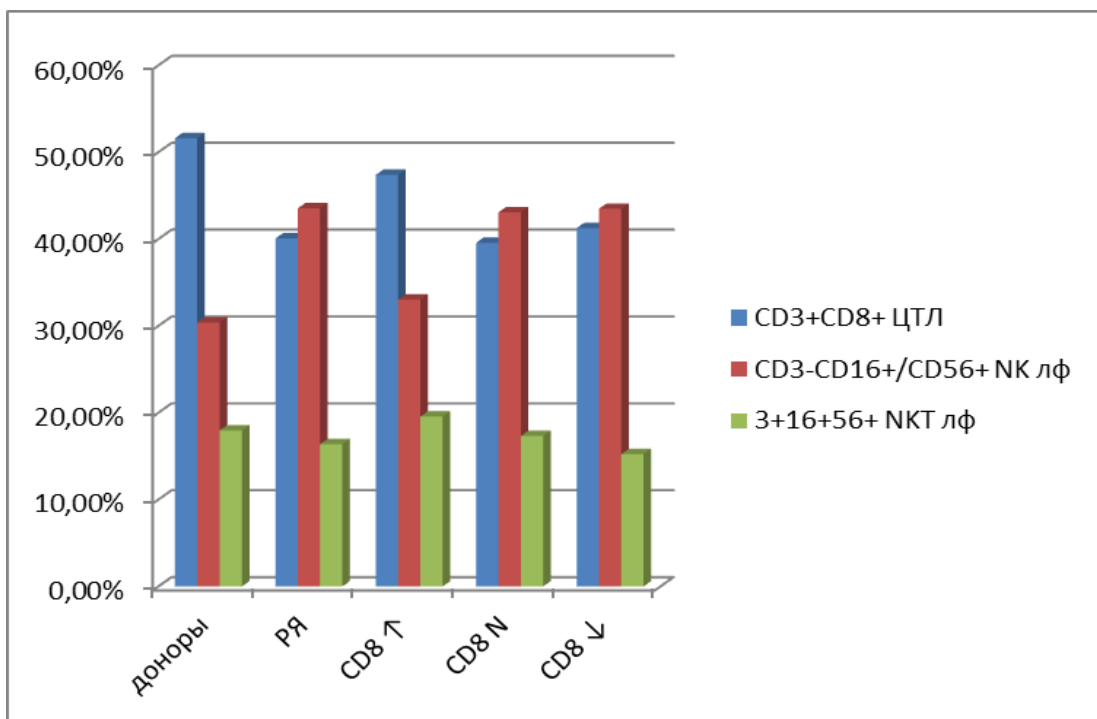
↓ — пониженные значения по сравнению с нормой

N — нормальные значения

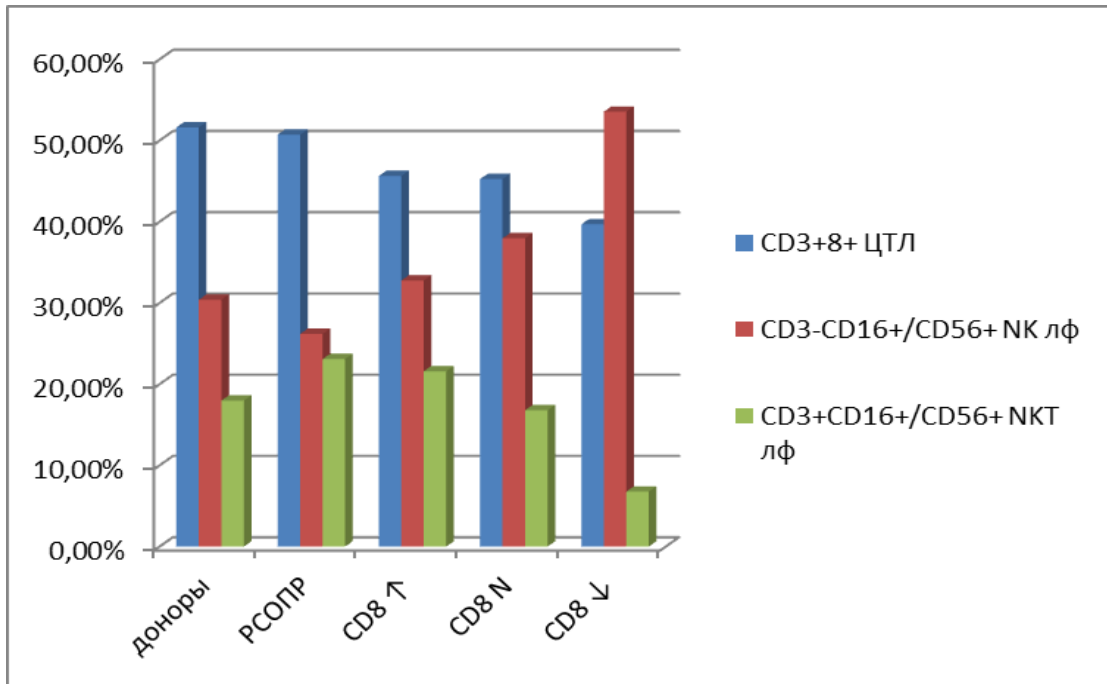
\* - достоверная статистическая разница при сравнении с донорами (p<0,05)



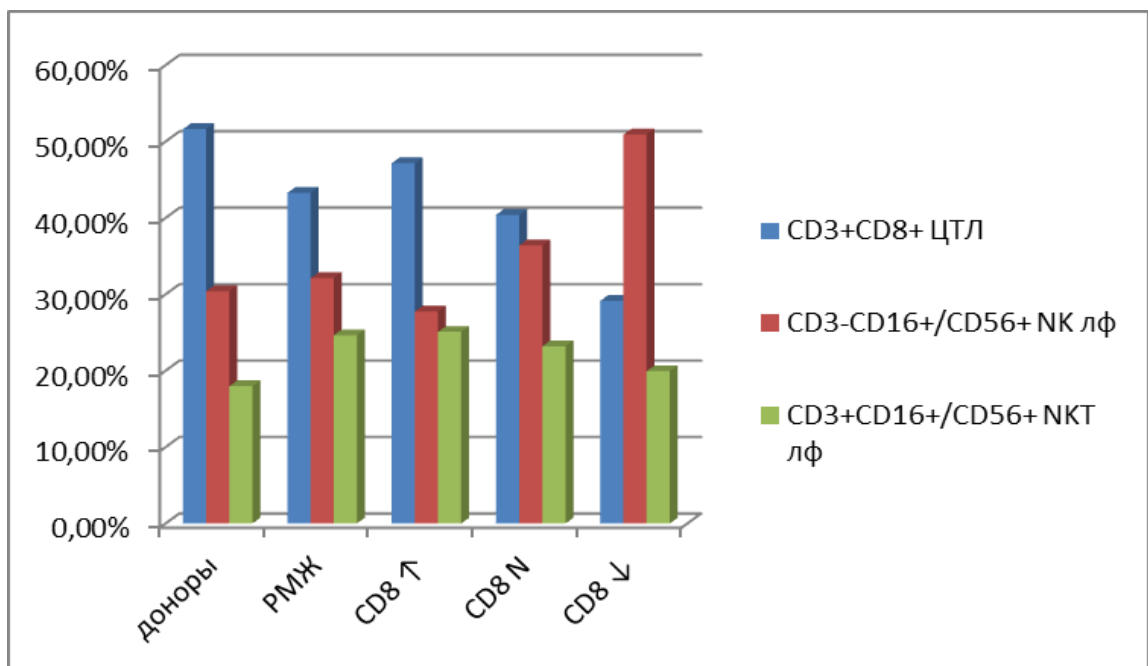
Более наглядно изменение субпопуляционной структуры эффекторных лимфоцитов с изменением экспрессии CD8 можно показать, если принять общее количество эффекторных клеток за 100%, как было рассмотрено в общих группах для каждой нозологии. Оказалось, что в трех из четырех нозологий присутствует общая тенденция к уменьшению количества цитотоксических Т-лимфоцитов от группы к группе со снижением общего количества CD8. Эта закономерность прослеживалась для больных раком яичников, раком слизистой оболочки полости рта и раком молочной железы, причем наиболее значимой она была для последней нозологии (см. рис 4). Одновременно со снижением процентного содержания ЦТЛ, уменьшалась и доля NKT-лимфоцитов при данных заболеваниях. За счет уменьшения долей данных двух популяций, NK-лимфоциты в группе с низкими уровнями CD8+ клеток составляли большую часть эффекторных клеток.



А — Рак яичников



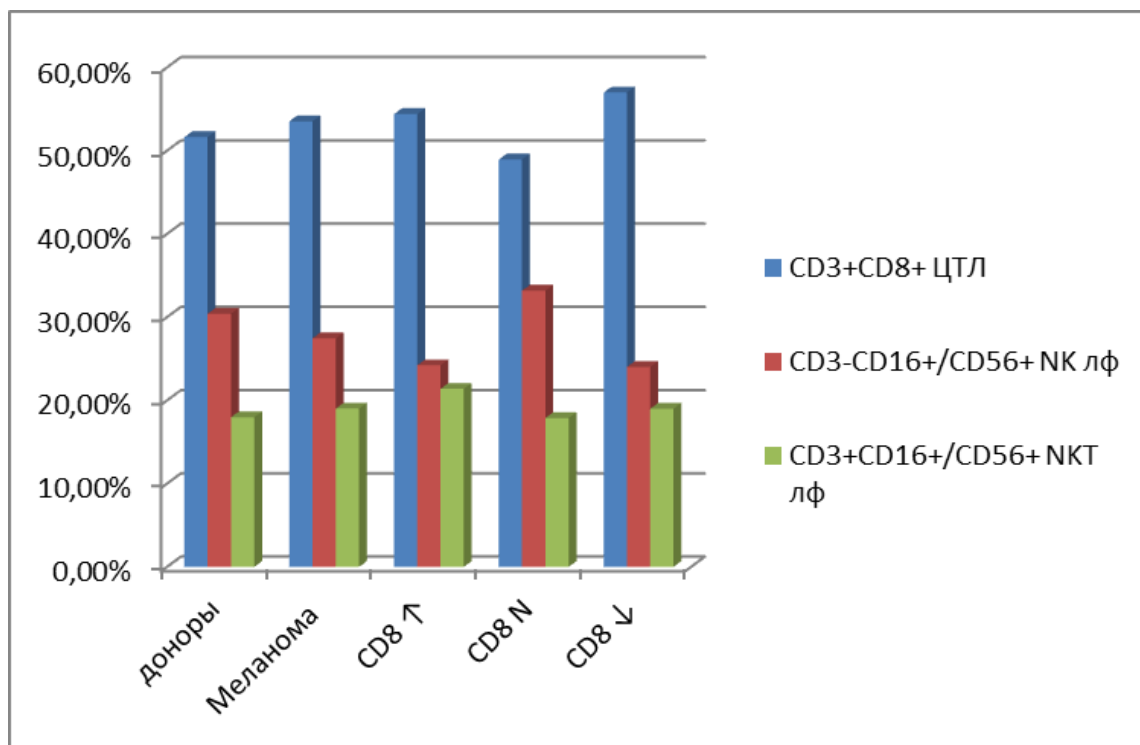
Б — Рак слизистой оболочки полости рта



В — Рак молочной железы

**Рисунок 4** — Процентное соотношение субпопуляций эффекторных клеток при различных нозологиях онкологических заболеваний в зависимости от уровня экспрессии CD8: А – у больных раком яичников, Б – больных раком слизистой оболочки полости рта, В – больных раком молочной железы.

У больных меланомой соотношение между популяциями эффекторных клеток сильно отличалась от предыдущих нозологий. Здесь преобладание цитотоксических Т-лимфоцитов сохранялось во всех группах по содержанию маркера CD8 (54,3%; 48,9% и 56,9%). Уровень NK-лимфоцитов увеличивался в группе с нормальными значениями CD8 (с 24,2% до 33,1%), но при низких значениях этого маркера возвращался к исходному уровню (24,0%). Доля NKT-лимфоцитов лишь незначительно колебалась (с 21,3%; 17,9% и 18,9%) (рис 5).



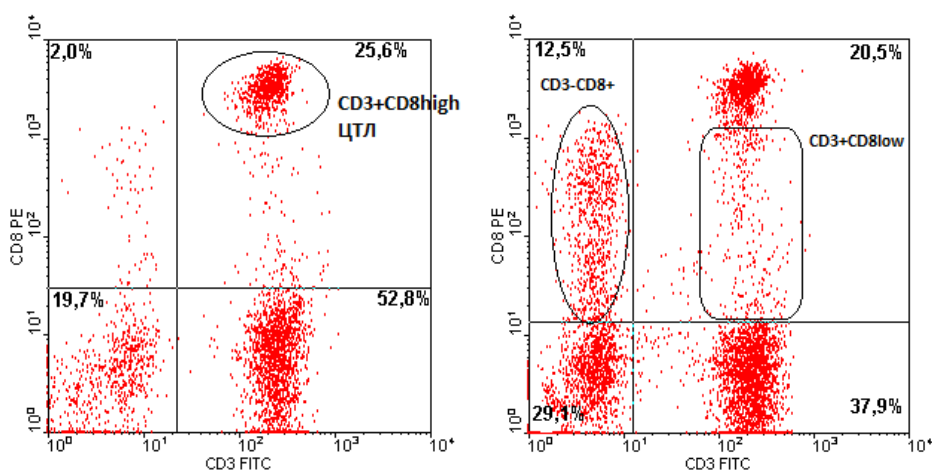
**Рисунок 5** — Процентное соотношение субпопуляций эффекторных клеток у больных меланомой в зависимости от уровня экспрессии CD8.

### **3.2 Субпопуляционное соотношение CD45+лимфоидных клеток с высокой и низкой плотностью поверхностного антигена CD8 у здоровых доноров и онкологических больных**

Для того, чтобы понять, за счет каких клеток происходят колебания общего пула CD8+ клеток, были оценены субпопуляции с высокой экспрессией CD8 (CD8<sup>high</sup>), характерной для ЦТЛ, и низкой (CD8<sup>low</sup>), характерной для NK и NKT-клеток. У доноров значение данных субпопуляций составило 21,9 (19; 24,3)% от общего пула лимфоцитов (61,9% от CD8-позитивных лимфоцитов) и 12,6 (10,9;

17)% (35,5% от CD8+) соответственно. У онкологических больных с повышенным уровнем CD8+ клеток заметно увеличена популяция CD8low по сравнению с донорами (рак яичников – 19,3 (14,2; 24)%, меланома – 16,2 (12,2; 20,2)%, РСОПР – 17,6 (15; 23,8)%, РМЖ – 20,5 (17; 29,1)%) при небольшом повышении содержания CD8high (рак яичников – 24,1 (19,1; 28,5)%, меланома – 25,3 (21,4; 30,2)%, РСОПР – 24,6 (19,9; 29,3)%, РМЖ – 21,8 (16,4; 26,8)%).

При сравнении DotPlot'ов с экспрессией маркеров CD3 и CD8, видно, что у онкологических больных намного более выражена субпопуляция CD3-CD8low и повышено количество CD3+CD8low клеток, что наблюдалось во всех исследуемых нозологических формах (рис 6). В группе больных всех четырех нозологических форм с нормальными значениями CD8+ лимфоцитов наблюдается резкое снижение CD8high субпопуляции (рак яичников – 11,2 (7,6; 19,6)%, меланома – 15,1 (11,6; 19,9)%, РСОПР – 15,9 (12,8; 21,3)%, РМЖ – 15,1 (12,3; 17,4)%) при значениях CD8low чуть выше или на уровне донорских значений (рак яичников – 18,5 (13,3; 22,6)%, меланома – 13,0 (8,3; 17,2)%, РСОПР – 13,3 (10,3; 16,7)%, РМЖ – 15,5 (13,9; 18,7)%). При низких значениях CD8+ клеток продолжается уменьшение количества обеих субпопуляций (CD8high: рак яичников – 11,8 (8,5; 15,1)%, меланома – 12,8 (11,4; 18,7)%, РСОПР – 9 (8,9; 10,1)%, РМЖ – 5(3,9; 5,9)%; CD8low: рак яичника – 9 (7,4; 14,7)%, меланома – 3,8 (3,1; 5,8)%, РСОПР – 11 (7,4; 13,7)%, РМЖ – 9 (7,7; 10,1)%).



**Рисунок 6** — Экспрессия маркеров CD3 и CD8 у доноров (слева) и у онкологического больного меланомой (справа).

**Таблица 6** — Экспрессия маркера CD8<sup>+</sup> на эффекторных клетках у доноров и онкологических больных. Данные представлены в форме медианы и квартилей.

	CD8 <sup>high</sup>	CD8 <sup>low</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>low</sup>
Доноры	21,9 (19; 24,3)	12,6 (10,9; 17)	5,5 (3,9; 7,2)
<b>Рак яичников</b>			
↑ CD8	24,1 (19,1; 28,5)	19,3 (14,2; 24)*	5,8 (4,4; 9,2)
N CD8	11,2 (7,6; 19,6)*	18,5 (13,3; 22,6)*	4,8 (2,8; 9,8)
↓ CD8	11,8 (8,5; 15,1)*	9 (7,4; 14,7)*	4 (2,5; 5,1)*
<b>Меланома</b>			
↑ CD8	25,3 (21,4; 30,2)*	16,2 (12,2; 20,2)*	6,8 (5; 8,5)*
N CD8	15,1 (11,6; 19,9)*	13,0 (8,3; 17,2)	3,4 (1,9; 5,8)
↓ CD8	12,8 (11,4; 18,7)*	3,8 (3,1; 5,8)*	1,8 (0,8; 2,7)*
<b>Рак слизистой оболочки полости рта</b>			
↑ CD8	24,6 (19,9; 29,3)	17,6 (15; 23,8)*	6,1 (4; 8,2)
N CD8	15,9 (12,8; 21,3)*	13,3 (10,3; 16,7)	4,2 (3,1; 5,1)*
↓ CD8	9 (8,9; 10,1)*	11 (7,4; 13,7)	2,9(2,8; 3,6)*
<b>Рак молочной железы</b>			
↑ CD8	21,8 (16,4; 26,8)	20,5 (17; 29,1)*	6,6 (3,7; 9,2)*
N CD8	15,1 (12,3; 17,4)*	15,5 (13,9; 18,7)	4,9 (3,1; 5,5)
↓ CD8	5(3,9; 5,9)*	9 (7,7; 10,1)*	2,6 (1,5; 3,2)*

↑ — повышенные значения по сравнению с нормой

↓ — пониженные значения по сравнению с нормой

N — нормальные значения

\* - разница при сравнении с донорами статистически значима (p<0,05)

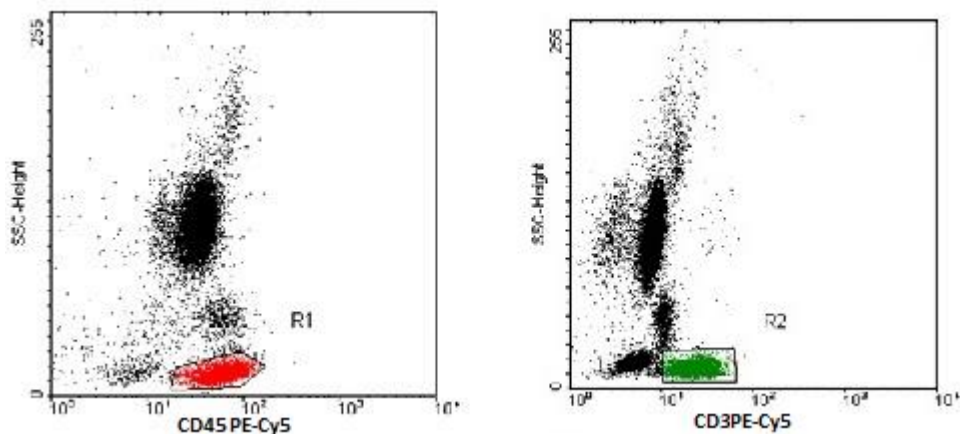
### **3.3 Субпопуляционное соотношение CD45+лимфоидных клеток с экспрессией поверхностного антигена CD16 у здоровых доноров и онкологических больных**

У доноров были оценены количественные значения CD3-CD8+ (8,1 (5,9; 12,1)%), CD3-CD16+CD56+ (15,9 (11,5; 19)%), CD3+CD16+CD56+ (9,4 (5,3; 14,2)%) клеток. Как было описано ранее, количества основных субпопуляций эффекторных клеток близки к донорским показателям (см. раздел 3.1). Исключение составляет лишь количество клеток с фенотипом CD3+16+56+ у больных раком слизистой полости рта и раком молочной железы (рак яичников – 8,5 (4,6; 14,8)%, меланома – 9,7 (6,1; 14,7)%, РСОПР – 12,7 (8; 19)%, РМЖ - 14,8 (8,9; 19,2)%) и небольшое повышение CD3-CD8+ субпопуляции в трех из четырех нозологий (рак яичников – 11,1 (6,7; 15,1)%, меланома – 7,7 (5,3; 11,1)%, РСОПР – 10,3 (6,2; 14,8)%, РМЖ - 12,6 (8,3; 16,8)%), что согласно предыдущим исследованиям указывает на повышение количества НК-лимфоцитов. При анализе данной субпопуляции набором CD3/CD16&56, оказалось, что у больных раком яичников и раком молочной железы было повышено количество CD3-CD16+56+NК-клеток (22,6 (14,5; 31,3)% и 19,3 (11,4; 26,3)%), а при остальных нозологиях значения также были близки к нормальным (меланома - 14 (10,2; 20,5)%, РСОПР - 14,4 (10,3; 24,7)%).

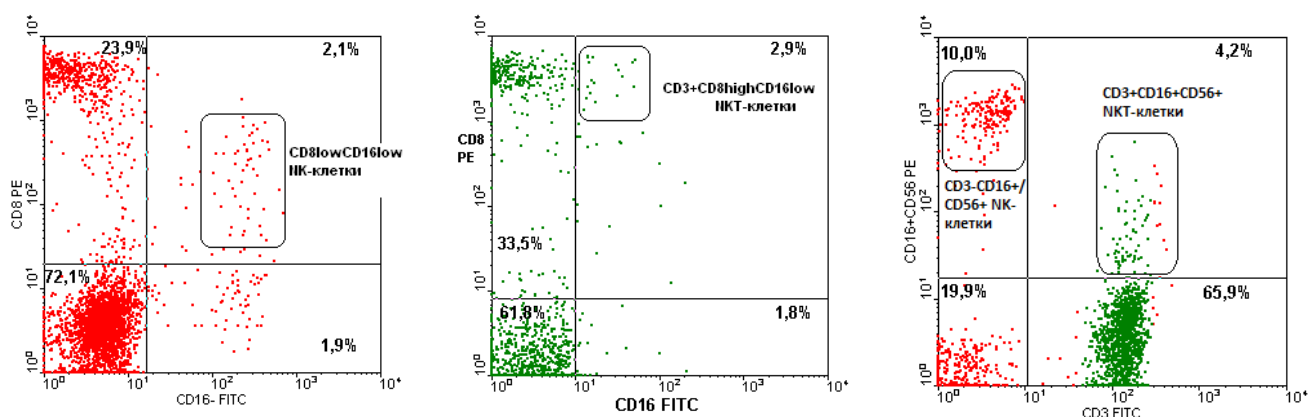
### **3.4 Коэкспрессия CD8, CD16 и CD3 на лимфоидных CD45+ клетках у здоровых доноров и онкологических больных**

Так как молекула CD8 экспрессируется в той или иной степени на всех эффекторных клетках, была проанализирована коэкспрессия этого маркера с молекулой CD16 на лимфоцитах. У здоровых доноров количество двойных позитивных по этим молекулам клеток составило 9,1 (5,6; 13,7)%. Из рисунка 7 видно, что основную массу лимфоцитов, коэкспрессирующих CD8 и CD16 составляют CD8<sup>low</sup>CD16<sup>low</sup> клетки. Субпопуляция CD8<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup> выражена слабо и не превышает 5% у здоровых доноров. При анализе коэкспрессии данных

маркеров внутри популяции CD3-позитивных лимфоцитов, видно, что CD8<sup>low</sup>CD16<sup>low</sup> клетки отсутствуют, что позволяет отнести данную субпопуляцию к NK-лимфоцитам. Клетки с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup> согласно этой логике относятся к NKT-лимфоцитам, хотя некоторое их количество экспрессирует молекулу CD8 в меньшей степени (CD8<sup>low</sup>), что характерно для онкологических больных. Для сравнения представлен DotPlot, на котором визуализированы популяции NK и NKT-лимфоцитов при анализе с помощью набора антител CD3/CD16&CD56. Низкое количество CD8<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup> клеток объясняется низкими значениями количественной нормы NKT-лимфоцитов. Необходимо заметить, что количество двойных позитивных клеток всегда ниже, чем количество NK- и NKT лимфоцитов, определяемых с помощью набора CD3/CD16&56, так как не все NK и NKT-лимфоциты экспрессируют CD8 на своей поверхности (см. таблицу 7).



А



Б

**Рисунок 7** — Анализ коэкспрессии маркеров CD8 и CD16 у здоровых доноров. А – последовательное гейтирование CD45<sup>+</sup> лимфоцитов и CD3<sup>+</sup> клеток. Б – Сравнение коэкспрессии маркеров в популяции CD45<sup>+</sup> лимфоцитов (слева) и CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (по центру), выделенных методом последовательного гейтирования. Для сравнения представлен дот-плот, на котором визуализированы популяции НК и НКТ-лимфоцитов при анализе с помощью набора антител CD3/CD16&56(справа). CD3<sup>+</sup> лимфоциты выделены зеленым цветом.



**Таблица 7** — сравнительная характеристика коэкспрессии маркеров CD8 и CD16 у доноров и онкологических больных

	CD8+CD16+ (Ме и квартили)	CD3-CD16+CD56+ (Ме и квартили)
<b>доноры</b>	9,1 (5,6; 13,7)	15,9 (11,5; 19)
<b>РЯ</b>	8,0 (5,4; 11,4)	22,6 (14,5; 31,3)*
↑ CD8	10,7 (6,5; 15,6)*	21,6 (15,3; 27,5)*
N CD8	7,4 (4,8; 10,7)	20,9 (13,4; 33,6)*
↓ CD8	3,2 (2,6; 5,6)*	15,7 (12; 30,6)
<b>Меланома</b>	6,7 (4,3; 9,8)	14 (10,2; 20,5)
↑ CD8	8,8 (6,5; 13,5)	14,6 (12,2; 22,9)
N CD8	5,7 (3,9; 8,8)	14,1 (9,3; 19,8)
↓ CD8	2,3 (2,0; 3,4)*	6,7 (5,4; 11,7)
<b>РСОПР</b>	8,7 (5,1; 11,4)*	14,4 (10,3; 24,7)*
↑ CD8	11,2 (7,0; 13,2)*	21,4 (11,5; 26,3)*
N CD8	5,5 (4,7; 7,2)*	15,6 (13,1; 24,6)
↓ CD8	6,0 (5,1; 7,2)	17,4 (11,5; 33,9)
<b>РМЖ</b>	8,9 (6,0; 13,6)	19,3 (11,4; 26,3)
↑ CD8	11,5 (6,8; 15,4)*	17,6 (11,4; 23,8)
N CD8	8,2 (6,2; 12,7)	18,2 (11,5; 26,6)
↓ CD8	10,1 (6,7; 15,2)	16,6 (9; 26,8)

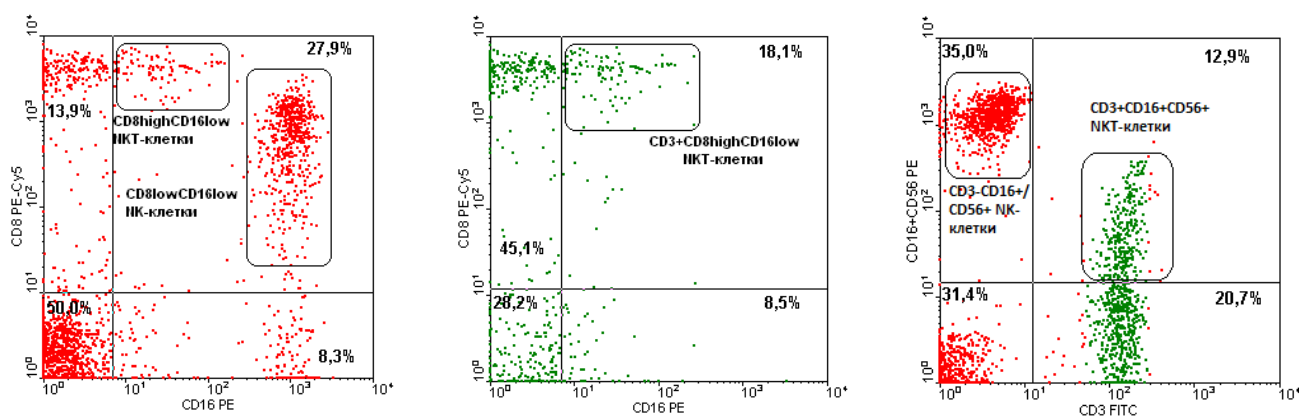
↑ — повышенные значения по сравнению с нормой

↓ — пониженные значения по сравнению с нормой

N — нормальные значения

\* - статистически значимая разница при сравнении с донорами ( $p < 0,05$ )

У онкологических больных при повышенных значениях CD8-положительных клеток за счет повышения количеств НК и НКТ-лимфоцитов изменяется и коэкспрессия маркеров CD8 и CD16. Количество CD8/CD16-положительных клеток незначительно увеличено по сравнению с донорами (рак яичников – 10,7 (6,5; 15,6)%; меланома – 8,8 (6,5; 13,5)%; РСОПР – 11,2 (7,0; 13,2)%, РМЖ - 11,5 (6,8; 15,4)%) (рисунок 8). Большинство CD8+CD16+ лимфоцитов так же составляют CD8<sup>low</sup>CD16<sup>low</sup>-клетки, однако их количество повышено, и данная популяция четко визуализируется на DotPlot. Увеличено и количество CD8<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup>-лимфоцитов, относящихся к НКТ-клеткам. Данные изменения отражены и на DotPlot с анализом коэкспрессии маркеров CD3 и CD16&CD56, где визуализируется резкое повышение популяций натуральных киллеров и НКТ-лимфоцитов.



**Рисунок 8** — Анализ коэкспрессии маркеров CD8 и CD16 у онкологических больных с повышенными значениями CD8 в популяции CD45<sup>+</sup> лимфоцитов (слева) и CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (по центру), выделенных методом последовательного гейтирования. Для сравнения представлен DotPlot, на котором визуализированы популяции НК и НКТ-лимфоцитов при анализе с помощью набора антител CD3/CD16&56(справа). CD3<sup>+</sup> лимфоциты выделены зеленым цветом.

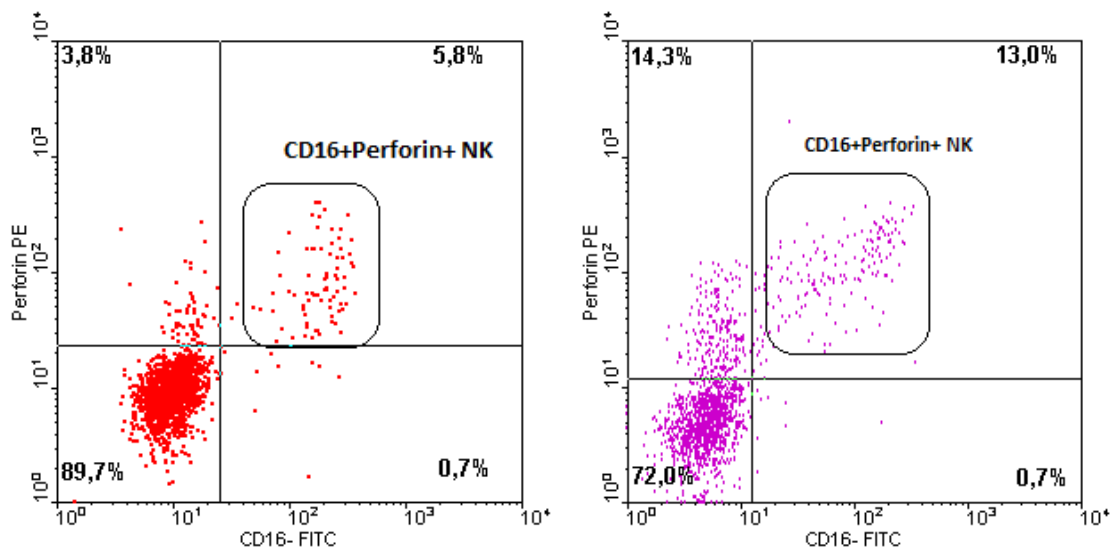
В группах с нормальным количеством CD8-положительных клеток, количество клеток, коэкспрессирующих маркеры CD8 и CD16 соответствуют донорским или понижены (рак яичников – 7,4 (4,8; 10,7)%; меланома – 5,7 (3,9; 8,8)%; РСОПР – 5,5 (4,7; 7,2)%, РМЖ - 8,2 (6,2; 12,7)%). В группе с пониженными

значениями общего CD8 значения CD8+CD16+ клеток также находятся в диапазоне нормы или понижены (рак яичников – 3,2(2,6; 5,6)%; меланома – 2,3 (2,0; 3,4)%; РСОПР – 6,0 (5,1; 7,2)%, РМЖ - 10,1 (6,7; 15,2)%). Таким образом, видно, что колебания количеств двойных позитивных по этим маркерам клеток в целом соответствуют изменениям числа НК-лимфоцитов в периферической крови онкологических больных в группах по уровню содержания CD8-положительных клеток, так как натуральные киллеры представляют собой большинство CD8+CD16+ лимфоцитов. В общих группах без деления по количеству CD8-положительных клеток, как и в случаях с анализом других субпопуляций, уровень данных клеток оказывается в диапазоне нормы (таблица 7).

### **3.5 Субпопуляционное содержание внутриклеточного перфорина в CD45+CD8+high, CD45+CD8+low, CD45+CD16+high, CD45+CD16+low, CD45+CD8+CD16+ клетках здоровых доноров и онкологических больных**

Для оценки функциональной активности эффекторных клеток было проведено исследование содержания внутриклеточного перфорина. У доноров значения CD16+ и CD8+ перфорин-позитивных клеток составили 16,8 (13; 21,7)% и 14,8 (9,6; 19,8)% соответственно. Практически все НК-клетки доноров содержат перфорин (93 (87,8; 95,2)%), в то время как CD8+ Т-клетки (ЦТЛ и НКТ) экспрессировали перфорин в 44,8 (35,4; 56,8)% случаев. У онкологических больных во всех подгруппах количество CD16+Perforin+ клеток практически повторяло значения CD3-CD16+CD56+ НК клеток, что позволяет сказать, что практически все натуральные киллеры содержат перфорин и являются эффекторными, что видно и при анализе DotPlot'ов (рисунок 9). Значения CD16+Perforin+ клеток было примерно равно донорскому уровню, как в общих группах различных нозологий (рак яичника – 16,1 (10,9; 23,6)%, меланома – 16,2 (11,7; 20,4)%, РСОПР – 18,3 (12,9; 23,5)%, РМЖ – 18,3 (14,2; 24,6)%), так и в группах по экспрессии маркера CD8 (см. таблицу 8). Следует заметить, что количество перфорин-позитивных CD16+ клеток было снижено лишь у больных меланомой при низких значениях CD8-положительных клеток, так как это

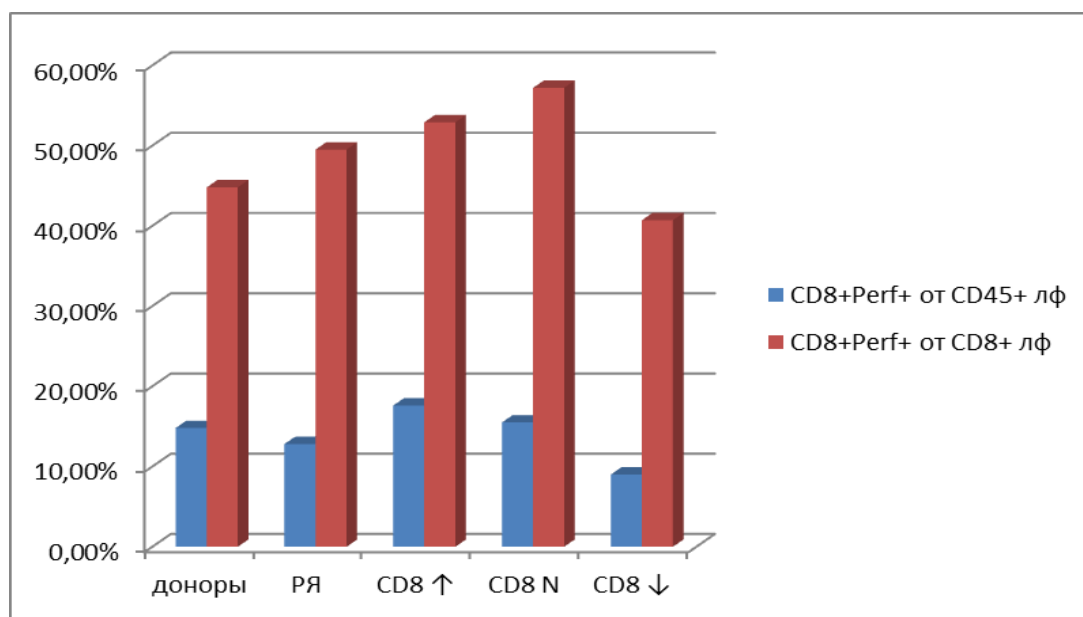
единственная подгруппа, где наблюдалось снижение количества НК-лимфоцитов (цифры приведены ранее в таблице 5 раздела 3.1.). Доля активных (перфоринсодержащих) клеток всех CD16+ лимфоцитов во всех подгруппах менялась незначительно и была сопоставима с донорским уровнем (рак яичников – CD8↑: 90,9 (80,8; 94,8)%, CD8 N: 88,6 (76,8; 94,9)%, CD8↓: 83,6 (75,7; 96,6)%, меланома – CD8↑: 91,2 (80,5; 94,3)%, CD8 N: 88,5 (75; 93,2)%, CD8↓: 85,8 (75; 87,5)%, РСОПР – CD8↑: 91,4 (87,2; 95,7)%, CD8 N: 96,2 (79,1; 96,8)%, CD8↓: 96,2 (79,1; 97,4)%, РМЖ – CD8↑: 88,8 (79,7; 93,3)%, CD8 N: 91,9 (82,7; 96,1)%, CD8↓: 96,5 (93,6; 97)%). У отдельных пациентов была зафиксирована увеличенная популяция клеток CD16+Perforin-, но она не превышала 5-10%. Вышеприведенные данные позволяют сделать вывод, что содержание перфорин-позитивных НК-лимфоцитов практически не меняется у онкологических больных.



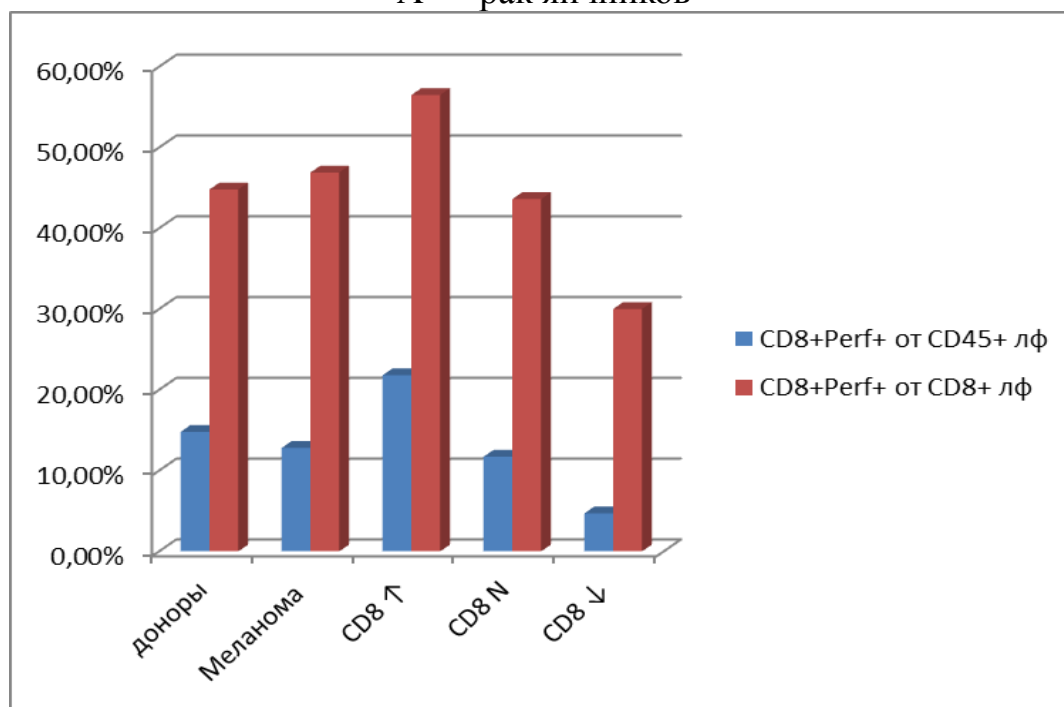
**Рисунок 9** — Коэкспрессия CD16 и перфорина у донора (слева) и больного раком слизистой оболочки полости рта (справа).

При анализе количества CD8+Perforin+ клеток были выявлены резкие отличия в его экспрессии у доноров и онкологических больных. В общих группах количество двойных позитивных по этим молекулам клеток было сопоставимо с донорскими показателями. При подробном анализе в подгруппах оказалось, что по мере снижения количества CD8+ лимфоцитов уменьшалось и количество перфорин-содержащих CD8+ клеток (данные представлены в таблице 8), при этом

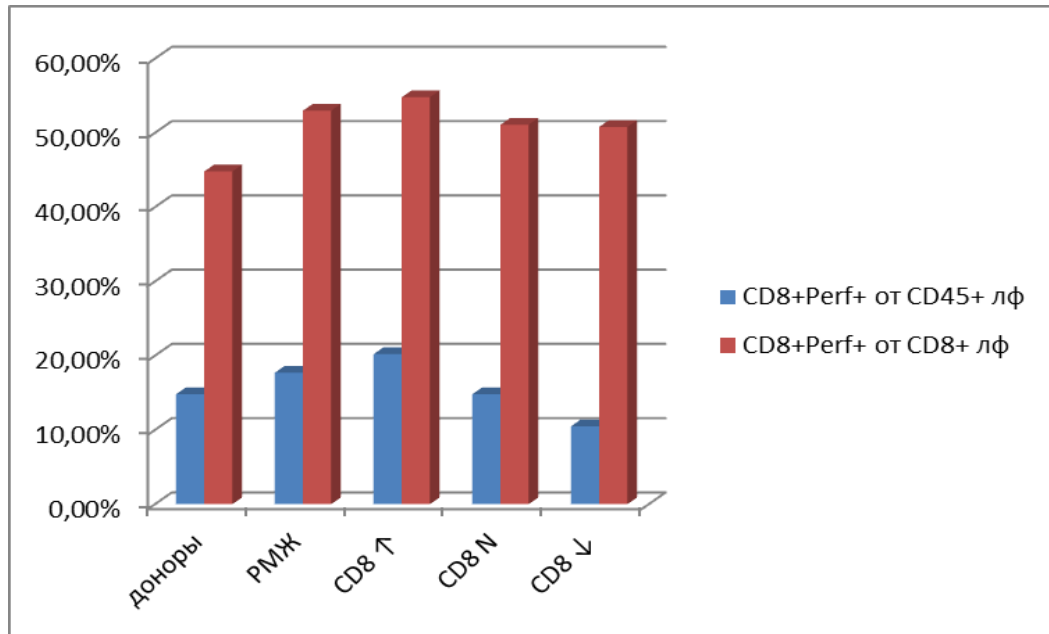
в группе с высоким количеством CD8-положительных клеток было повышено значение активных CD8 клеток (рак яичника – 52,9 (32,0; 68,5)%, меланома – 56,5 (40,2; 61,7)%, РСОПР – 59,7 (49,7; 67,8)%, РМЖ – 54,8 (44,8; 60,4)%). У больных раком слизистой оболочки полости рта и раком молочной железы процент активных CD8 клеток не снижался в группах по мере снижения экспрессии CD8 (данные в таблице 8 и рисунок 10), в то время как у больных раком яичников и меланомой он достигал нормальных и более низких значений (рак яичников – 40,7 (30,1; 54,8)%, меланома – 30 (22,5; 45,4)%).



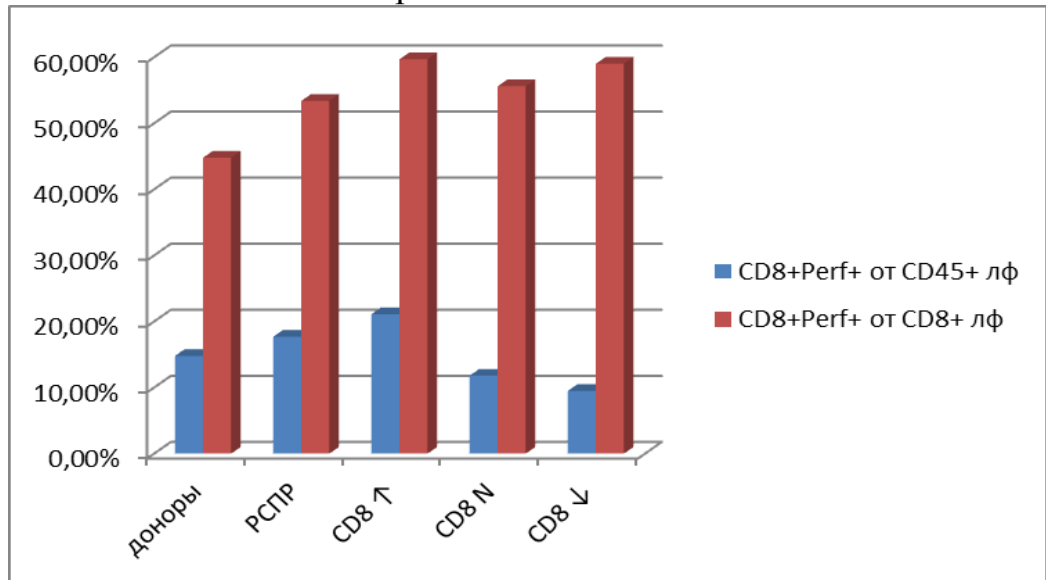
А — рак яичников



Б — меланома



В — рак молочной железы



Г — рак слизистой оболочки полости рта.

**Рисунок 10** — Изменение количества перфорин-содержащих CD8+ эффекторных лимфоцитов и процентного количества активных цитотоксических CD8+ лимфоцитов по группам с различным содержанием CD8.

А — рак яичников; Б — меланома; В — рак молочной железы; Г — рак слизистой оболочки полости рта.

**Таблица 8** — Экспрессия перфорина в CD16<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетках у доноров и онкологических больных.

	CD16 <sup>+</sup> P <sup>+</sup> (Me и квартили)	act CD16 <sup>+</sup> клетки (Me и квартили)	CD8 <sup>+</sup> P <sup>+</sup> (Me и квартили)	Act CD8 <sup>+</sup> клетки (Me и квартили)
<b>доноры</b>	16,8 (13; 21,7)	93 (87,8; 95,2)	14,8 (9,6; 19,8)	44,8 (35,4; 56,8)
<b>РЯ</b>	16,1 (10,9; 23,6)	86,1 (67,3; 93,9)	12,8 (10; 18,4)	49,5 (33,1; 62,3)*
↑ CD8	19,9 (14,8; 30,1)*	90,9 (80,8; 94,8)	17,6 (11,3; 24,7)*	52,9 (32,0; 68,5)*
N CD8	16,9 (12; 24,3)	88,6 (76,8; 94,9)*	15,5 (12,5; 18,7)	57,2 (49,5; 65,2)*
↓ CD8	16,3 (11,5; 23,7)	83,6 (75,7; 96,6)*	9 (5,5; 13,1)*	40,7 (30,1; 54,8)
<b>Меланома</b>	16,2 (11,7; 20,4)	89,5 (79,1; 94,1)*	12,8 (9,4; 19,9)	46,9 (33,5; 58,7)
↑ CD8	18,4 (13,9; 22,6)*	91,2 (80,5; 94,3)	21,8 (15,2; 25,1)*	56,5 (40,2; 61,7)
N CD8	16,7 (11,3; 20,4)	88,5 (75; 93,2)*	11,7 (7,3; 14)*	43,6 (27,9; 53,2)
↓ CD8	9,2 (4,2; 17)*	85,8 (75; 87,5)*	4,7 (3,8; 10)*	30 (22,5; 45,4)
<b>РСОПР</b>	18,3 (12,9; 23,5)*	88 (77,5; 93,5)*	17,7 (13,1; 23,4)*	53,4 (42,7; 60,6)*
↑ CD8	24,6 (18,8; 30,2)*	91,4 (87,2; 95,7)*	21,1 (17,9; 26,3)*	59,7 (49,7; 67,8)*
N CD8	17,6 (14,4; 32,8)	96,2 (79,1; 96,8)	11,8 (9,5; 15,5)	55,6 (50,2; 60,5)
↓ CD8	33,8 (18,3; 44,7)	96,2 (79,1; 97,4)	9,5 (9,5; 17)*	59 (55,6; 60,5)*
<b>РМЖ</b>	18,3 (14,2; 24,6)	87,6 (75,4; 92,2)	17,7 (13,6; 22)	53 (44,8; 60,4)*
↑ CD8	18,7 (15,1; 26,4)*	88,8 (79,7; 93,3)*	20,2 (17,4; 22,8)*	54,8 (44,8; 60,4)*
N CD8	16,4 (12,8; 23,2)	91,9 (82,7; 96,1)	14,8 (12,2; 18)	51,1 (45,6; 64,6)*
↓ CD8	15,7 (12,2; 16)	96,5 (93,6; 97)*	10,5 (7,9; 13,2)*	50,8 (42,4; 62,1)*

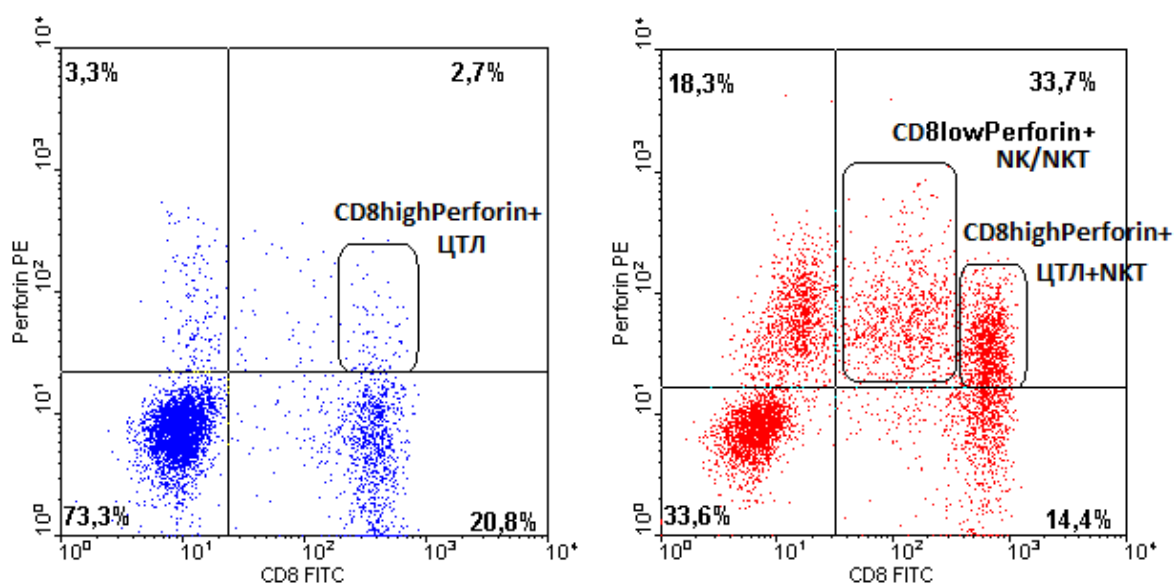
↑ — повышенные значения по сравнению с нормой

↓ — пониженные значения по сравнению с нормой

N — нормальные значения

\* - статистически достоверная разница с донорами ( $p < 0,05$ )

Присутствуют существенные различия в степени экспрессии маркера CD8 у перфорин-позитивных клеток здоровых доноров и онкологических больных (рис 11). Ярким отличием является отсутствие у доноров популяции CD8LowPerforin+, в то время как она присутствует у всех онкологических больных (7,7 (5,4; 12)%), что происходит за счет увеличения количества CD8+ NK и NKT клеток, экспрессирующих CD8 в низкой и средней степени. За счет повышения количества NK-лимфоцитов увеличена и субпопуляция CD8-Perforin+. Также, характерной особенностью является и увеличение количества CD8high цитотоксических клеток, несущих перфорин при высоком содержании CD8+ клеток.

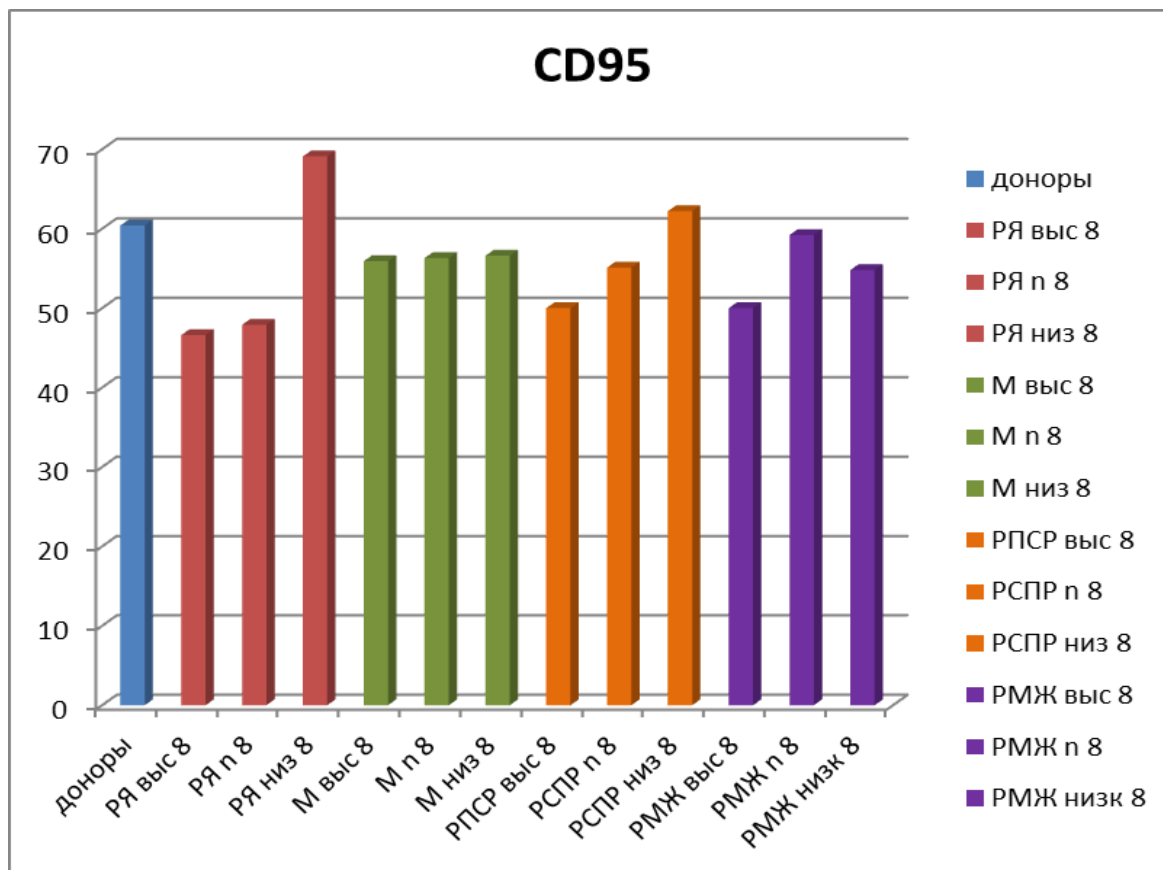


**Рисунок 11** — Коекспрессия CD8 и перфорина у донора (слева) и больного раком слизистой оболочки полости рта (справа). Выделена субпопуляция CD8lowPerforin+, отсутствующая у здоровых доноров.

При анализе экспрессии молекулы CD95 на всех лимфоцитах, оказалось, что при сравнении доноров и групп больных по различным нозологиям, CD95 был всегда снижен по сравнению с донорами. Если рассматривать изменение экспрессии с изменением количества CD8-положительных лимфоцитов, то видно, что количество обратно растет с уменьшением содержания CD8 (рис 12). Количество лимфоцитов, коэкспрессирующих CD95 и CD8 в нашем исследовании



равнялось 9,5 (6,5; 14,6)%. При этом коэкпрессия этих маркеров также снижалась за счет уменьшения общего количества CD8, что позволяет сделать вывод, что рост экспрессии CD95 происходит за счет клеток, не являющихся эффекторными (таблица 9).



**Рисунок 12** — Изменение уровня экспрессии CD95 в группах с различным содержанием CD8.

**Таблица 9** — Уровень экспрессии CD95 и коэкспрессии CD95 и CD8 у доноров и онкологических больных.

	CD95 <sup>+</sup> (Мед и квартили)	CD95 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (Мед и квартили)
доноры	60,4 (52,7; 69,1)	9,5 (6,5; 14,6)
РЯ общ	48,2 (40,1; 55,7)*	—
↑ CD8	46,6 (36,6; 56,8)*	—
N CD8	47,9 (44; 56,8)*	—
↓ CD8	69,1 (55,2; 76,6)*	—
Меланома	57,8 (47,6; 65,7)*	7,4 (3,6; 13,7)
↑ CD8	55,9 (47,9; 64,4)*	8,4 (5,1; 19,9)*
N CD8	56,3 (47,6; 64,8)	8,2 (4,7; 13)
↓ CD8	56,6 (45,1; 76,7)	5,2 (3,1; 9,3)*
PCOPP	48,8 (41,7; 57,4)*	14,9 (8,4; 24,5)*
↑ CD8	50 (34,3; 56,6)*	9,2 (4; 20)
N CD8	55,1 (51,3; 67)	7,4 (3,7; 19,2)
↓ CD8	62,2 (51,3; 80,4)	3,7 (3,6; 6,5)*
PMЖ	55,5 (45,9; 62,7)*	13,8 (8,3; 24,4)*
↑ CD8	50 (45,2; 62,4)*	13,5 (8,3; 29,1)*
N CD8	59,2 (48,8; 66)	12,6 (9,5; 16,5)
↓ CD8	54,8 (48,8; 56,7)	10,5 (7,1; 14,1)*

↑ — повышенные значения по сравнению с нормой

↓ — пониженные значения по сравнению с нормой

N — нормальные значения

### 3.6 Сравнение субпопуляционной структуры эффекторных лимфоцитов доноров и онкологических больных с различными стадиями опухолевого процесса

Для того, чтобы выяснить, какую роль играет специфический и неспецифический иммунный ответ на различных стадиях опухолевого роста, был проведен анализ субпопуляций эффекторных лимфоцитов у первично-операбельных больных раком слизистой полости рта и раком молочной железы. Большинство из больных РСОР (47) обладали I-II стадией, что составляет 65,2% от выборки, в то время как III-IV стадия была зафиксирована у 25 (34,8%) пациентов. Количество больных с первой стадией составило 14 человек (19,4%), со второй – 32 (44,4%), с третьей – 18 (25%) и с четвертой – 8 (11,1%). Также были проанализированы образцы крови 144 больных РМЖ, среди которых первая-вторая стадия была выявлена у 114 пациенток (79,2%), а третья стадия – у 30 (20,8%). Четвертой стадии у больных раком молочной железы не наблюдалось. Все данные приведены в следующей таблице.

**Таблица 10** — Распределение больных по стадиям опухолевого процесса

Нозология	РСОР				РМЖ			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
Стадия								
Количество	14	32	18	8	45	69	30	0
%	19,4%	44,4%	25%	11,1%	31,2%	47,9%	20,8%	0%

При исследовании больных РСОР оказалось, что по содержанию общего маркера CD8 I-II и III-IV стадии достоверно не отличаются между собой и с донорами, хотя медиана CD8 на III-IV стадии была несколько выше (I-II: 36,2 (25,7; 41,1)%, III-IV 41,3 (34,7; 44,9)%, доноры - 35,6 (30,5; 41,2)%). При анализе популяции ЦТЛ было показано, что медианы количества CD3+CD8+ клеток у больных I-II стадий и доноров сильно различаются (19,4 (13,3; 26,8)% и 27,1(22,2; 31,0)% соответственно), но различия статистически недостоверны. При этом значимой оказались различия при сравнении количества ЦТЛ между I-II и III-IV стадиями (медиана III-IV составила 32,2(28,5; 41,2)%).

Статистически достоверными различия оказались при сравнении показателей врожденного иммунитета. По экспрессии общего CD16 была

выявлены достоверные различия между больными I-II стадий РСОПР и донорами (25,0 (21,0; 30,0)% и 18,8 (14,4; 23,9)% соответственно). У больных III-IV стадий количество CD16+ лимфоцитов было близко к донорскому (17,3(16,2; 18,8)%). Количество NKT-лимфоцитов при первой-второй стадиях РСОПР составило 9,6 (7,7; 12,8)% при донорском показателе 9,4 (5,1; 14,3)%, что оказалось статистически значимой различием. При этом число лимфоцитов, коэкспрессирующих CD3 и CD16/56 у больных III-IV стадий составила 17,2 (9,0; 20,8)%, но различие оказалось недостоверным как при сравнении с донорами, так и с больными I-II стадий. Анализируя коэкспрессию молекул CD8 и CD16, выяснилось, что у больных III-IV стадий РСОПР количество двойных позитивных по этим маркерам лимфоцитов значительно ниже, чем у пациентов I-II стадий и доноров, что может быть объяснено снижением количества NK-лимфоцитов (см. таблицу 11). При этом, статистически значимого различия количества NK-лимфоцитов не было найдено.

У больных первой-второй стадий опухолевого процесса оказалось выше количество перфорин-позитивных CD16+ лимфоцитов (22,9 (17,3; 25,6)%), при том, что у пациентов III-IV стадий этот показатель был близок к донорскому (III-IV: 15,4(12,3; 18,3)%; доноры: 16,4 (13,0; 21,7)%). Однако, при этом доля перфоринсодержащих CD16+ лимфоцитов у больных первой-второй стадий была достоверно ниже, чем донорские показатели (87,6(79,1; 91,6)% и 93,1(87,9; 95,2)%). Из таблицы видно, что медианы количеств перфорин-позитивных CD8 лимфоцитов и доли перфоринпозитивных CD8+ клеток повышались у больных III-IV стадий, хотя статистически разница была недостоверна.

При наличии онкологического заболевания на всех стадиях было достоверно понижено количество CD95 (I-II: 56,7 (44,7; 63,6)%, III-IV: 42,5 (41,0; 53,8)%, доноры: 60,4 (52,7; 69,1)%). Между больными разных стадий различия в CD95 значимыми не были. При анализе коэкспрессии CD95 и CD8, напротив, было показано достоверное увеличение данных маркеров при РСОПР по сравнению с донорами (I-II: 9,8 (6,5; 17,9)%, III-IV: 14,4 (12,4; 21,8)%, доноры: 9,5 (6,5; 14,6)%). Все данные представлены в таблице 11.

**Таблица 11** — Сравнение субпопуляций эффекторных лимфоцитов и функциональной активности у больных различных стадий рака слизистой оболочки полости рта и доноров. P – уровень значимости при сравнении значений по критерию Манна-Уитни.

Показатель	Стадии 1-2 (Me и квартили)	Стадии 3-4 (Me и квартили)	Доноры (Me и квартили)	P <sup>1-2</sup> с донорами	P <sup>3-4</sup> с донорами	p(1-2 с 3-4)
<b>CD3+</b>	76,4 (58,8; 81,8)	76,0 (72,2; 79,7)	72,8 (67,7; 78,7)	0,391429	0,327441	0,606498
<b>CD3+CD4+</b>	43,0 (38,3; 49,7)	40,6 (31,2; 44,6)	39,9 (32,8; 47,5)	<b>0,037402</b>	0,471850	0,302937
<b>CD3+CD8+</b>	19,4 (13,3; 26,8)	32,2 (28,5; 41,2)	27,1 (22,2; 31,0)	0,056844	0,238345	<b>0,035735</b>
<b>CD3-CD8+</b>	9,5 (6,6; 14,8)	7,8 (6,2; 11,0)	8,1 (5,9; 12,3)	0,595736	0,645758	0,500589
<b>CD8+</b>	36,2 (25,7; 41,1)	41,3 (34,7; 44,9)	35,6 (30,5; 41,2)	0,327352	0,337410	0,122290
<b>CD3-CD16+CD56+</b>	14,4 (9,7; 26,1)	12,7 (10,1; 17,0)	16,0 (11,5; 19,0)	0,138129	0,810467	0,362142
<b>CD3+CD16+CD56+</b>	9,6 (7,7; 12,8)	17,2 (9,0; 20,8)	9,4 (5,1; 14,3)	<b>0,022289</b>	0,984055	0,191041
<b>CD95+</b>	56,7 (44,7; 63,6)	42,5 (41,0; 53,8)	60,4 (52,7; 69,1)	<b>0,000008</b>	<b>0,002791</b>	0,132167
<b>CD95+CD8+</b>	9,8 (6,5; 17,9)	14,4 (12,4; 21,8)	9,5 (6,5; 14,6)	<b>0,000003</b>	<b>0,000305</b>	0,165519
<b>CD8+CD16+</b>	9,0 (7,2; 9,9)	5,1 (3,7; 6,9)	9,05 (5,6; 13,9)	<b>0,003505</b>	<b>0,000152</b>	<b>0,015654</b>
<b>CD16+Perforin+</b>	22,9 (17,3; 25,6)	15,4 (12,3; 18,3)	16,4 (31,0; 21,7)	<b>0,025457</b>	0,643805	<b>0,029319</b>
<b>CD16+</b>	25,0 (21,0; 30,0)	17,3 (16,2; 18,8)	18,8 (14,4; 23,9)	<b>0,009139</b>	0,537555	0,062575
<b>Active CD16</b>	87,6 (79,1; 91,6)	84,8 (59,8; 96,2)	93,1 (87,9; 95,2)	<b>0,001049</b>	0,134329	0,968395
<b>CD8+PERFORIN+</b>	16,0 (9,5; 18,7)	18,2 (12,0; 26,9)	14,7 (9,6; 19,8)	0,165951	0,982433	0,302937
<b>CD8+</b>	31,9 (25,5; 38,2)	36,0 (30,6; 48,7)	34,4 (28,4; 39,6)	0,665751	0,252228	0,250548
<b>Active CD8</b>	51,2 (43,7; 58,8)	56,0 (39,2; 62,9)	43,8 (35,4; 56,8)	0,083999	0,378462	0,662956

При анализе больных раком молочной железы также было повышение показателей врожденного иммунитета на первой-второй стадиях заболевания. По экспрессии общего CD16 максимальное значение наблюдалось на I-II стадиях РМЖ (30,3 (23,9; 35,3)%), в то время, как у доноров и больных III стадии показатели практически совпадали (18,8 (14,4; 23,9)% и 18,1 (14,7; 25,5)%). Популяция перфорин-позитивных CD16+ клеток составила 24,0 (17,1; 29,0)%, при донорских показателях 16,4 (13,0; 21,7)% и близких к ним 16,2 (11,9; 21,6)% III стадии РМЖ. Доля перфорин-позитивных CD16+ клеток также как и у больных РСОРП было снижено (86,9 (70,6; 92,9)% при I-II стадиях, 89,6 (79,2; 94,2)% при III-IV и 93,1 (87,9; 95,2)% у доноров. Медиана количества НКТ-клеток была выше у больных I-II стадий, чем у доноров, однако достоверных различий не оказалось. Вместе с тем, сильно отличались значения НК-лимфоцитов у больных I-II стадий (29,4 (26,1; 34,5)%) и донорами и III стадии опухолевого роста (16,0 (11,5; 19,0)% и 16,3 (10,1; 23,1)%). Также, значения ЦТЛ на первой-второй стадиях опухолевого роста, были ниже по медиане, чем донорские (16,9 (14,0; 24,1)% и 27,1 (22,2; 31,0)%), причем значения на III стадии возрастали (21,6 (16,9; 29,6))%, как и у больных раком слизистой оболочки полости рта.

В отличие от больных РСОРП, повышение показателей врожденного иммунитета у больных раком молочной железы I-II стадий влечет за собой достоверное нарушение линейности – падение количества Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD3 до 54,4 (52,0; 59,1)%. Это связано с более значительным повышением количества НК-лимфоцитов, чем НКТ, увеличение числа которых на первых стадиях было характерно для больных РСОРП.

У больных РМЖ содержание активных CD8+ лимфоцитов было также повышено по сравнению с донорами (см таблицу 12), при этом у больных III стадии их процент был меньше, чем на I-II. Медианы количеств CD8+Perforin+ были так же, как и у больных РСОРП, выше, чем донорские, но достоверных различий обнаружено не было.

Экспрессия молекулы CD95 у больных РМЖ на первой-второй стадиях, как и у больных РСОРП, была снижена по сравнению с донорами (48,7(43,9; 58,3)% и

60,4(52,7; 69,1)% соответственно). У больных III стадии РМЖ экспрессия Fas увеличивается до донорского уровня. При этом, количество лимфоцитов, коэкспрессирующих CD95 и CD8 растет с 14,3 (9,5; 24,9)% до 17,8 (11,3; 26,9)% и достоверно отличаются от донорского уровня (9,5(6,5; 14,6)%). Эта же тенденция была зафиксирована и у больных РСОР.

**Таблица 12** — Сравнение субпопуляций эффекторных лимфоцитов и функциональной активности у больных РМЖ различных стадий и доноров. P – уровень значимости при сравнении значений по критерию Манна-Уитни.

Показатель	Стадии 1-2(Ме и квартили)	Стадия 3(Ме и квартили)	Доноры (Ме и квартили)	P <sup>1-2</sup> с донорами	P <sup>3-4</sup> с донорами	p (1-2 с 3-4)
<b>CD3+</b>	54,4 (52; 59,1)	71,0 (57,3; 76,5)	72,8 (67,7; 78,7)	<b>0,000000</b>	0,158849	<b>0,000484</b>
<b>CD3+CD4+</b>	28,15 (23,0; 34,4)	35,1 (28,1; 45,3)	39,9 (32,8; 47,5)	<b>0,000000</b>	0,222513	<b>0,014115</b>
<b>CD3+CD8+</b>	16,95 (14,0; 24,1)	21,55 (16,9; 29,6)	27,1 (22,2; 31,0)	<b>0,000053</b>	0,066372	0,131531
<b>CD3-CD8+</b>	17,15 (14,0; 27,9)	11,5 (6,9; 14,8)	8,1 (5,9; 12,3)	<b>0,000000</b>	0,081087	<b>0,002964</b>
<b>CD8+</b>	37,6 (30,1; 47,4)	34,2 (28,7; 42,0)	35,6 (30,5; 41,2)	0,151341	0,774365	0,198309
<b>CD3-CD16+CD56+</b>	29,35 (26,1; 34,5)	16,3 (10,1; 23,1)	16,0 (11,5; 19,0)	<b>0,000000</b>	0,558185	<b>0,000137</b>
<b>CD3+CD16+CD56+</b>	10,9 (7,6; 18,0)	9,65 (6,3; 16,6)	9,4 (5,1; 14,3)	0,276308	0,687273	0,524930
<b>CD95+</b>	48,7 (43,9; 58,3)	59,55 (52,1; 69,7)	60,4 (52,7; 69,1)	<b>0,001675</b>	0,995202	<b>0,007793</b>
<b>CD95+CD8+</b>	14,3 (9,5; 24,9)	17,75 (11,3; 26,9)	9,5 (6,5; 14,6)	<b>0,034800</b>	<b>0,013430</b>	0,615196
<b>CD8+CD16+</b>	12,35 (6,6; 15,4)	7,6 (4,2; 12,9)	9,05 (5,6; 13,9)	0,278527	0,438564	0,124049
<b>CD16+Perforin+</b>	24,0 (17,1; 29,0)	16,15 (11,9; 21,6)	16,4 (31,0; 21,7)	<b>0,001310</b>	0,801736	<b>0,008498</b>
<b>CD16+</b>	30,25 (23,9; 35,3)	18,1 (14,7; 25,5)	18,8 (14,4; 23,9)	<b>0,000007</b>	0,890157	<b>0,002690</b>
<b>Active CD16</b>	86,9 (70,6; 92,9)	89,6 (79,2; 94,2)	93,1 (87,9; 95,2)	<b>0,009898</b>	0,140155	0,424713
<b>CD8+Perforin+</b>	16,0 (13,2; 21,8)	17,55 (9,8; 18,5)	14,7 (9,6; 19,8)	0,160333	0,975321	0,321850
<b>CD8+</b>	31,4 (24,4; 39,8)	30,8 (26,7; 34,6)	34,4 (28,4; 39,6)	0,184294	0,059987	0,744960
<b>Active CD8</b>	55,9 (50,9; 65,1)	49,1 (40,8; 61,3)	43,8 (35,4; 56,8)	<b>0,003390</b>	0,366354	0,097789



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что эффекторное звено клеточного иммунитета является одним из важнейших компонентов противоопухолевой защиты при солидных новообразованиях. Клетки-эффекторы иммунной системы распознают и уничтожают непрерывно образующиеся в организме человека опухолевые клетки, реализуя, таким образом, важнейшую функцию иммунного надзора [181]. Было подтверждено, что неспособность иммунной системы к активации является причиной отсутствия иммуногенности опухоли, и, как следствие, играет большую роль в развитии онкологии, чем отсутствие опухолевых антигенов [48; 217; 155]. К эффекторному звену иммунитета относятся НК-лимфоциты, цитотоксические Т-лимфоциты и НКТ-клетки. НК-лимфоциты представляют собой первую линию защиты человека против опухоли и осуществляют неспецифический иммунный ответ, не требующий предварительной активации [33; 152]. Роль адаптивной иммунной системы, к которой относятся Т-клетки, осуществляющие специфический ответ на развитие опухоли, была выявлена, была показана при экспериментах на мышах, у которых отсутствовали В и Т-клетки. Такие животные были склонны к развитию спонтанных онкологических заболеваний [213; 160]. Врожденное, так и адаптивное звенья иммунной системы глубоко вовлечены в профилактику опухолей, поскольку мыши, у которых отсутствуют как сигналы неспецифического иммунитета, так и адаптивная иммунная система, развивают более широкий спектр опухолей, чем мыши, у которых отсутствует только адаптивная иммунная система.

В ходе развития методов исследования клеточных популяций иммунных клеток оказалось, что данные популяции гетерогенны, и в свою очередь, разделяются на несколько субпопуляций, способные выполнять как эффекторные, так и регуляторные функции. Обнаружено, что и Т-лимфоциты, и НК-клетки, в зависимости от количества белка или степени (плотности) экспрессии антигенов на мембране, наличия на поверхности клеток ко-стимулирующих, адгезивных молекул и многих других факторов, способны к реализации различной функциональной активности [206; 82; 141; 107]. Нарушения баланса между этими

субпопуляциями происходит при многих заболеваниях, в том числе онкологических [47].

До недавнего времени, применение однопараметрового анализа поверхностных антигенов цитоплазматической мембраны являлось основным методом изучения структуры клеточного звена иммунитета. Однако, согласно современным данным и представлениям, клеткам иммунной системы присуща широкая фенотипическая гетерогенность, что является их отличительной особенностью. Большой проблемой исследователей клеточного иммунитета оказалось отсутствие единичного специфического белка-маркера для большинства иммунокомпетентных клеток, участвующих в генерации как специфического, так и неспецифического иммунного ответа, и их идентификация требовала возможностей одновременного изучения коэкспрессии антигенов с применением стратегии последовательного гейтирования белок-специфических клеток.

Общим маркером эффекторных клеток является молекула CD8. Таким образом, он не является строго специфичным для цитотоксических Т-лимфоцитов и представлен не только на ЦТЛ, но и на Т-лимфоцитах с супрессорной активностью, частично на NK- и NKT-клетках, причем увеличение экспрессии CD8 связывается с увеличением цитотоксической активности NK-клеток [120; 17; 238]. Известно также, что CD8 экспрессируют не только эти субпопуляции лимфоцитов, но и отдельные клоны других клеток организма: макрофаги, тучные клетки, дендритные клетки. Не существует также единственного белка, характерного для NK- и NKT- клеток и для фенотипической идентификации этих клеток требуется наличие целого ряда дополнительных маркеров [216, 46].

При столь высокой степени фенотипической гетерогенности, тем не менее, основные механизмы цитотоксического действия ЦТЛ и NK-клеток сходны и реализуются путем экзоцитоза литических гранул, в частности, перфорины и гранзимов, с последующим осмотическим «взрывом» и гибелью клеток мишеней [35, 76]. Известно, что действие тандема этих молекул необратимо. Функционирование цитотоксических эффекторных Т-лимфоцитов является антигенспецифическим, в то время как NK клетки не обладают иммунологической

памятью, и проявление их функциональной активности не связано с антигенами главного комплекса гистосовместимости МНС [249].

Целью работы было выявление фенотипической гетерогенности эффекторных клеток, опосредующей функциональную противоопухолевую активность клеток у здоровых доноров и онкологических больных.

В ходе исследования было проанализировано 389 первично-операбельных пациентов, находившихся на обследовании и лечении в НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, среди них 91 больной раком яичников, 82 - меланомой, 72 - раком слизистой оболочки полости рта и 144 - раком молочной железы. Средний возраст пациентов составил 52,9. Группы онкологических больных раком молочной железы и раком яичников составили женщины со средним возрастом 56,7 и 51,1 соответственно (Таблица 2). Среди пациентов, страдающих раком слизистой полости рта, было 39 женщин (54,1%) и 33 мужчины (45,9%). Средний возраст составил 54,8. В группе больных меланомой средний возраст равнялся 49,3, количество женщин составило 50 (60,9%), а мужчин – 32 (39,1%). Большинство пациентов имело T1-T3 стадии опухолевого роста. Контрольную группу составили 64 практически здоровых донора, среди них – 10 мужчин(15,6%) и 54 женщины (84,4%) . Средний возраст донорской группы составил 41,4 года. Кровь забирали из локтевой вены натощак, в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА. Выделение лимфоцитов из периферической крови осуществляли с помощью разделения клеток на градиенте плотности фиколла-урографина (1,077г/см). Окрашивание клеток проводилось с помощью реакции прямой флуоресценции. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови больных онкологическими заболеваниями и здоровых доноров проводили методом многопараметрового цитометрического анализа.

У доноров были оценены количественные значения CD8-положительных клеток (35,5 (30,6; 41,1)%), и популяции эффекторных клеток с фенотипом CD3+CD8+ (27 (22,3; 30,7)%). В более ранних работах нашей лаборатории было показано, что популяция CD8-позитивных лимфоцитов здоровых доноров составляет  $34,8 \pm 1,9$  % и колеблется от 26,0 до 50,5 %. Количество антиген-

позитивных клеток с фенотипом CD8+CD3+ при этом было равно  $27,3 \pm 2,4$  %, а клеток с фенотипом CD8+CD3-  $7,5 \pm 1,5$  % CD45+ лимфоцитов ПК здоровых лиц, что также крайне близко к значениям, полученным в данной работе, более ранних работах лаборатории и в работах других исследователей [6, 7, 11, 12; 237].

Количество CD8-положительных клеток (общего CD8) (рак яичников – 34,7 (27,3; 40)%, меланома – 35,4 (28,6; 41,1)%, РСОПР – 36,3 (29,1; 45,4)%, РМЖ - 38,6 (33,4; 45,8)%) у онкологических больных практически совпадают с донорскими показателями, не составляя статистически значимую разницу по критерию Манна-Уитни. Количества клеток с фенотипом CD3+CD8+, преимущественно представляющие собой ЦТЛ, по значению медианы также не различались между собой и донорскими показателями. При этом при сравнении с донорами, оказалось, что статистически значимое различие ( $p < 0,05$ ) в содержании данной популяции эффекторных лимфоцитов есть у больных РМЖ и раком яичников (рак яичников – 20,8 (12,5; 29,7)%, меланома – 27,3 (16,3; 22,6)%, РСОПР – 27,9 (19,4; 39,7)%, РМЖ - 26 (19; 30,7)%). Отсутствие заметного изменения количества клеток этой популяции и CD8+-лимфоцитов в общей группе пациентов фиксировалось и другими авторами [1, 125, 237]. Отсутствие разницы в количествах популяций Т-лимфоцитов у доноров и онкологических больных было показано для РМЖ, притом, что ткани опухоли были широко инфильтрированы CD8+ Т-лимфоцитами. На основании этих наблюдений многие авторы делают вывод о том, что опухоль не оказывает влияния на системный иммунитет [180].

Однако при подобной близости показателей экспрессии CD8 во время анализа каждого заболевания отдельно выявлялся очень широкий диапазон количества CD8+ клеток (от 7% до 60% лимфоцитов), из-за чего больные каждой нозологической формой были разделены на подгруппы по значению этого маркера. Были отобраны подгруппы с высокими значениями количества CD8+ клеток (>35%), нормальными (25-35%) и низкими (<25%) согласно принятым в лаборатории нормам данного маркера. Большинство пациентов (более 40% каждой нозологической формы) обладало повышенными уровнями экспрессии

CD8-клеток, что соответствует мировым исследованиям, описывающим увеличение уровня CD8+ лимфоцитов и снижением иммунорегуляторного индекса CD4/CD8 [98; 105]. Оказалось, что у больных трех из четырех нозологических форм присутствует общая тенденция к уменьшению количества цитотоксических Т-лимфоцитов от группы к группе со снижением общего количества CD8, причем в группе с повышенным количеством маркера CD8, количество ЦТЛ по сравнению с контрольной группой повышено или лежит в диапазоне донорских значений (таблица 5). Эта закономерность прослеживалась у больных раком яичников, раком слизистой оболочки полости рта и раком молочной железы, причем наиболее значимой она была для последней нозологии (см. рис 4). Одновременно со снижением процентного содержания ЦТЛ, уменьшалась и доля НКТ-лимфоцитов при данных заболеваниях. За счет уменьшения долей данных двух популяций, НК-лимфоциты в группе с низкими уровнями CD8+ клеток составляли большую часть эффекторных клеток. По-видимому, основную роль в противоопухолевом ответе у таких групп пациентов играют CD8- НК-клетки, особенностью которых является то, что они не подвергаются апоптозу при взаимодействии с МНС-I (подробнее ниже).

При меланоме соотношение между популяциями эффекторных клеток сильно отличалась от предыдущих нозологий. Здесь преобладание цитотоксических Т-лимфоцитов сохранялось во всех группах по содержанию маркера CD8 (54,3%; 48,9% и 56,9% от эффекторных лимфоцитов). Уровень НК-лимфоцитов увеличивался в группе с нормальными значениями CD8 (с 24,2% до 33,1%), но при низких значениях этого маркера возвращался к исходному уровню (24,0%). Доля НКТ-лимфоцитов лишь незначительно колебалась (с 21,3%; 17,9% и 18,9%) (рис 5). Данный факт, по-видимому, объясняется тем, что меланома считается одной из иммуногенных опухолей, что выражается в высокой инфильтрации опухолевых узлов лимфоцитами и высокой эффективностью иммунотерапии [187]. Видимо, достаточная иммуногенность антигенов опухоли в этом случае позволяют цитотоксическим Т-лимфоцитам развивать специфический иммунный ответ. Возможно, за счет данного факта, ЦТЛ остаются ведущей

популяцией эффекторных клеток во всех группах с различным содержанием CD8+ клеток.

Повышение количества CD8+ Т-клеток и инфильтрация ими опухолевого узла рассматривается многими авторами как положительный прогностический маркер, например, у больных колоректальным раком, РМЖ и меланомой [164, 78, 23, 121; 135]. Содержание Т-лимфоцитов при этом оказывалось более надежным прогностическим фактором, чем классическое стадирование. Было показано, что пациенты с низкой инфильтрацией опухоли Т-лимфоцитами на I-II стадиях опухолевого роста имели более низкую безрецидивную выживаемость, чем пациенты III стадии с присутствующими в опухолевом узле ЦТЛ [148]. Высокое соотношение ЦТЛ к Т-регуляторным клеткам у больных раком яичников также являлось предиктором терапевтического эффекта [54]. Предполагается, что присутствующие в микроокружении опухоли ЦТЛ включают в себя антигенспецифические Т-клетки, которые были активированы спонтанно в ответ на растущую опухоль, возможно, через механизмы иммунного надзора. Они предпринимают попытку контролировать опухоль с помощью иммунных эффекторных функций, создавая, таким образом, более благоприятный клинический результат [41]. Однако важно учитывать, что накопление Т-клеток в микроокружении опухоли может быть вторичным явлением, которое может вести к улучшению прогноза заболевания и уменьшать вероятность его прогрессирования [177]. При оценке циркулирующих цитотоксических Т-лимфоцитов у больных РСОР в текущем исследовании было выявлено, что медианы количества ЦТЛ на I-II стадиях и доноров сильно различаются (19,4 (13,3; 26,8)% и 27,1(22,2; 31,0)% соответственно), но различия статистически недостоверны. При этом значимым оказалось различие при сравнении количества ЦТЛ между больными I-II и III-IV стадий (медиана III-IV составила 32,2(28,5; 41,2)%). У больных РМЖ значения ЦТЛ на первой-второй стадиях опухолевого роста, были также ниже по медиане, чем донорские (16,9 (14,0; 24,1)% и 27,1 (22,2; 31,0)%), причем значения у больных III-IV стадий возрастали (21,6 (16,9; 29,6))%, как и у больных раком слизистой оболочки полости рта. При описании

популяций иммунокомпетентных клеток периферической крови больных раком молочной железы, зарубежными авторами было отмечено, что на начальных стадиях отличия количеств CD3+CD8+ лимфоцитов контрольной группы и пациентов отсутствует, но количество ЦТЛ возрастает при метастазировании в лимфатические узлы (стадии N1) [175]. При этом в крови снижено количество наивных CD45RA+CCR7+ Т-лимфоцитов как по сравнению с донорами, так и с больными с локализованными формами РМЖ. Повышение количества ЦТЛ в группе пациентов с прогрессированием опухоли было описано и для немелкоклеточного рака легкого [246]. Общим для двух проанализированных нозологий в данном исследовании оказалось повышение показателей врожденного иммунитета у больных I-II стадий онкологического заболевания и снижение их у пациентов III-IV стадий так, что они оказывались близки к донорским. В то же время, у больных III-IV стадий повышалось количество специфических эффекторов (ЦТЛ). Это может свидетельствовать о переключении механизма противоопухолевого иммунитета по мере развития опухоли. Так как лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, представлены в основном ЦТЛ, то можно заключить, что иммунный ответ с помощью специфических эффекторных цитотоксических клеток преимущественно происходит в самом опухолевом узле (при условии отсутствия или подавления опухолевых механизмов супрессии иммунного ответа). Возможно, повышение цитотоксических лимфоцитов и их активности в крови может быть связано с генерализацией процесса, выходом опухолевых клеток или ее цитокинов в кровотоки. Это, по-видимому, говорит о постепенной активации адаптивного звена иммунной системы и переключении противоопухолевого ответа и свидетельствует в пользу накопления Т-клеток в опухоли как вторичного процесса.

Для того чтобы понять, за счет каких клеток происходят колебания общего пула CD8+ клеток и чем обусловлен столь широкий диапазон значений, мы оценили субпопуляции с высокой экспрессией CD8 (CD8<sup>high</sup>), характерной для ЦТЛ, и низкой (CD8<sup>low</sup>), характерной для NK и NKT-клеток. У доноров значение данных субпопуляций составило 21,9 (19; 24,3)% от общего пула лимфоцитов

(61,9% от CD8-позитивных лимфоцитов) и 12,6 (10,9; 17)% (35,5% от CD8+) соответственно. В предыдущем исследовании нашей лаборатории анализ структуры CD8+ лимфоцитов показал, что на долю CD8+CD3+CD45+ клеток приходится 76,2%, а клетки с фенотипом CD8+CD3-CD45+ составляют 23,8 % среди CD8+лимфоцитов, что сопоставимо с данными, полученными при гистограммном анализе образцов в зависимости от степени экспрессии белков CD8+high и CD8+medium/low [6]. У онкологических больных с повышенным уровнем CD8+ клеток заметно увеличена популяция CD8low по сравнению с донорами за счет повышения количества NK-лимфоцитов (рак яичников – 19,3 (14,2; 24)%, меланома – 16,2 (12,2; 20,2)%, РСОПР – 17,6 (15; 23,8)%, РМЖ – 20,5 (17; 29,1)%) при небольшом повышении содержания CD8high (рак яичников – 24,1 (19,1; 28,5)%, меланома – 25,3 (21,4; 30,2)%, РСОПР – 24,6 (19,9; 29,3)%, РМЖ – 21,8 (16,4; 26,8)%). В группе с нормальными значениями CD8-положительных клеток количество CD8high популяции оказывалось ниже донорского уровня, что соответствует снижению количества ЦТЛ при определении их как CD3+CD8+ клеток. Для того чтобы понять, какой вклад в увеличение CD8low субпопуляции вносят НКТ и NK-лимфоциты, мы оценили CD3+CD8low клетки, также относящиеся к НКТ (таблица 6). Значения также уменьшались от группы к группе, несмотря на то, что основную массу CD8low клеток составляли NK-лимфоциты (см. пункт 3.4). Обращает на себя внимание то, что число CD8low клеток в группе с нормальными значениями CD8-позитивных лимфоцитов близко к донорским показателям и снижено по сравнению с первой группой так же, как и популяция CD3+CD8low. Это показывает, что в снижении числа CD8 клеток между этими двумя группами основную роль играет уменьшение НКТ-лимфоцитов (таблица 6). Между группами с нормальными и пониженными количествами CD8+ клеток такой зависимости не наблюдалось, по-видимому, за счет того, что в этом случае уменьшалось и количество NK-лимфоцитов. Количество CD8high ЦТЛ также снижалось в этой группе больных.

Таким образом, можно сказать, что снижение количества CD8-положительных клеток происходит как за счет уменьшения количества ЦТЛ, так и



НКТ-лимфоцитов, также входящих в структуру Т-клеток. Высокие значения CD8-положительных лимфоцитов в первой подгруппе онкологических больных достигаются в том числе за счет резкого повышения количества НКТ-клеток, что видно, прежде всего, из значений содержания CD3+CD16+CD56+клеток, в 1,2-1,5 раза превышающих донорские (таблица 5). В подгруппах с нормальными и низкими значениями CD8 лимфоцитов доля клеток со средней и слабой экспрессией CD8 достигало 35-50% от CD8-позитивных лимфоцитов, а в ряде случаев составляла больше половины (у больных раком яичников и раком молочной железы с нормальными значениями CD8+ клеток), что указывает на возрастающую роль врожденного иммунитета у таких пациентов. Исследователи описывают улучшение выживаемости при повышении CD8<sup>high</sup> субпопуляции лимфоидных клеток в тканях и периферической крови для некоторых нозологических форм онкологических заболеваний [118]. Видимо, данное наблюдение связано с реализацией специфического иммунного ответа, осуществляемого данными клетками, чего не происходит при пониженных количествах этой субпопуляции и угнетении ее опухолью.

Для оценки функциональной активности эффекторных клеток было проведено исследование внутриклеточного перфорина. У доноров значения CD16+ и CD8+ перфорин-позитивных клеток составили 16,8 (13; 21,7)% и 14,8 (9,6; 19,8)% соответственно. Практически все НК-клетки доноров содержат перфорин (93 (87,8; 95,2)%), в то время как CD8+ Т-клетки (ЦТЛ и НКТ) экспрессировали перфорин в 44,8 (35,4; 56,8)% случаев.

Резкие различия с этими данными были выявлены при анализе количества CD8+Perforin+ клеток. В общих группах количество двойных позитивных по этим молекулам клеток было сопоставимо с донорскими показателями, что отмечают и некоторые исследователи [125]. При подробном анализе в подгруппах оказалось, что по мере снижения количества CD8+ лимфоцитов уменьшалось и количество перфорин-содержащих CD8+ клеток (данные представлены в таблице 8), при этом в группе с высоким количеством CD8-положительных клеток была повышена доля перфоринсодержащих лимфоцитов среди всех CD8 клеток (рак яичников –

52,9 (32,0; 68,5)%), меланома –56,5 (40,2; 61,7)%, РСОПР – 59,7 (49,7; 67,8)%, РМЖ –54,8 (44,8; 60,4)%. Увеличение цитотоксического потенциала Т-лимфоцитов в злокачественных опухолях было описано и зарубежными авторами, что связано с активацией противоопухолевого ответа со стороны адаптивного звена иммунной системы [18, 49]. При снижении уровня CD8+ клеток были обнаружены различия в количестве перфоринпозитивных лимфоцитов у больных различных нозологических форм. Так, у больных раком слизистой оболочки полости рта и раком молочной железы доля перфоринсодержащих CD8 клеток не снижалась в группах по мере снижения экспрессии CD8 (данные в таблице 8 и рисунке 10), в то время как у больных раком яичников и меланомой он достигал нормальных и более низких значений (рак яичников – 40,7 (30,1; 54,8)%, меланома – 30 (22,5; 45,4)%). Это говорит о более эффективном подавлении опухолью противоопухолевого ответа у больных РМЖ и меланомой. Исследователи указывают на то, что сниженные уровни перфоринпозитивных CD8+ лимфоцитов считаются негативным прогностическим фактором [243]. Однако, некоторые авторы описывают обратную корреляцию увеличения экспрессии перфорина и выживаемости больных раком слизистой оболочки полости рта, что говорит о негативном прогнозе у таких больных [125]. Возможно, это связано с особенностями данной нозологической формы – так как слизистая оболочка полости рта выполняет барьерную функцию, основную роль играют другие популяции иммунокомпетентных клеток. Таким образом, при данной форме опухолевого процесса специфический иммунный ответ проявляется уже на более поздних стадиях, что отражается в повышении количества ЦТЛ на III-IV стадиях заболевания, что было описано выше.

У доноров основным путем реализации цитотоксического потенциала является Fas-Fas-L путь инициации апоптоза, в то время как у онкологических больных баланс смещается в сторону секреции перфорина. Исследования показывают, что при меланоме и других видах онкологических заболеваний, CD8+ лимфоциты преимущественно используют перфорин-зависимый механизм цитотоксичности [182].

В предыдущих исследованиях нашей лаборатории также был проведен анализ распределения внутриклеточного белка перфорина в CD8 клетках с различным уровнем экспрессии антигена. Было установлено, что у здоровых доноров перфорин-позитивной популяцией являются лимфоциты со слабой экспрессией маркера CD8, то есть НК-клетки [6].

При анализе общей экспрессии молекулы CD95 на всех лимфоцитах, оказалось, что при сравнении доноров и групп больных по различным нозологиям, CD95 был всегда снижен по сравнению с донорами. Если рассматривать изменение экспрессии с изменением количества CD8-положительных лимфоцитов, то видно, что количество обратно растет с уменьшением содержания CD8 (рис 12). Количество лимфоцитов, коэкспрессирующих CD95 и CD8 в нашем исследовании равнялось 9,5 (6,5; 14,6)%, что совпадает с литературными данными [125]. При этом коэкспрессия этих маркеров также снижалась при уменьшении общего количества CD8, что позволяет сделать вывод, что рост общей экспрессии CD95 происходит за счет клеток, не являющихся эффекторными. Есть работы, указывающие на резкое повышение количества CD4+CD95+ лимфоцитов, теряющих свою функцию Т-хелперов и приобретающих цитотоксические свойства. При этом наблюдается лишь незначительное повышение CD8+CD95+, не составляющее статистически значимое различие [92]. Участие CD4+ Т-хелперов необходимо как при развитии специфического иммунного ответа, так и при формировании клеток памяти, вследствие чего у таких больных наблюдается снижение цитотоксической активности CD8+ лимфоцитов, что является неблагоприятным фактором. Зарубежные авторы отмечают резкое увеличение количества CD8+CD95+ клеток у больных раком слизистой оболочки полости рта, однако корреляция между изменениями количества этой субпопуляции и выживаемостью пациентов не была найдена. Отсутствие связи с выживаемостью пациентов было обнаружено и при раке легкого [125,243].

В текущем исследовании были оценены показатели врожденного иммунитета здоровых доноров, такие как количественные значения CD3-CD8+

(8,1 (5,9; 12,1)%), CD3-CD16+CD56+ (15,9 (11,5; 19)%), CD3+CD16+CD56+ (9,4 (5,3; 14,2)%) клеток. В более раннем исследовании нашей лаборатории было показано, что количество клеток с фенотипом CD8+CD3- составляет  $7,5 \pm 1,5\%$  CD45+ лимфоцитов ПК здоровых лиц, что совпадает с полученным в данной работе. Также в том исследовании был выявлен высокий уровень корреляции ( $r=0,54$ ) клеток с фенотипами CD8+CD3-CD45+ и CD8+medium/low CD16+CD45+ в ПК здоровых лиц –  $7,5 \pm 1,2\%$  и  $6,4 \pm 1,3\%$  соответственно, что позволяет говорить о том, что эти клетки относятся к одной популяции NK-лимфоцитов [6]. Данные по содержанию NK- и NKT-лимфоцитов так же совпадали с предыдущими работами лаборатории – ранее было показано, что в периферической крови здоровых доноров популяция NK клеток (CD3-CD16&CD56+) составляет  $17,3 \pm 8,2\%$ , а субпопуляция NKT лимфоцитов (CD3+CD16&CD56+) –  $7,9 \pm 3,5\%$ . Зарубежные авторы отводят на популяцию NK-клеток здоровых доноров 10-20% лимфоцитов [22; 18]. При анализе коэкспрессии CD16 и CD56 антигенов на поверхности CD3+ Т-клеток выявлено, что количество CD3+CD56+ клеток было аналогично популяции CD3+CD16&CD56+ лимфоцитов ( $8,1 \pm 3,6\%$ ), тогда как популяция CD3+CD16+ клеток составляет всего  $2,3 \pm 2,0\%$  [3]. В текущей работе было установлено, что практически все NK-клетки доноров содержат перфорин (93 (87,8; 95,2)%), высокую долю перфоринсодержащих NK-лимфоцитов описывают и зарубежные авторы [147].

У онкологических больных, как и в случае с CD8+ и CD3+CD8+ клетками оказалось, что количества NK и NKT-лимфоцитов практически не отличаются от донорских значений и анализ этих популяций требует индивидуального анализа. Так, у больных РМЖ количество NK-лимфоцитов составило 19,3 (11,4; 26,3)%, меланомой - 14 (10,2; 20,5)%, РСОПР - 14,4 (10,3; 24,7)% (Все данные представлены в таблице 3). Данный факт отмечают и зарубежные авторы: например, при неоплазии яичников значения количеств Т-лимфоцитов, NK и NKT примерно равны как в доброкачественных вариантах опухоли, так и злокачественных, и сопоставимы с донорскими показателями ( $51,9 \pm 4,6\%$ ,  $10,1 \pm 1,8\%$ ,  $7,5 \pm 1,8\%$  соответственно), что еще раз подчеркивает необходимость

рассмотрения каждого случая в отдельности [18]. Отсутствие статистически значимых различий между количествами натуральных киллеров и НКТ-лимфоцитов было продемонстрировано и у больных меланомой [62]. Это актуально и для РМЖ: исследователи также указывают на отсутствие статистических различий между донорами и онкологическими больными по количеству НК-лимфоцитов, описывая в основном снижение количества цитотоксических субпопуляций натуральных киллеров [226].

Исключение из такой близости медиан общих количеств основных субпопуляций по данным нашего исследования составляют лишь клетки с фенотипом CD3+16+56+ (НКТ-лимфоциты) у больных раком слизистой оболочки полости рта и раком молочной железы (рак яичников – 8,5 (4,6; 14,8)%, меланома – 9,7 (6,1; 14,7)%, РСОПР – 12,7 (8; 19)%, РМЖ - 14,8 (8,9; 19,2)%). Это подтверждается и литературными данными, так, описано увеличение количества НКТ-лимфоцитов в эпителиальных опухолях, к которым относятся и приведенные выше нозологические формы [250]. Также было установлено небольшое повышение CD3-CD8+ субпопуляции в трех из четырех нозологий (рак яичников – 11,1 (6,7; 15,1)%, меланома – 7,7 (5,3; 11,1)%, РСОПР – 10,3 (6,2; 14,8)%, РМЖ - 12,6 (8,3; 16,8)%), что согласно предыдущим исследованиям указывает на повышение количества НК-лимфоцитов (см. пункт 3.2). При анализе данной субпопуляции набором CD3/CD16&CD56, оказалось, что у больных раком яичников было повышено количество CD3-CD16+CD56+ НК-клеток (22,6 (14,5; 31,3)%), а при остальных нозологиях значения также были близки к нормальным (РМЖ - 19,3 (11,4; 26,3)%, меланома - 14 (10,2; 20,5)%, РСОПР - 14,4 (10,3; 24,7)%). Это, возможно объясняется сходством развития опухоли яичников и беременности с точки зрения иммунологических механизмов, на которое указывают некоторые мировые авторы. Они отмечают при беременности повышенное содержание (около 70% иммунокомпетентных клеток) НК-лимфоцитов в децидуальной оболочке, обладающих регуляторным фенотипом CD56+CD16- [94]. Такой же фенотип НК-клеток характерен для больных раком яичников [233]. Ранее в экспериментах на мышах было показано, что при

введении моноклеарных клеток в присутствии опухоли яичника, быстро развивается экспансия NK-лимфоцитов, чего не было зафиксировано при отсутствии опухоли [165]. Видимо, за счет данных фактов, а также того, что при беременности основную роль играют именно натуральные киллеры при угнетении Т-клеточного звена, основным механизмом иммунного ответа на опухоль яичников являются именно NK-лимфоциты.

Роль повышения количества NK-лимфоцитов в остановке роста опухоли и описана и показана во многих источниках при опухолях различной локализации, например при раке молочной железы [215]. При лечении метастазов меланомы в легкие активация NK-лимфоцитов приводит к увеличению цитотоксичности, поляризации макрофагов по M1-типу и выраженному клиническому эффекту терапии [205]. В исследовании пациентов с метастатической меланомой до и после лечения с помощью таких иммунотерапевтических средств, как ипилимумаб или пембролизумаб, методом проточной цитометрии проанализировали относительное и абсолютное количество NK-клеток и субпопуляций CD56<sup>low</sup> и CD56<sup>high</sup> NK-клеток среди моноклеарных клеток периферической крови (PBMC). У 47% пациентов было обнаружено аномально малое количество NK-клеток в начале исследования. Анализ субпопуляций показал также низкие или нормальные исходные уровни для CD56<sup>low</sup> NK-клеток, тогда как исходные уровни CD56<sup>high</sup> NK-клеток были либо нормальными, либо аномально высокими. Относительное и абсолютное количество NK-клеток и субпопуляций NK56<sup>low</sup>CD16<sup>low</sup> и CD56<sup>high</sup> у пациентов с нормальным исходным уровнем не изменялось при лечении. Тем не менее, пациенты с низким содержанием NK-клеток и CD56<sup>low</sup> NK-клеток показали значительное увеличение этих подмножеств иммунных клеток, но количество оставалось ниже, чем нормальный исходный уровень. Количество клеток CD56<sup>high</sup> NK не подвергалось воздействию лечения. Базовые уровни NK-клеток коррелировали с количеством метастатических органов. Их доля увеличилась, когда метастазы затронули более одного органа. Низкие базовые уровни NK-клеток и CD56<sup>low</sup> NK-клеток, а также нормальные исходные уровни CD56<sup>high</sup> NK-клеток

коррелировали значительно с положительным ответом на ипилимумаб, но не на пембролизумаб. Кривые выживания пациентов с низким количеством CD56high NK-клеток, обработанных ипилимумабом, показали тенденцию к более длительной выживаемости. Нормальные исходные уровни CD56high NK-клеток достоверно коррелировали с более длительной выживаемостью по сравнению с пациентами с высокими исходными уровнями. Таким образом, было показано, что анализ количеств полных NK-клеток и субпопуляций NK56lowCD16low и CD56high на базовом уровне может помочь предсказать результат лечения с помощью ипилимумаба [221]. Некоторые исследования показывают, что высокое содержание CD16+ клеток является неблагоприятным прогностическим фактором при неoadьювантной химиотерапии рака молочной железы [10].

У онкологических больных во всех подгруппах количество CD16+Perforin+ клеток практически повторяло значения CD3-CD16+CD56+ NK клеток, что позволяет сказать, что практически все натуральные киллеры содержат перфорин и являются эффекторными, что видно и при анализе DotPlot'ов (рисунок 11). Значения CD16+Perforin+ клеток было примерно равно донорскому уровню, как в общих группах различных нозологий (рак яичника – 16,1 (10,9; 23,6)%, меланома – 16,2 (11,7; 20,4)%, РСОПР – 18,3 (12,9; 23,5)%, РМЖ – 18,3 (14,2; 24,6)%%), так и в группах по экспрессии маркера CD8 (см. таблицу 8). Следует заметить, что количество перфорин-позитивных CD16+ клеток было снижено лишь у больных меланомой при низких значениях CD8-положительных клеток, так как это единственная подгруппа, где наблюдалось снижение количества NK-лимфоцитов (цифры приведены ранее в таблице 5 раздела 3.1.). Доля активных (перфоринсодержащих) клеток всех CD16+ лимфоцитов во всех подгруппах менялась незначительно и была сопоставима с донорским уровнем (рак яичников – CD8↑: 90,9 (80,8; 94,8)%, CD8 N: 88,6 (76,8; 94,9)%, CD8↓: 83,6 (75,7; 96,6)%, меланома – CD8↑: 91,2 (80,5; 94,3)%, CD8 N: 88,5 (75; 93,2)%, CD8↓: 85,8 (75; 87,5)%, РСОПР – CD8↑: 91,4 (87,2; 95,7)%, CD8 N: 96,2 (79,1; 96,8)%, CD8↓: 96,2 (79,1; 97,4)%, РМЖ – CD8↑: 88,8 (79,7; 93,3)%, CD8 N: 91,9 (82,7; 96,1)%, CD8↓: 96,5 (93,6; 97)%). У отдельных пациентов была зафиксирована увеличенная

популяция клеток CD16+Perforin-, но она не превышала 5-10%. Вышеприведенные данные позволяют сделать вывод, что содержание перфорин-позитивных НК-лимфоцитов практически не меняется у онкологических больных. В зарубежной литературе описано снижение количества цитотоксических молекул НК-лимфоцитов и увеличение цитокин-продуцирующих субпопуляций натуральных киллеров [138]. Падение цитотоксичности натуральных киллеров описано для рака молочной железы, меланомы и ряда других опухолей [119]. В ряде работ присутствуют данные о падении цитотоксичности НК-клеток у пациентов с раком молочной железы за счет низкой экспрессии НК-клеточных рецепторов [115]. Это позволяет предположить, что опухоль блокирует дифференцировку НК-лимфоцитов на более ранних стадиях, и таким образом, способствует усилению регуляторного звена, а также присутствуют механизмы, мешающие осуществлению цитотоксической функции непосредственно при контакте с клеткой-мишенью. В то же время, некоторые авторы обращают внимание на то, что процентное содержание перфорин-положительных НК-лимфоцитов при меланоме соответствует донорскому уровню, но отличается по значению средней интенсивности флуоресценции (MFI), что говорит об истощении секреции перфорина натуральными киллерами [147].

В текущем исследовании было выявлено сильное отличие количеств НК-лимфоцитов у больных стадий I-II (29,4 (26,1; 34,5)%) и донорами и III стадией опухолевого роста у больных раком молочной железы (16,0 (11,5; 19,0)% и 16,3 (10,1; 23,1)%). Данное наблюдение подтверждают и зарубежные авторы, описывая снижение количества цитотоксической субпопуляции НК-клеток у больных с поздними стадиями РМЖ [137, 138]. При этом популяция перфорин-позитивных CD16+ клеток в нашем исследовании составила 24,0 (17,1; 29,0)%, при донорских показателях 16,4 (13,0; 21,7)% и близких к ним 16,2 (11,9; 21,6)% III стадии РМЖ. Такая зависимость описана и в мировой литературе [226]. Однако доля перфорин-позитивных CD16+ клеток была снижена (86,9 (70,6; 92,9)% у больных I-II стадий, 89,6 (79,2; 94,2)% у пациентов III стадии и 93,1 (87,9; 95,2)% у доноров. Этот же факт наблюдался и у больных РСОПР: на первой-второй стадиях



опухолевого процесса оказалось выше количество перфорин-позитивных CD16+ лимфоцитов (22,9 (17,3; 25,6)%), при том, что на III-IV стадии этот показатель был близок к донорскому (III-IV: 15,4(12,3; 18,3)%; доноры: 16,4 (13,0; 21,7)%). Однако, при этом доля перфоринсодержащих CD16+ лимфоцитов на первой-второй стадиях была статистически значимо ниже, чем донорские показатели (87,6(79,1; 91,6)% и 93,1(87,9; 95,2)%). Таким образом, можно сделать вывод о ведущей роли НК-лимфоцитов в генерации иммунного ответа на первых стадиях развития опухолевого заболевания. При этом включаются иммуносупрессорные механизмы, частично подавляющие активность натуральных киллеров, о чем свидетельствует наличие перфорин-отрицательной популяции НК-клеток и увеличение ее по сравнению с донорской группой.

Вместе с тем, отмечается, что инфильтрация опухолевых узлов НК-лимфоцитами обычно невелика, несмотря на очевидную противоопухолевую роль этой популяции эффекторных клеток [80]. Это может быть связано с трудностями обнаружения натуральных киллеров в развивающемся опухолевом узле и наличие тканевых барьеров может мешать проникновению НК-клеток в опухолевый узел и ее микроокружение. Ярким примером служит рак поджелудочной железы, опухолевый узел которой зачастую окружен плотной фиброзной тканью, что препятствует инфильтрации опухоли лимфоцитами [16]. При этом локальное введение аутологичных стимулированных НК-клеток ведет к выраженному терапевтическому эффекту при данном заболевании [194]. Клетки опухоли также могут вырабатывать растворимый NKG2D, активируя НК-лимфоциты, но при этом избегая их цитотоксического эффекта за счет связывания растворимого лиганда с рецептором натурального киллера. Одновременно опухоль препятствует распознаванию с помощью молекулы CD8, содержащемуся на 80% НК-лимфоцитов, путем уменьшения экспрессии МНС-I [229]. Для активации и обхода супрессии естественных киллеров применяются различные методы иммунотерапии, такие как блокирование ингибиторных сигналов (в том числе растворимого NKG2D), введение IL-2 и IL-15, активация и стимуляция НК-клеток *in vitro* с последующим введением пациенту и разработка химерных антигенных

рецепторов [130]. Вместе с тем, есть данные об изменении функционального состояния НК-лимфоцитов с возрастом, вследствие чего могут развиваться и прогрессировать онкологические заболевания [42]. Таким образом, фенотипическая и функциональная гетерогенность НК-лимфоцитов, их способность распознавать и активировать противоопухолевый ответ на ранних стадиях онкологического заболевания, являются важными факторами при лечении и прогнозе заболевания.

Повышение абсолютного и относительного содержания НКТ-лимфоцитов также описано во многих работах зарубежных авторов, где отмечается противоопухолевая роль этой популяции лимфоцитов, в частности, продукция Th1-цитокинов и поляризация опухолевого микроокружения по M1-типу. Есть недавние исследования, в которых это пытаются применять в качестве лечения пациентов, вводя активированные аутологичные НКТ-клетки пациентам [81, 70]. В данном исследовании было зафиксировано повышение количества НКТ-лимфоцитов при первой-второй стадиях РСОР (9,6 (7,7; 12,8)% при донорском показателе 9,4 (5,1; 14,3)% , что оказалось статистически значимой разницей. При этом число лимфоцитов, коэкспрессирующих CD3 и CD16/56 у пациентов III-IV стадий составила 17,2 (9,0; 20,8)%, но разница оказалась статистически недостоверной как при сравнении с донорами, так и с больными I-II стадий. Мировые исследования также показывают, что у больных первой-второй стадий рака слизистой оболочки полости рта уровень НКТ-лимфоцитов выше, чем у пациентов III-IV [201]. При этом при дополнительной стимуляции противоопухолевого ответа, количество НКТ-лимфоцитов значительно возрастает, что указывает на ключевую роль этой популяции эффекторных клеток при данной нозологической форме [200]. Пониженные количества НКТ-клеток исследователи связывают с неблагоприятным прогнозом лечения [149]. Вместе с тем, при РМЖ медиана количества НКТ-клеток была выше у больных I-II стадий заболевания, чем у доноров, однако статистически значимой разницы в показателях не оказалось.

Однако есть работы, указывающие на регуляторную роль повышенного

количества NKT-лимфоцитов [19, 32, 219]. У больных диссеминированной меланомой кожи при лечении аутологичной дендритноклеточной вакциной было выявлено неблагоприятное прогностическое значение высокого содержания CD45+CD3-CD8+/-CD16+ NK-клеток. Количество NKT-клеток с фенотипом CD45+CD3+CD8+CD16+ у больных со стабилизацией болезни, было на уровне нормы, как до начала терапии, так и на фоне 6 вакцинаций. В группе онкологических больных в 33% случаев популяция NKT лимфоцитов в 2 раза превышала показатели доноров. При этом и CD3+CD56+ и CD3+CD16+ клетки превышали нормальные показатели, составляя  $16,3 \pm 4,4\%$  и  $15,5 \pm 3,4\%$  соответственно, и на фоне терапии наблюдалось дальнейшее его увеличение [3], что позволяет рассматривать увеличение количества CD45+CD3+CD8+CD16+NKT-клеток как неблагоприятный прогностический фактор у этой группы больных при вакцинотерапии, что позволяет предположить, что на ранних стадиях заболевания опухоль и иммунная система решают противоположные задачи [7]. С одной стороны, повышение количества различных субпопуляций регуляторных клеток может быть связано с реакцией опухоли на развивающийся противоопухолевый иммунный ответ, когда начавшая рост опухоль, продуцирует факторы, индуцирующие пролиферацию клеток-супрессоров. Это не выявляется на более поздних стадиях болезни, когда иммунный ответ уже подавлен. С другой стороны, защищаясь от опухоли, организм наращивает активность противоопухолевых механизмов [8, 3]. Эффективность терапии меланомы дендритными клетками отмечается у больных с сохранным количеством и структурой (соотношение CD4+- и CD8+- клеток и отсутствие NKT-лимфоцитов) Т-клеточного звена иммунитета [4].

Роль рецептора CD8 на NK-лимфоцитах изучена слабо. В отличие от CD8-клеток, CD8-положительные натуральные киллеры способны к последовательному лизису нескольких клеток-мишеней. Лизис клеток-мишеней CD8- субпопуляцией NK-лимфоцитов связан с высоким уровнем апоптоза эффекторных клеток, что резко отличается от низких уровней, зарегистрированных для CD8+ клеток при лизисе одних и тех же мишеней [15]. В

то же время, CD8-положительная субпопуляция NK-клеток была определена как наиболее радиочувствительная, уменьшение которой коррелирует с полученной дозой излучения [231]. Было обнаружено, что классические и неклассические молекулы sHLA класса I инициируют апоптоз в CD8 (+) Т-лимфоцитах и в CD8 (+) NK-клетках, у которых отсутствует рецептор Т-клеток и что их апоптотическая способность является сравнимой. Связывание молекул sHLA-A, -B, -C и sHLA-G1 с CD8 приводит к активизации Fas-лиганда (FasL), секреции растворимого FasL (sFasL) и апоптоза CD8 (+) посредством взаимодействия Fas / sFasL [207]. Повышенные уровни экспрессии CD8 на NK-лимфоцитах коррелируют с повышением числа натуральных киллеров и цитотоксической активности [64]. CD8+ NKT-лимфоциты мышей представляют собой 30-50% от общего числа клеток этой популяции и обладают сравнимыми с NK-лимфоцитами и ЦТЛ уровнями перфорины и гранзимов. Данная субпопуляция способна распознавать и уничтожать опухолевые клетки [211]. При этом, описано, что CD8+ NKT-клетки способны к киллингу активированных дендритных клеток, осуществляя регуляцию иммунного ответа. Отмечается, что при ревматоидном артрите и других аутоиммунных заболеваниях человека их количество снижено. [234]. Они преимущественно присутствуют в печени, и в меньшей степени в тимусе. При активации данные клетки секретируют IFN $\gamma$ , причем они неспособны продуцировать IL-4, таким образом, направляя иммунный ответ только по Th1 типу (в отличие от классических iNKT-клеток) [69]. В нашем исследовании была проанализирована коэкспрессия этого CD8 с молекулой CD16 на лимфоцитах. У здоровых доноров количество двойных позитивных по этим молекулам клеток составило 9,1 (5,6; 13,7)%. Эти данные близки к результатам зарубежных исследований [139]. DotPlot анализ с последовательным гейтированием CD3-лимфоцитов позволил отнести CD8<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup> популяцию к NKT-лимфоцитам, в то время как CD8<sup>low</sup>CD16<sup>low</sup>-клетки представляют собой NK-лимфоциты (рисунок 7). CD8<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup> не превышает 5% у здоровых доноров, что связано с небольшим количеством NKT-клеток у этой исследуемой группы. У онкологических больных было зафиксировано незначительное повышение

количества двойных позитивных клеток по данным маркерам, особенно выраженное лишь в группе больных с высоким уровнем CD8. Видимо, это связано с увеличением количеств NKT-клеток и NK-лимфоцитов в данной группе, причем в целом колебания числа CD8+CD16+ клеток в группах с различным уровнем CD8 повторяли колебания числа NK-лимфоцитов, так как они представляют собой основную массу этих клеток. При этом, у больных I-II стадий РМЖ и РСОРП медиана числа данной субпопуляции была выше, чем у пациентов III-IV стадий, что также показывает на снижение роли врожденного звена иммунной системы на поздних стадиях, что было описано выше (таблица 7).

Если сравнивать субпопуляционную структуру групп с различным содержанием CD8+ клеток, подытоживая изложенные ранее результаты по всем исследуемым нозологическим формам, то выявляется ряд общих закономерностей. В группе с высоким уровнем CD8+ лимфоцитов наблюдается повышение всех субпопуляций эффекторных клеток (ЦТЛ CD3+CD8high; NK-клетки CD3-CD16+CD56+CD8low; NKT-лимфоциты CD3+CD16+CD56+CD8low) по сравнению с донорским уровнем, при этом увеличено количество перфорин-содержащих CD8+ клеток с одновременным понижением маркера CD95. В группе с нормальными значениями CD8-положительных лимфоцитов наблюдалось снижение ЦТЛ (показателей и CD3+CD8+, и CD8high), повышенные или нормальные значения NK-клеток при нормальном количестве NKT-лимфоцитов. При этом количество CD8low и CD3+CD8low лимфоцитов было снижено. Количество перфорин-содержащих лимфоцитов оказалось в данной группе нормальным или пониженным по сравнению с донорами, что вызвано уменьшением количества ЦТЛ (подробнее см. раздел 3.4). При этом доля перфоринсодержащих лимфоцитов среди CD8+ клеток была повышена. Наконец, в группе с низкими значениями CD8+ клеток, выявлено резкое снижение количества ЦТЛ по сравнению с донорами, нормальные значения NK-лимфоцитов (исключая больных меланомой, где было отмечено резкое уменьшение) и снижение количества NKT-клеток. Вместе с уменьшением количества ЦТЛ, снижалось и количество перфорин-содержащих лимфоцитов.

Долевое соотношение перфоринсодержащих CD8<sup>+</sup> клеток было разным: сниженным по сравнению с донорами у больных раком яичника и меланомой и повышенным при раке слизистой оболочки полости рта и раке молочной железы.

Судя по всему, в группах с нормальным и сниженным содержанием CD8-положительных лимфоцитов основную роль играют регуляторные механизмы, ограничивающие активацию специфического иммунного ответа, осуществляемого ЦТЛ. При этом неспецифический иммунный ответ лишь незначительно угнетен. Таким образом, при лечении таких пациентов, возможно, необходимо помимо активации эффекторного звена исключить супрессивные воздействия опухоли на иммунную систему [102].

**Таблица 13** — Изменения субпопуляционной структуры эффекторного звена иммунной системы онкологических больных в зависимости от уровня экспрессии общего CD8 по сравнению с донорами.

	Группа пациентов CD8 выше нормы	Группа пациентов CD8 в норме	Группа пациентов CD8 ниже нормы
ЦТЛ CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>high</sup>	↑/N	↓	↓↓
НК-клетки CD3 <sup>-</sup> 16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> CD8 <sup>low</sup>	↑	↑/N	N
НКТ-лимфоциты CD3 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> CD8 <sup>low</sup>	↑	N	↓
CD95 <sup>+</sup>	↓	N	N
CD8 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	↑	N	↓*
CD16 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	N	N	N

\* — данные статистически недостоверны

↑ — повышенные значения по сравнению с нормой

↓ — пониженные значения по сравнению с нормой

N — нормальные значения

В последние годы большое внимание уделяется иммунотерапии онкологических заболеваний и ее комбинации с другими видами лечения,

которые показывают обнадеживающие результаты, в частности у больных меланомой, раком легких, раком молочной железы и другими. Однако, недооцененным остается тот факт, что эффекторные лимфоциты являются широко гетерогенной группой иммунокомпетентных клеток, способных к различной реализации противоопухолевого иммунного ответа, как показано в данном исследовании. На их активность, способность распознавать и уничтожать злокачественные клетки влияют многие факторы, в число которых входит как состояние непосредственно самой иммунной системы, так и подавление активности иммунной системы опухолью с помощью различных механизмов. Для успешного лечения с помощью иммунотерапии важно учитывать иммунологические резервы организма – способность эффекторных клеток к активации, факторы, оказывающие супрессивное воздействие на иммунную систему, баланс между эффекторными и регуляторными субпопуляциями. Только в случае учета всех этих условий возможна корректная оценка и прогноз лечения. В нашем исследовании показано, что при различных нозологических формах и различных стадиях опухолевого процесса активированы различные субпопуляции эффекторного звена иммунитета. При этом время показатели общих групп онкологических больных крайне близки к донорским, в то время как при подробном рассмотрении видно, что состояние иммунной системы пациентов крайне различны между собой за счет изменения баланса между различными популяциями эффекторных клеток. Эти факты также требуют учета при попытках влиять на противоопухолевый ответ, активируя определенные популяции иммунной системы и блокируя супрессорное воздействие других, и подчеркивают важность индивидуального подхода при оценке параметров иммунной системы. Также необходимо принимать во внимание и функциональное состояние присутствующих эффекторных клеток для правильного подбора видов иммунотерапии, которое сможет либо вывести иммунную систему из состояния анергии к опухоли, либо дополнительно стимулировать и активировать иммунный ответ. Подобный подробный многопараметровый анализ основных эффекторных популяций иммунной системы наиболее прост и удобен при

осуществлении его методом проточной цитометрии, которая позволяет практически одновременно оценить фенотипы данных клеток, определяющие их функциональную активность.



## ВЫВОДЫ

10. Фенотипические, функциональные характеристики клеток адаптивного и приобретенного иммунитета, их субпопуляционная структура, сильно варьируют у онкологических больных.

11. Процентное содержание CD8-положительных клеток у здоровых лиц составляет 35,5 (30,6; 41,1)% CD45+ клеток, CD3+CD8+ ЦТЛ – 27 (22,3; 30,7)%. У онкологических больных выявлен широкий диапазон значений CD8+ лимфоцитов от 7% до 60%, при этом для большинства (>45%) пациентов каждой нозологической формы характерны повышенные уровни маркера ( $p = 0,00002$ ), 20-40% пациентов – нормальные значения ( $p = 0,4$ ). Установлено, что высокая плотность антигена CD8 характерна для CD3+CD8+ ЦТЛ, низкая плотность CD8 – для NK-клеток. CD3+CD16+CD56+ NKT-лимфоциты экспрессируют CD8 как с высокой, так и низкой плотностью.

12. NK-лимфоциты экспрессируют антиген CD16 со средней и низкой плотностью и характеризуются фенотипом CD3-CD16low. NKT-лимфоциты экспрессируют CD16 с низкой плотностью и представлены фенотипом CD3+CD16low. Процентное содержание NK-клеток у здоровых лиц составило 15,9 (11,5; 19)%, NKT-клеток — 9,4 (5,3; 14,2)%. У больных раком молочной железы выявлено высокое процентное содержание CD3+CD16+ NKT-лимфоцитов (14,8 (8,9; 19,2)%,  $p = 0,01$ ). Для больных раком яичников характерно повышение CD3-CD16low NK-клеток (22,6 (14,5; 31,3)%,  $p = 0,0001$ ).

13. У здоровых лиц количество двойных позитивных CD8+CD16+ NK и/или NKT-клеток составило 9,1 (5,6; 13,7)%, при этом содержание CD3+CD8highCD16low NKT-клеток не превышало 5% от CD3+ лимфоцитов. У онкологических больных всех нозологических форм с высокими уровнями маркера CD8 повышено число CD8+CD16+ ( $p=0,008$ ) за счет увеличения содержания NK- и/или CD3+CD8highCD16low NKT-клеток (до 20% CD3+ лимфоцитов).

14. Уровень перфорин-содержащих CD8+ и CD16+ лимфоцитов у здоровых лиц составил 14,8 (9,6; 19,8)% и 16,8 (13; 21,7)% соответственно. У

онкологических больных выявлено наличие перфорин-содержащей популяции CD8<sup>low</sup> лимфоцитов (7,7 (5,4; 12)%), отсутствующей у здоровых лиц.

15. Для онкологических больных с высоким уровнем CD8-клеток характерно повышение медианы значений ЦТЛ и НКТ-лимфоцитов по сравнению с показателями здоровых лиц (ЦТЛ CD3+CD8<sup>high</sup>: РЯ – 31%, Меланома – 32,8%, РСОПР – 29,8%, РМЖ – 29,9%,  $p = 0,01$ ; НК-клетки CD3-CD16+CD56+: РЯ – 21,6%, Меланома – 14,6%, РСОПР – 21,4%, РМЖ – 17,6%,  $p = 0,55$ ; НКТ-лимфоциты CD3+CD16+CD56+: РЯ – 12,8%, Меланома – 12,9%, РСОПР – 14,1%, РМЖ – 15,9%,  $p = 0,01$ ).

16. Для онкологических больных с нормальным уровнем CD8<sup>+</sup> лимфоцитов установлено снижение медианы количества ЦТЛ: РЯ – 19,2%, меланома – 20,8%, РСОПР – 18,6%, РМЖ – 20,2% ( $p = 0,0001$ ). Количество НК и НКТ-лимфоцитов соответствует показателям здоровых лиц ( $p = 0,4$  и  $0,1$  соответственно).

17. Для онкологических больных с пониженным уровнем CD8<sup>+</sup> клеток показано резкое уменьшение медианы количества ЦТЛ (РЯ – 14,9%, меланома – 15,9%, РСОПР – 12,9%, РМЖ – 9,5%) ( $p = 0,0003$ ). Количество НК-клеток в данной группе соответствует показателям здоровых доноров ( $p = 0,5$ ), число НКТ-лимфоцитов снижено (РЯ – 5,5%, меланома – 5,3%, РСОПР – 2,2%, РМЖ – 6,5%,  $p = 0,02$ ).

18. Для онкологических больных с высоким уровнем CD8-клеток выявлены статистически достоверные повышенные значения CD8+Perforin+ клеток (РЯ – 17,6%, меланома – 21,8%, РСОПР – 21,1%, РМЖ – 20,2%,  $p = 0,000$ ). При нормальном содержании CD8<sup>+</sup>лимфоцитов количество перфорин-содержащих CD8+Perforin+ клеток снижено или соответствует показателям здоровых лиц (РЯ – 15,5%, меланома – 11,7%, РСОПР – 11,8%, РМЖ – 14,8%,  $p = 0,2$ ). У больных с низким уровнем CD8<sup>+</sup> клеток количество CD8+Perforin+ лимфоцитов резко снижено по сравнению с донорами (РЯ – 9%, меланома – 4,7%, РСОПР – 9,5%, РМЖ – 10,5%,  $p = 0,008$ ).

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- IL — интерлейкин
- MHC — major histocompatibility complex
- NK — natural killer cells
- NKT — natural killer T-cells
- PBS — Phosphate-buffered saline
- TCR — T-cell receptor
- АПК — антиген-презентирующие клетки
- ДК — дендритные клетки
- ИС – иммунологический синапс
- М — меланома
- МКА — моноклональные антитела
- РМЖ — рак молочной железы
- РСОПР — рак слизистой полости рта
- РЯ — рак яичника
- ЭДТА — Этилендиаминтетрауксусная кислота
- ЦТЛ — цитотоксические лимфоциты

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абакушина, Е.В. Фенотип лимфоцитов у больных меланомой кожи после иммунотерапии активированными лимфоцитами / Е.В. Абакушина, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, Д.В. Кудрявцев, Г.Т. Кудрявцева, Н.В. Селиванова // Медицинская иммунология. — 2014. — Т.16, №6. — С. 567-576
2. Барышников, А.Ю. Взаимоотношение опухоли и иммунной системы организма / А.Ю. Барышников // Вопросы туберкулеза. — 2003. — Т.4, №3 — С.127-130
3. Борунова, А.А. Анализ НКТ лимфоцитов больных диссеминированной меланомой кожи при биотерапии / А.А. Борунова, Г.З.Чкадуа, Т.Н.Заботина, О.В.Короткова, Д.В.Табаков, И.Н.Михайлова, З.Г.Кадагидзе // Медицинская иммунология. — 2015. — Т.17, №5. — С.157-158
4. Борунова, А.А. Фенотип лимфоцитов больных меланомой кожи при биотерапии / А.А. Борунова, Г.З.Чкадуа, Т.Н.Заботина, О.В.Короткова, Д.В.Табаков, И.Н.Михайлова, Н.Н.Петенко, З.Г.Кадагидзе // Российский биотерапевтический журнал. — 2016. — Т.15. №1. — С.16. 1
5. Заботина, Т.Н. Субпопуляционная структура лимфоцитов у больных раком яичников / Т.Н. Заботина, О.В. Короткова, А.А. Борунова, Н.Ю. Очеева, И.И. Бокин, К.И. Жордания, И.В. Паниченко, В.Ю. Сельчук, В.В. Кузнецов, З.Г. Кадагидзе // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. — 2010. — Т.21, №1. — С. 46-52
6. Заботина, Т.Н. Изучение структуры CD8 лимфоцитов периферической крови доноров / Т.Н.Заботина, О.В.Короткова, Д.В.Табаков, А.А.Борунова, З.Г.Кадагидзе // Российский биотерапевтический журнал. — 2015. — Т.14, №1. — С.82
7. Кадагидзе, З.Г. Влияние ипилимумаба на субпопуляционную структуру лимфоцитов больных диссеминированной меланомой / З.Г. Кадагидзе., Т.Н., О.В. Короткова, Д.В. Табаков, А.И. Черткова, А.А. Борунова, И.О. Панчук, И.В. Самойленко, Г.Ю.Харкевич, Л.В. Демидов // Практическая онкология. — 2017. — Т.18, №3 — С.285-297

8. Кадагидзе, З.Г. Иммунофенотипический профиль лимфоцитов крови у онкологических больных / З.Г. Кадагидзе, Е.Г. Славина, Т.Н. Заботина, А.И. Черткова, О.В. Короткова, А.А. Борунова // Российский биотерапевтический журнал. — 2013. — Т. 12. № 2. — С. 38;
9. Короткова, О.В. Субпопуляции лимфоцитов периферической крови больных РМЖ / О.В. Короткова, Т.Н. Заботина, Л.В. Скотаренко, А.А. Борунова, Н.Ю. Очеева, И.К. Воротников, З.Г. Кадагидзе // Российский биотерапевтический журнал. — 2011. — Т.10, №3. — С. 95-98
10. Кухарев, Я.В. Показатели иммунного статуса у больных раком молочной железы с разной эффективностью неоадьювантной химиотерапии / Я.В. Кухарев, А.В. Черников, А.В. Сорокина, Ч.К. Серенот Е.Ю. Гарбуков, А.В. Дорошенко, Н.А. Красулина, Ю.Л. Кокорина // Сибирский онкологический журнал — 2007. — С. 64-65
11. Селимова, Л.М. Показатели иммунного статуса периферической крови доноров / Л.М. Селимова, Л.В. Серебровская, Л.Б. Калинина, О.Н. Хохлова, А.Н. Гуляева, Д.Н. Носик // Клиническая лабораторная диагностика. — 2014. — №6 — С.40-43
12. Хайдуков, С.В. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка, А.А. Тотолян, В.А. Черешнев // Медицинская иммунология. — 2009. — Т.11, №(2-3). — С. 227-238.
13. Шубина, И.Ж. Современные представления о противоопухолевом иммунитете / И.Ж. Шубина, А.В. Сергеев, Л.Т. Мамедова, Н.Ю. Соколов, М.В. Киселевский // Российский биотерапевтический журнал. — 2015. — Т. 14, № 3. — С.19-28.
14. Ярилин А.А. Иммунология (Учебник) / А.А. Ярилин — Москва: ГЭОТАР-Медиа. — 2010. — С. 314-336.
15. Addison, E.G. Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity / E.G. Addison, J. North, I.

Bakhsh, C. Marden, S. Haq, S. Al-Sarraj, R. Malayeri, R.G. Wickremasinghe, J.K. Davies, M.W. Lowdell // *Immunology*. — 2005. — Vol.116. — P.354–361

16. Ademmer, K. Effector T lymphocyte subsets in human pancreatic cancer: detection of CD8+ CD18+ cells and CD8+ CD103+ cells by multiepitope imaging / K. Ademmer, M. Ebert, F. Müller-Ostermeyer // *Clinical and Experimental Immunology*. 1998. — Vol. 112, №1. — P. 21–26

17. Ahmad, F. High frequencies of polyfunctional CD8+ NK cells in chronic HIV-1 infection are associated with slower disease progression / F. Ahmad, H.S. Hong, M. Jäckel, A. Jablonka, I.N. Lu, N. Bhatnagar, J.M. Eberhard, B.A. Bollmann, M. Ballmaier, M. Zielinska-Skowronek, R.E. Schmidt, D. Meyer-Olson // *J Virol*. — 2014. Vol.88, №21. — P. 12397-408.

18. Alves, P.C. Ex vivo expansion of CD56+ NK and NKT-like lymphocytes from peripheral blood mononuclear cells of patients with ovarian neoplasia / P.C. Alves, L.A. Andrade, C.A. Petta, I. Lorand-Metze, S.F. Derchain, F. Guimarães // *Scand J Immunol* — 2011 — Vol.74 — P.244-52

19. Ambrosino, E. Crossregulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis / E. Ambrosino, M. Terabe, R. C. Halder // *Journal of Immunology*. — 2007 — Vol. 179, №8. — P.5126–5136

20. Annunziato, F. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. / F. Annunziato, C. Romagnani, S. Romagnani // *J Allergy Clin Immunol*. — 2015. — Vol.135, №3. — P. 626-35

21. Aporta, A. Granulysin induces apoptotic cell death and cleavage of the autophagy regulator Atg5 in human hematological tumors / A. Aporta, E. Catalán, P. Galán-Malo, A. Ramírez-Labrada, M. Pérez, G. Azaceta, L. Palomera, J. Naval, I. Marzo, J. Pardo, A. Anel // *Biochem Pharmacol*. — 2014. — Vol.87, №3. —P. 410-23.

22. Aribi, M. Natural Killer Cells / M.Aribi — 2017. DOI: 10.5772/66568 ISBN: 978-953-51-3672-9 Print ISBN: 978-953-51-3671-2 P. 51-67

23. Azimi, F. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma / F.

Azimi, R.A. Scolyer, P. Rumcheva, M. Moncrieff, R. Murali, S.W. McCarthy, R.P. Saw, J.F. Thompson // *J Clin Oncol.* — 2012. — Vol. 30. — P. 2678–2683.

24. Azzam, H.S. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity / H.S. Azzam // *Journal of Experimental Medicine.* — 1998 — №188 — P.2301–2311

25. Baba, T. Lack and restoration of sensitivity of lung cancer cells to cellular attack with special reference to expression of human leukocyte antigen class I and/or major histocompatibility complex class I chain related molecules A/B / T. Baba, T. Hanagiri, Y. Ichiki, K. Kuroda, Y. Shigematsu, M. Mizukami, M. Sugaya, M. Takenoyama, K. Sugio, K. Yasumoto // *Cancer Sci.* — 2007. — Vol. 98. — P. 1795–1802

26. Bachmann, M.F. Differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections / MF Bachmann, P. Wolint, S. Walton, K Schwarz, A. Oxenius // *Eur. J. Immunol.* — 2007 — Vol.37. — P.1502–1512.

27. Badovinac, V.P. Initial T cell receptor transgenic cell precursor frequency dictates critical aspects of the CD8(+) T cell response to infection / V.P. Badovinac, J.S. Haring, J.T. Harty // *Immunity.* — 2007 — Vol.26 — P.827–841

28. Bajénoff, M. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes / M. Bajénoff, J.G. Egen, L.Y. Koo, J.P. Laugier, F. Brau, N.Glaichenhaus, R.N. Germain // *Immunity.* — 2006 — Vol.25 — P.989–1001.

29. Banchereau, J. Dendritic cells and the control of immunity / J Banchereau, R.M. Steinman // *Nature.* — 1998. — Vol.392. — P. 245–52

30. Barbon, C.M. Alloanergization of human T cells results in expansion of alloantigen-specific CD8(+) CD28(-) suppressor cells / C.M. Barbon, J.K. Davies, A. Voskertchian, R.H. Kelner, L.L. Brennan, L.M. Nadler, E.C. Guinan // *Am J Transplant.* — 2014. — Vol.14, №2. — P. 305-18.

31. Berger, R. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies / R. Berger, R. Rotem-Yehudar, G. Slama // *Clin Cancer Res.* — 2008. — Vol.14. — P.3044–3051

32. Berzofsky, J. A. NKT cells in tumor immunity: opposing subsets define a new immunoregulatory axis / J. A. Berzofsky, M. Terabe // *Journal of Immunology*. — 2008. — Vol.180, №6. — P.3627–3635
33. Bigley, A.B. NK cells and exercise: implications for cancer immunotherapy and survivorship / A.B. Bigley, R.J. Simpson // *Discov Med*. — 2015. — Vol.19, №107. — P.433-45
34. Biron, C.A. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines / C.A. Biron, K.B. Nguyen, G.C. Pien, L.P. Cousens, T.P. Salazar-Mather // *Annu Rev Immunol*. — 1999. — Vol.17. — P.189–220
35. Bonavida, B. NK cell phenotypic and functional heterogeneities and molecular mechanisms of cytotoxicity / B. Bonavida // *Crit Rev Oncog*. — 2014. — Vol.19, №1-2. — P. 21-45.
36. Bots, M. SPI-1 and SPI-6 cooperate in the protection from effector cell-mediated cytotoxicity / M Bots, IG Kolfschoten, SA Bres // *Blood*. — 2005. — Vol.105. — P.1153–1161
37. Bousso, P. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes / P. Bousso, E. Robey // *Nat.Immunol*. —2003 — Vol.4 — P.579–585
38. Bryceson, Y.T. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells / Y.T. Bryceson, M.E. March, D.F. Barber, H.G. Ljunggren, E.O. Long // *J Exp Med*. — 2005 — Vol.202 — P.1001-12
39. Bryceson, YT. Molecular mechanisms of natural killer cell activation / Y.T. Bryceson, S.C. Chihang, S. Darmanin, C. Fauriat, H. Schlums, J. Theorell, S.M. Wood // *J Innate Immun*. — 2011 — Vol.3 — P.216-26
40. Buechel, H.M. Stages versus subsets: Invariant Natural Killer T cell lineage differentiation / H.M. Buechel, M.H. Stradner, L.M. D'Cruz // *Cytokine*. — 2015. — Vol.72, №2. — P. 204-9
41. Bui J.D.. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? / J.D. Bui, R.D. Schreiber // *Curr Opin Immunol*. — 2007. — Vol.19. — P. 203–208



42. Camous, X. NK Cells in Healthy Aging and Age-Associated Diseases / X. Camous, A. Pera, R. Solana, A. Larbi // *J Biomed Biotechnol.* — 2012. — Vol.2012: 195956. Published online 2012 Nov 20. doi: 10.1155/2012/195956 — Порядок доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23251076>
43. Carrio, R. Initial antigen encounter programs CD8+ T cells competent to develop into memory cells that are activated in an antigen-free, IL-7- and IL-15-rich environment / R. Carrio, O.F. Bathe, T.R. Malek // *J. Immunol.* — 2004. — Vol.172. — P.7315–7323.
44. Castelli, C. T cell recognition of melanoma-associated antigens. / C. Castelli, L. Rivoltini, G. Andreola, M. Carrabba, N. Renkvist, G. Parmiani // *J Cell Physiol.* — 2000. — Vol.182. — P.323–331
45. Champagne, P. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. / P. Champagne, G.S. Ogg, A.S.King, C.Knabenhans, K.Ellefsen, M. Nobile // *Nature.* — 2001. — Vol.410. — P.106–111
46. Chang, P.P. Detection of mouse natural killer T follicular helper (NKT(FH)) cells by flow cytometry / P.P. Chang, C.G. Vinuesa // *Methods Mol Biol.* — 2015. — Vol.1291. — P.135-41
47. Cook, D.K. NK Cells and Their Ability to Modulate T Cells during Virus Infections / K.D. Cook, S.N. Waggoner, J.K. Whitmire // *Crit Rev Immunol.* — 2014. — Vol.34, №5. — P. 359–388.
48. Corthay, A. Does the immune system naturally protect against cancer? / A. Corthay // *Front Immunol.* — 2014. — Vol.12. — P.197
49. Costa, N. Distinct expression of perforin and granzyme B in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. / NL Costa, AS Gonçalves, NC Souza-Lima , LG Jaime-Paiva, AP Junqueira-Kipnis, TA Silva, EF Mendonça, AC Batista // *J Oral Pathol Med.* — 2011. — Vol.40, №5. — P. 380-4.
50. Cristaini, C.M. Carbone Human NK Cell Subsets in Pregnancy and Disease: Toward a New Biological Complexity/ C.M. Cristiani, E. Palella, R. Sottile, R. Tallerico, C. Garofalo, E. Carbone // *Front Immunol.* — 2016. — Vol.7. — P.656

51. Crowe, SR. Differential antigen presentation regulates the changing patterns of CD8+ T cell immunodominance in primary and secondary influenza virus infections / S.R. Crowe, S.J. Turner, S.C. Miller, A.D. Roberts, R.A. Rappolo // *J. Exp. Med.* — 2003. — Vol.198. — P. 399–410
52. Cullen, SP. Mechanisms of granule-dependent killing / S.P. Cullen, S.J. Martin // *Cell Death Differ.* — 2008. — Vol.15. — P.251-62
53. Cui, W. Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells / W. Cui, S.M. Kaech // *Immunol Rev.* — 2010. — Vol. 236. — P. 151-66.
54. Curiel, TJ. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival / T.J.Curiel, G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, W. Zou // *Nat Med.* — 2004. — Vol.10. — P. 942–949
55. Curtsinger, J.M. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: Dissociating proliferation and development of effector function. / J.M. Curtsinger, D.C. Lins, M.F. Mescher // *J. Exp. Med.* — 2003. — Vol.197 — P.1141–1151
56. Cunha, C.F. Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis: assessments in active disease, under therapy and after clinical cure / C.F. Cunha, R. Ferraz, M.I.F. Pimentel, M.R. Lyra, A.O. Schubach, A.M. Da-Cruz, A.L. Bertho // *Parasite Immunol.* — 2016. — Vol.38, №4. —P. 244–254.
57. De Maria, A. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> NK cells as rapid producers of abundant IFN- $\gamma$  on activation / A. De Maria, F. Bozzano, C. Cantoni, L. Moretta // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* — 2011. — Vol.108. — P.728–732
58. Decaluwe, H. Gamma(c) deficiency precludes CD8+ T cell memory despite formation of potent T cell effectors / H. Decaluwe, M. Taillardet, E. Corcuff, I.

Munitic, H.K. Law, B. Rocha, Y. Rivière, J.P. Di Santo // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2010 — Vol.107. — P. 9311–9316

59. Dasgupta, S. Type II NKT cells: a distinct CD1d-restricted immune regulatory NKT cell subset / S. Dasgupta, V. Kumar // Immunogenetics. — 2016. — Vol.68, №8. — P. 665-76

60. Del Zotto, G. Markers and function of human nk cells in normal and pathological conditions / G. Del Zotto, E. Marcenaro, P. Vacca, S. Sivori, D. Pende, M. Della Chighesa, F. Moretta, T. Ingegnere, M.C. Mingari, A. Moretta, L. Moretta // Cytometry B Clin Cytom. — 2017. — Vol.92, №2. — P.100-114

61. Delahaye, NF. Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors/ N.F. Delahaye, S. Rusakiewicz, I. Martins, C. Menard, S. Roux, L. Lyonnet, P. Pual, M. Sarabi, N. Chaput, M. Semeraro, V. Minard-Colin, Poirier- V. Colame, K. Chaba, C. Flament, V. Baud, H. Authigher, S. Kerdine-Romer, M. Pallardy, I. Cremer, L. Peaudecerf, B. Rocha, D. Valteau-Couanet, J.C. Gutierrez, J.A. Nunès, F. Commo, S. Bonvalot, N. Ibrahighm, P. Terrier, P. Opolon, C. Bottino, A. Moretta, J. Tavernier, P. Rihet, J.M. Coindre, J.Y. Blay, N. Isambert, J.F. Emile, E. Vivier, A. Lecesne, G. Kroemer, L. Zitvogel // Nature Med. — 2011. — Vol.17. — p.700–7

62. Dhodapkar, M. A Reversible Defect in Natural Killer T Cell Function Characterizes the Progression of Premalignant to Malignant Multiple Myeloma / M.V. Dhodapkar, M.D. Geller, D.H. Chang, K. Shimizu, S. Fujii, Kavita M. Dhodapkar, J. Krasovsky. // J Exp Med. — 2003. — Vol. 197, №12. — P. 1667–1676.

63. Diamond, MS. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors / M.S. Diamond, M. Kinder , H. Matsushighta // J Exp Med. — 2011. — Vol.208. — P.1989-2003

64. Donskoy, B.V. Accentuated hypo- and hyper-NK lymphocyte CD8 expression is a marker of NK subsets' misbalance and is predictive for reproductive failures / B.V. Dons'koi // Immunobiology. — 2015. — Vol.220, №5. — P.649-55.

65. Dudley, M.E. Cancer regression and autoimmunity in patients following clonal repopulation with anti-tumor lymphocytes / M.E. Dudley // *Science*. — 2002 — Vol.298. — P.850–854
66. Dunn, G.P. The three Es of cancer immunoediting / G.P. Dunn, L.J. Old, R.D. Schreiber // *Annu Rev Immunol*. — 2004. — Vol.22. — P.329-60
67. Duraiswamy, J. Replenish the source within: Rescuing tumor-infiltrating lymphocytes by double checkpoint blockade / J. Duraiswamy, G. Freeman, G. Coukos // *Oncoimmunology*. — 2013. — Vol.2:e25912. — Порядок доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3879129>
68. Emoto, M. Liver NKT cells: an account of heterogeneity / M. Emoto, S.H. Kaufmann // *Trends Immunology*. — 2003. — Vol.24. №7. — P. 364 – 369
69. Emoto, M. Phenotypic characterization of CD8(+)NKT cells / M. Emoto, J. Zerrahn, M. Miyamoto, B. Perarnau, S.H. Kaufmann // *Eur J Immunol*. — 2000. — Vol.30. — P. 2300–2311
70. Exley, M.A. Adoptive Transfer of Invariant NKT Cells as Immunotherapy for Advanced Melanoma: A Phase I Clinical Trial / M.A. Exley, P. Friedlander, N. Alatrakchigh, L. Vriend, S. Yue, T. Sasada, W. Zeng, Y. Mizukami, J. Clark, D. Nemer, K. LeClair, C. Canning, H. Daley, G. Dranoff, A. Giobbie-Hurder, F.S. Hodi, J. Ritz, S.P. Balk // *Clin Cancer Res*. — 2017. — Vol.23, №14 — P.3510-3519
71. Fauriat, C. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition / C. Fauriat, E.O. Long, H.-G.Ljunggren, Y. T. Bryceson // *Blood*. — 2010. — Vol.115 — P.2167–2176
72. Fischer, A. Genetic defects affecting lymphocyte cytotoxicity / A. Fischer, S. Latour, G. de Saint Basile // *Curr Opin Immunol*. — 2007. — Vol.19. — P.348-353
73. Freud, A. G. Human natural killer cell development/ A. G.Freud, M. A. Caligiuri // *Immunological Reviews*. — 2006. — Vol.214. — P. 56–72
74. Fujii, S. Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs / S. Fujii, K. Shimizu, M. Kronenberg, R.M. Steinman // *Nat Immunol*. — 2002. — Vol.3, №9. — P. 867–74.

75. Fujii, S. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein / S. Fujii, K. Shimizu, C. Smith, L. Bonifaz, R.M. Steinman // *J Exp Med.* — 2003. — Vol.198, №2. — P. 267–79
76. Fuse, S. Simultaneous analysis of in vivo CD8+ T cell cytotoxicity against multiple epitopes using multicolor flow cytometry / S. Fuse, E. Usherwood // *Immunol Invest.* — 2007. — Vol.36, №5-6. — P. 829-45.
77. Gabrielli, S. The Memories of NK Cells: Innate-Adaptive Immune Intrinsic Crosstalk / S. Gabrielli, C. Ortolani, G. Del Zotto, F. Luchetti, B. Canonico, F. Buccella, M. Artico, S. Papa, L. Zamai // *J Immunol Res.* — 2016. — P.1-14
78. Galon, J. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome / J. Galon, A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pagès, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind // *Science.* — 2006. — Vol.313. — P.1960–196
79. Garboczi, D.N. Structure of the complex between human T cell receptor, viral peptide and HLA-A2. / D.N. Garboczi, P. Ghosh, U. Utz, Q.R. Fan, W.E. Biddison, D.C. Wiley // *Nature.* — 1996. — Vol.384 — P.134–141
80. Gajewski T.F. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment / T.F. Gajewski, H. Schreiber, Y.X. Fu // *Nat Immunol.* — 2013. — Vol.14. — P. 1014-22
81. Gebremeskel, S. Reconstitution models to evaluate natural killer T cell function in tumor control / S. Gebremeskel, D. Slauenwhigte, B. Johnston // *Immunol Cell Biol.* — 2016. — Vol.94, №1 — P.90-100
82. Ghiringhelli, F. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative / F. Ghiringhelli, N. Larmonier, E. Schmitt, A. Parcellier, D. Cathelin, C. Garrido, B. Chauffert, E. Solary, B. Bonnotte, F. Martin // *Eur J Immunol.* — 2004. — Vol.34, №2. — P. 336–344;

83. Giaccone, G. A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors / G. Giaccone, C.J. Punt, Y. Ando, R. Ruijter, N. Nishi, M. Peters // *Clin Cancer Res.* — 2002. — Vol.8, №12. — P.3702–9
84. Gill, S. Rapid development of exhaustion and down-regulation of eomesodermin limit the antitumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells / S. Gill, A.E. Vasey, A. De Souza, J. Baker, A.T. Smith, H.E. Kohrt, M. Florek, K.D.Jr Gibbs, K. Tate, D.S. Ritchie, R.S. Negrin // *Blood.* — 2012. — Vol.119 — P.5758–68
85. Glimcher, L.H. Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells / L.H. Glimcher, M.J. Townsend, B.M. Sullivan, G.M. Lord // *Nat Rev Immunol.* — 2004. — Vol.4. — P. 900-11.
86. Godfrey, D. I. NKT cells: what's in a name? / D. I. Godfrey, H. R. MacDonald, M. Kronenberg, M. J. Smyth, L. Van Kaer // *Nature Reviews Immunology.* — 2004 — Vol. 4, №3. — P. 231–237
87. Godfrey, D.I. NKT cells: facts, functions and fallacies/ D.I. Goodfrey, K.J. Hammone, L.D. Poulton // *Immunology today.* — 2000. — №21 — P. 573 – 583
88. Govindaraj, C. Impaired Th1 immunity in ovarian cancer patients is mediated by TNFR2 $\alpha$  Tregs within the tumor microenvironment / C. Govindaraj, K. Scalzo-Inguanti, M. Madondo // *Clin Immunol.* — 2013. — Vol.149. — P.97–110.
89. Grabbe, S. Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? / S. Grabbe, S. Beissert, T. Schwarz, R.D. Granstein // *Immunol Today.* — 1995. — Vol.16. — P. 117–21.
90. Greenwald, R.J. The B7 family revisited. / R.J. Greenwald, G.J. Freeman, A.H. Sharpe, // *Annu Rev Immunol.* — 2005. — Vol.23. — P.515–548
91. Gross, C.C. Regulatory Functions of Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis / C.C. Gross, A. Schulte-Mecklenbeck, H. Wiendl, E. Marcenaro, N. Kerlero de Rosbo, A. Uccelli, A. Laroni // *Front Immunol.* — 2016. — Vol.7. — P. 606

92. Gruber, I. Relationship between circulating tumor cells and peripheral T-cells in patients with primary breast cancer / I Gruber, N Landenberger, A Staebler, M Hahn, D Wallwiener, T Fehm // *Anticancer Res.* — 2013. — Vol.33, №5. — P. 2233-8.
93. Guillerey, C. Immunosurveillance and therapy of multiple myeloma are CD226 dependent/ C. Guillerey, L. Ferrari de Andrade, S. Vuckovic, K. Miles, S.F. Ngiow, M.C. Yong // *J Clin Invest.* — 2015. — Vol. 125. — P.2077–89
94. Hanssen, S. Immunological analogies between ovarian cancer and pregnancy / S. Hanssen, P. Collinet, E. Leblanc, M. Salzet, D. Vinatier // *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* — 2013. — Vol.42, №3. — P. 217-26.
95. Harty, JT. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory / J.T. Harty, V.P. Badovinac // *Nat Rev Immunol.* — 2008. — Vol. 8. — P. 107–119.
96. Highckman, HD. Direct priming of antiviral CD8+ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes / H.D. Highckman, K. Takeda, C.N. Skon, F.R. Murray, S.E. Hensley, J. Loomis, G.N. Barber, J.R. Bennink, J.W. Yewdell // *Nat. Immunol.* — 2008. — Vol.9 — P.155–165
97. Highnz, S. Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis/ S. Highnz, A. Trauzold, L. Boenicke // *Oncogene.* — 2000. — Vol.19. — P.5477–5486
98. Hua, W. Detection of anti-tumor immunity of patients with breast cancer and its clinical significance / W. Hua, Z. Qiang, D. Jia-Rong // *Tumor.* — 2006. — Vol.26, №3. — P. 279–81.
99. Imai, K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population / K. Imai, S. Matsuyama, S. Miyake, K. Suga, K. Nakachigh // *Lancet.* — 2000. — Vol. 356. — P.1795-1799
100. Intlekofer, A. M. Effector and memory CD81 T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin / A.M. Intlekofer, N. Takemoto, E.J. Wherry, S.A. Longworth, J.T. Northrup, V.R. Palanivel, A.C. Mullen // *Nat. Immunol.* — 2005. — Vol.6. — P. 1236–1244.

101. Izhak, L. Delicate balance among three types of T cells in concurrent regulation of tumor immunity / L. Izhak, E. Ambrosino, S. Kato, S.T. Parish, J.J. O'Konek, H. Weber, Z. Xia, D. Venzon, J.A. Berzofsky, M. Terabe // *Cancer Res.* — 2013. — Vol.73. — P.1514–1523.

102. Jackson, S. Targeting CD8+ T-cell tolerance for cancer immunotherapy / S.R. Jackson, J. Yuan, R.M. Teague // *Immunotherapy.* — 2014. — Vol.6, №7. — P. 833–852.

103. Janeway, C.A.Jr. *ImmunoBiology, the immune system in health and disease* 4th ed. / C.A. Jr. Janeway, P. Travers, M. Walport // London Elsevier Science. — 1999. — P.635

104. Jeremy B. Swann. Immune surveillance of tumors / Jeremy B. Swann, M. J. Smyth // *J Clin Invest.* — 2007. — Vol.117. — P.1137–1146

105. Jia, Y. Levels of lymphocyte subsets in peripheral blood prior treatment are associated with aggressive breast cancer phenotypes or subtypes / Y. Jia, L. Xu, Q. Lin, M. Zhu, L. Ding, K. Wu, Y. Lu // *Med Oncol.* — 2014. — Vol.31, №6. — P.981.

106. John, B. Dynamic imaging of CD8(+) T cells and dendritic cells during infection with *Toxoplasma gondii*. / B. John, T.H. Harris, E.D. Tait, E.H. Wilson, B. Gregg, L.G. Ng, P. Mrass, D.S. Roos, F. Dzierzinski, W. Weninger, C.A. Hunter // *PLoS Pathog.* — 2009 — Vol.5, №7. — Режим доступа: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000505>

107. Johnston, R.J. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function / R.J. Johnston, L. Comps-Agrar, J. Hackney, X. Yu, M. Huseni, Y. Yang, S. Park, V. Javinal, H. Chiu, B. Irving, D.L. Eaton, J.L. Grogan // *Cancer Cell.* — 2014. — Vol.26, №6. — P. 923–937

108. Joshi, N. S. Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation / N.S. Joshi, S.M. Kaech // *J Immunol.* — 2008. — Vol.180. — P.1309–1315

109. Jung, S. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens // S. Jung, D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos // *Immunity.* — 2002. — Vol.17. — P.211–20



110. Kaech, S.M. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development / S.M. Kaech, E.J. Wherry, R. Ahmed. // *Nat Rev Immunol.* — 2002. — Vol.2. — P. 251–262.

111. Kalia, V. Prolonged interleukin-2Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. / V. Kalia, S. Sarkar, S. Subramaniam, W.N. Haining, K.A. Smith, R. Ahmed // *Immunity.* — 2010 — Vol.32 —P. 91–103

112. Kato, S. Possible therapeutic application of targeting type II natural killer T cell-mediated suppression of tumor immunity / S. Kato, J.A. Berzofsky, M. Terabe // *Front Immunol.* — 2018. — Vol.9, P. 314. — Порядок доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5827362/>

113. Keppler, S.J. Effector T-cell differentiation during viral and bacterial infections: role of direct IL-12 signals for cell fate decision of CD8(+) T cells / S.J. Keppler, K. Theil, S. Vucikuj, P. Aichele // *Eur J Immunol.* — 2009. — Vol.39. — P. 1774–1783.

114. Kienzle, N. A clonal culture system demonstrates that IL-4 induces a subpopulation of noncytolytic T cells with low CD8, perforin, and granzyme expression / N. Kienzle, K. Buttigieg, P. Groves, T. Kawula, A. Kelso // *J Immunol.* — 2002. — Vol.168, №4 — P. 1672-81.

115. Kimberly, A. Impaired natural killer cell lysis in breast cancer patients with high levels of psychological stress is associated with altered expression of killer immunoglobulin-like receptors / A. Kimberly, C. E. Terrell, M. Welt, S. Suleiman, L. Thornton, B.L. Andersen,, W. E. Carson // *Surg Res.*Vol. — 2007. — Vol.139, №1 — P.36–44

116. Kobayashi, E. KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities / E. Kobayashi, K. Motoki, T. Uchida, H. Fukushima, Y. Koezuka // *Oncol Res.* — 1995. — Vol.7, №10–11 — P. 529–34

117. Koch, U. Mechanisms of T cell development and transformation. / U. Koch, F. Radtke // *Annu Rev Cell Dev Biol.* — 2011. — Vol.27. — P. 539-62

118. Koh, J. Clinicopathologic implications of immune classification by PD-L1 expression and CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes in stage II and III gastric cancer patients / J. Koh, C.-Y. Ock, J.W. Kim, S.K. Nam, Y. Kwak, S. Yun, S.-H. Ahn, D.J. Park, H.-H. Kim, W.H. Kim, H.S. Lee // *Oncotarget*. — 2017. — Vol.8, №16. — P. 26356–26367.
119. Konjevic, G. Investigation of NK cell function and their modulation in different malignancies / G Konjevic, V Jurisic, V Jovic, A Vuletic, K Mirjacic Martinovic, S Radenkovic, I Spuzic // *Immunol Res*. — 2012. — Vol.52, №1-2. — P. 139-56.
120. Korecka-Polak, A. Suppressor Properties of Human CD8(+)CD28(-) T Cells in Mixed Leukocyte Reaction are not Affected by CsA and RAPA / A. Korecka-Polak, K. Bocian, M. Pachówka, A. Jałbrzykowska, G. Korczak-Kowalska // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. — 2016. — Vol.64, №5. — P. 409-16
121. Kreike, B. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas / B. Kreike, M. van Kouwenhove, H. Horlings, B. Weigelt, H. Peterse, H. Bartelink, M.J. van de Vijver // *Breast Cancer Res*. — 2007. — Vol.9. — 65
122. Lanier L.L. Shades of grey-the blurring view of innate and adaptive immunity / L.L. Lanier // *Nature Reviews Immunology*. — 2013. — Vol.13 — P.73–74
123. Lanier, LL. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56) / L.L. Lanier, C. Chang, M. Azuma, J.J. Ruitenber, J.J. Hemperly, J.H. Phighllips. // *J Immunol* – 1991 – Vol.146 – P.4421–6
124. Latha, T. Ovarian cancer biology and immunotherapy / T.S. Latha, K. Panati, D.S. Gowd, M.C. Reddy, D. Lomada // *Int Rev Immunol*. — 2014. — Vol.33, №5. — P. 428-40
125. Laytragoon-Lewin, N. Perforin, CD28 and CD95 expression in circulating CD4 and CD8 cells as predictors of head and neck (H&N) cancer patient survival / N.

Laytragoon-Lewin, F. Jönson, J. Lundgren, L.E. Rutqvist, A. Wikby, S. Löfgren, F. Lewin // *Med Oncol.* — 2014. — Vol.31, №12. — P. 290.

126. Lee, Y.J. Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells / Y.J. Lee, K.L. Holzapfel, J. Zhu, S.C. Jameson, K.A. Hogquist // *Nat Immunol.* — 2013. — Vol.14, №11. — P. 1146–54

127. Lee, Y.J. Tissue-specific distribution of iNKT cells impacts their cytokine response / Y.J. Lee, H. Wang, G.J. Starrett, V. Phuong, S.C. Jameson, K.A. Hogquist // *Immunity.* — 2015. — Vol.43, №3. — P.566–78

128. Leitner, J. CD58/CD2 Is the Primary Costimulatory Pathway in Human CD28-CD8+ T Cells / J. Leitner, D. Herndler-Brandstetter, G.J. Zlabinger, B. Grubeck-Loebenstein, P. Steinberger // *J Immunol.* — 2015. — Vol.195, №2. — P. 477-87

129. Li, K. T-cell-associated cellular immunotherapy for lung cancer / K. Li, Q. Zhang, Y. Zhang, J. Yang, J. Zheng // *J Cancer Res Clin Oncol.* — 2015. — Vol.141, №7. — P.1249-58

130. Li, Y. Tumor immunotherapy: New aspects of natural killer cells / Y. Li, R. Sun // *Chin J Cancer Res.* — 2018. — Vol.30, №2. — P.173–196

131. Long, E.O. ICAM-1: getting a grip on leukocyte adhesion / E.O. Long // *J Immunol.* — 2011. — Vol.186, №9. — P. 5021-3

132. Lucas, M. Frequency and phenotype of circulation Va24/Vb11 double-positive natural killer Y cells during hepatitis C infection / M. Lucas, S.Gadoba, U. Meier // *Journal of Virology.* — 2003. — Vol.77, №3 — P.2251-2257

133. Lydiatt, WM. 9p21 deletion correlates with recurrence in head and neck cancer/ W.M. Lydiatt, B.J. Davidson, S.P. Schantz, S. Caruana, R.S. Chaganti // *Head Neck.* — 1998. — Vol.20. — P.113–8

134. Maggi, E. Th2-like CD81 T cells showing B cell helper function and reduced cytolytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection / E. Maggi, M.G. Giudizi, R. Biagiotti, F. Annunziato, R. Manetti, M.P. Piccinni // *J Exp Med.* — 1994. — Vol.180. — P. 489-95.

135. Mahmoud SM. Tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer / S.M. Mahmoud, E.C. Paish, D.G. Powe, R.D. Macmillan, M.J. Grainge, A.H. Lee, I.O. Ellis, A.R. Green // *J Clin Oncol.* — 2011. — Vol.29. — P. 1949–1955.

136. Malek, TR. Interleukin-2 receptor signaling: At the interface between tolerance and immunity / T.R. Malek, I. Castro // *Immunity.* — 2010 — Vol.33. — P. 153–165

137. Mamessier, E. Peripheral Blood NK Cells from Breast Cancer Patients Are Tumor-Induced Composite Subsets / E. Mamessier, L.C. Pradel, M.-L. Thibult, C. Drevet, A. Zouine, J. Jacquemier, G. Houvenaeghel, F. Bertucci, D. Birnbaum, D. Olive // *J Immunol.* — 2013. — Vol.190, №5. — P. 2424-2436

138. Mamessier, E. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity / E. Mamessier, A. Sylvain, M.-L. Thibult, G. Houvenaeghel, J. Jacquemier, R. Castellano, A. Gonçalves, P. André, F. Romagné, G. Thibault, P. Viens, D. Birnbaum, F. Bertucci, A. Moretta, D. Olive // *J Clin Invest.* — 2011. — Vol.121, №9. — P. 3609–3622.

139. Mansour, I. CD16<sup>+</sup> NK cells decrease in all stages of HIV infection through a selective depletion of the CD16<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> subset / I. Mansour, C. Doinel, P. Rouger // *AIDS Res Hum Retroviruses.* — 1990. — Vol.6, №12. — P.1451-7.

140. Marcenaro, E. Regulatory Functions of Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis / E. Marcenaro, N. Kerlero de Rosbo, A. Uccelli, A. Laroni // *Front Immunol* — 2016 – Vol.7 P. 606

141. Melero, I. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors / I. Melero, W.W. Shuford, S.A. Newby, A. Aruffo, J.A. Ledbetter, K.E. Hellström, R.S. Mittler, L. Chen // *Nat Med.* — 1997. — Vol.3, №6. — P. 682–685

142. Mempel, T.R. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases / T.R. Mempel, S.E. Henrickson, U.H.Von Andrian // *Nature.* — 2004. — Vol.427. — P. 154–159

143. Mescher, MF. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells / M.F. Mescher, J.M. Curtsinger, P. Agarwal, K.A. Casey, M. Gerner, C.D. Hammerbeck, F. Popescu, Z. Xiao // *Immunol. Rev.* — 2006. — Vol.211. — P. 81–92

144. Metkar, SS. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation / S.S. Metkar, B. Wang, M. Aguilar-Santelises, S.M. Raja, L. Uhlin-Hansen, E. Podack, J.A. Trapani, C.J. Froelich // *Immunity.* — 2002. — Vol.16. — P. 417-28

145. Michalek, RD. The metabolic life and times of a T-cell / R.D. Michalek, J.C. Rathmell // *Immunol. Rev.* — 2010. — Vol.236. — P.190–202

146. Miller, MJ. Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy / M.J. Miller, S.H. Wei, M.D. Cahalan, I. Parker // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol.100. — P. 2604–2609

147. Mirjagic Martinovich, KM. Decreased expression of NKG2D, NKp46, DNAM-1 receptors, and intracellular perforin and STAT-1 effector molecules in NK cells and their dim and bright subsets in metastatic melanoma patients / K.M. Mirjačić Martinović 1, N.Lj. Babović , R.R. Džodić , V.B. Jurišić , N.T. Tanić , G.M. Konjević // *Melanoma Res.* — 2014. — Vol.24,№4. — P. 295-304.

148. Mlecnik B. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction / B. Mlecnik, M. Tosolini, A. Kirilovsky, A. Berger, G. Bindea, T. Meatchi, P. Bruneval, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, F. Pagès, J. Galon // *J Clin Oncol.* — 2011. — Vol.29. — P. 610–618

149. Molling, JW. Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma / JW Molling, JA Langius, JA Langendijk // *J Clin Oncol.* — 2007. — Vol.25. — P. 862–8.

150. Moretta, A. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity / A. Moretta, C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M.C. Mingari // *Annu Rev Immunol.* — 2001. — Vol.19. — P.197–223

151. Moretta, L. Human NK cells: from surface receptors to the therapy of leukemias and solid tumors / L. Moretta, G. Pietra, E. Montaldo, P. Vacca, D. Pende, M. Falco, G. Del Zotto, F. Locatelli, A. Moretta, M.C. Mingari // *Front Immunol.* — 2014. — Vol. 5. — P.87
152. Moretta, L. Human NK cells: From surface receptors to clinical applications / L. Moretta, G. Pietra, P. Vacca, D. Pende, F. Moretta, A. Bertaina, M.C. Mingari, F. Locatelli, A. Moretta // *Immunol Lett.* — 2016. — Vol.178. — P.15-9
153. Mosmann, TR. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins / T.R. Mosmann, H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, R.L. Coffman // *J Immunol* — 1986. — Vol.175. — P. 5-14.
154. Mosmann, T.R. Differentiation of subsets of CD41 and CD81 T cells / T.R. Mosmann, S. Sad, L. Krishnan, T.G. Wegmann, L.J. Guilbert, M. Belosevic // *Ciba Found Symp.* — 1995. — Vol.195 — P.42-50.
155. Muenst, S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts / S. Muenst, H. Läubli, S.D. Soysal, A. Zippelius, A. Tzankov, S. Hoeller // *J Intern Med.* — 2016. — Vol.279. — P.541–562
156. Nagata, S. Fas-mediated apoptosis / S. Nagata // *Adv Exp Med Biol.* — 1996. — Vol.406. —P. 119–124
157. Navarro, F. The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells / F. Navarro, M. Llano, T. Bellon, M. Colonna, D.E. Geraghty, M. Lopez-Botet // *Eur J Immunol.* — 1999. — Vol.29. — P. 277–283
158. Novellino, L. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update / L. Novellino, C. Castelli, G. Parmiani // *Cancer Immunol Immunother.* — 2004. — Vol.54. — P.187–207
159. Nurieva, R.T-cell tolerance in cancer / R. Nurieva, J. Wang, A. Sahoo // *Immunotherapy.* — 2013. — Vol. 5. — P. 513–531
160. O'Sullivan, T. Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity / T. O'Sullivan, R. Saddawi-Konefka, W. Vermi, C.M.

Koebel, C. Arthur, J.M. White, R. Uppaluri, D.M. Andrews, S.F. Ngiow, M.W. Teng, M.J. Smyth, R.D. Schreiber, J.D. Bui // *J Exp Med.* — 2012. — Vol.209, №10. — P. 1869-82

161. Obar, J.J. CD4+ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8+ T cells in primary and secondary responses / J.J. Obar, M.J. Molloy, E.R. Jellison, T.A. Stoklasek, W. Zhang, E.J. Usherwood, L.Lefrançois // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2010. — Vol.107. — P. 193–198.

162. Orange, JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse/ J.S. Orange // *Nat Rev Immunol.* — 2008. — Vol.8. — P.713-25

163. Overwijk, WW. Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells / W.W. Overwijk, M.R. Theoret, S.E. Finkelstein, D.R. Surman, L.A. de Jong , F.A. Vyth-Dreese, T.A. Dellemijn, P.A. Antony, P.J. Spiess, D.C. Palmer, D.M. Heimann, C.A. Klebanoff, Z. Yu, L.N. Hwang, L. Feigenbaum, A.M. Kruisbeek, S.A. Rosenberg, N.P. Restifo // *J Exp Med* — 2003. — Vol.198. — P. 569–580

164. Pages, F. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer / F Pagès, A. Berger, M. Camus, F. Sanchez-Cabo, A. Costes, R. Molitor, B. Mlecnik, A. Kirilovsky, M. Nilsson, D. Damotte, T. Meatchi, P. Bruneval, P.H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, J. Galon // *N Engl J Med.* — 2005. — Vol.353. — P.2654–2666.

165. Pandey, V. Anti-ovarian tumor response of donor peripheral blood mononuclear cells is due to infiltrating cytotoxic NK cells / V. Pandey, J.L. Oyer, R.Y. Igarashi, S.B. Gitto, A.J. Copik, D.A. Altomare // *Oncotarget.* — 2016. — Vol.7, №6. — P. 7318–7328.

166. Parish, I.A. Diversity in CD8(+) T cell differentiation / I.A. Parish, S.M. Kaech // *Curr. Opin. Immunol.* —2009 — Vol.21. — P. 291–297

167. Paul, S. Intratumoral natural killer cells show reduced effector and cytolytic properties and control the differentiation of effector Th1 cells / S. Paul, N. Kulkarni, Shighlpi, G. Lal // *Oncoimmunology.* — 2016. — Vol. 5, №12 — Режим доступа:

[https://www.researchgate.net/publication/308450667\\_Intratumoral\\_natural\\_killer\\_cells\\_show\\_reduced\\_effector\\_and\\_cytolytic\\_properties\\_and\\_control\\_the\\_differentiation\\_of\\_effector\\_Th1\\_cells](https://www.researchgate.net/publication/308450667_Intratumoral_natural_killer_cells_show_reduced_effector_and_cytolytic_properties_and_control_the_differentiation_of_effector_Th1_cells)

168. Pearce, E.L. Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12 / E.L. Pearce, H. Shen // *J. Immunol.* — 2007. — Vol.179. — P. 2074–2081.

169. Pei, B. Invariant NKT cells require autophagy to coordinate proliferation and survival signals during differentiation / B. Pei, M. Zhao, B.C. Miller, J.L. Vela, M.W. Bruinsma, H.W. Virgin, M. Kronenberg // *J Immunol.* — 2015. — Vol.194, №12. — P. 5872-84.

170. Peng, YP. Comprehensive analysis of the percentage of surface receptors and cytotoxic granules positive natural killer cells in patients with pancreatic cancer, gastric cancer, and colorectal cancer / Y.P. Peng, Y. Zhu, J.J. Zhang, Z.K. Xu, Z.Y. Qian, C.C. Dai // *J Transl Med.* — 2013. — Vol.11. — P.262

171. Piccioli, D. Human plasmacytoid dendritic cells are unresponsive to bacterial stimulation and require a novel type of cooperation with myeloid dendritic cells for maturation / D. Piccioli, C. Sammicheli, S. Tavarini // *Blood.* — 2009. — Vol.113. — P. 4232-4239

172. Pilonis, K.A. Review Article Invariant NKT Cells as Novel Targets for Immunotherapy in Solid Tumors / K.A. Pilonis, J. Aryankalayil, S.Demaria // *Clinical and Developmental Immunology.* — Vol. 2012. — P.1-11

173. Pipkin, ME, Sacks JA, Cruz-Guilloty F, Lichtenheld MG, Bevan MJ, Rao A. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells / M.E. Pipkin, J.A. Sacks, F. Cruz-Guilloty, M.G. Lichtenheld, M.J. Bevan, A. Rao // *Immunity.* — 2010. — Vol.32. — P. 79–90

174. Poli, A. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset / A. Poli, T. Michel, M. Thérésine, E. Andrès, F. Hentges, J. Zimmer // *Immunology.* — 2009. — Vol.126. — P. 458–65



175. Poschke, I. Tumor-induced changes in the phenotype of blood-derived and tumor-associated T cells of early stage breast cancer patients / I. Poschke, J. De Boniface, Y. Mao, R. Kiessling // *Int J Cancer*. — 2012. — Vol.131, №7. — P.1611-20
176. Probst, HC. Priming of CTLs by lymphocytic choriomeningitis virus depends on dendritic cells / H.C. Probst, M.J. den van Broek // *Immunol.* — 2005. — Vol. 174. — P. 3920–24
177. Pufnock J.S. Oncoprotein signaling mediates tumor-specific inflammation and enhances tumor progression / J.S. Pufnock, J.L. Rothstein // *J Immunol.* — 2009. — Vol.182. — P. 5498–5506
178. Qu, P. Expansion and functions of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment / P. Qu, L.Z. Wang, P.C. Lin // *Cancer Lett.* — 2016. — Vol.380, №1. — P. 253-6.
179. Renukaradhya, GJ. Type I NKT cells protect (and type II NKT cells suppress) the host's innate antitumor immune response to a B-cell lymphoma / G.J. Renukaradhya, M.A. Khan, M. Vieira, W. Du, J. Gervay-Hague, R.R. Brutkiewicz // *Blood*. — Vol.111. — P.5637–5645
180. Riazi, R.F. Comparative analysis of CD4+ and CD8+ T cells in tumor tissues, lymph nodes and the peripheral blood from patients with breast cancer / R.F. Riazi, S. Ajdary, R. Omranipour, M.H. Alimohammadian, Z.M. Hassan // *Iran Biomed J.* — 2015. — Vol.19, №1. — P.35-44
181. Ribatti, D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories / D. Ribatti // *Oncotarget*. — 2017. — Vol.8, №4. — P.7175-7180
182. Rivoltini, L. Human melanoma-reactive CD4+ and CD8+ CTL clones resist Fas ligand-induced apoptosis and use Fas/Fas ligand-independent mechanisms for tumor killing / L Rivoltini, M Radrizzani, P Accornero, P Squarcina, C Chiodoni, A Mazzocchi, C Castelli, P Tarsini, V Viggiano, F Belli, MP Colombo, G Parmiani // *J Immunol.* — 1998. — Vol.161, №3. — P. 1220-30.
183. Romagnani, S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more / S. Romagnani // *Immunol Today*. — 1991. — Vol.12. — P. 256-7.

184. Romagnani, S. Lymphokine production by human T cells in human disease states / S. Romagnani // *Annu Rev Immunol.* — 1994. — Vol.12. — P. 227-57.
185. Rosenberg, EB. Lymphocyte cytotoxicity reactions to leukemia-associated antigens in identical twins / E.B. Rosenberg, R.B. Herberman, PH Levine, R.H. Halterman, J.L. McCoy, J.R. Wunderlich // *Int J Cancer.* — 1972. — Vol. 9. — P.648-658
186. Rosenberg, SA, James C Yang, and Nicholas P Restifo. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines / S.A. Rosenberg, J.C. Yang, N.P. Restifo // *Nat Med.* — 2004. — Vol.10. — P. 909–915
187. Sanlorenzo, M. Melanoma immunotherapy / M. Sanlorenzo, I. Vujic, C. Posch, A. Dajee, A. Yen, S. Kim, M. Ashworth, M.D. Rosenblum, A. Algazi, S. Osella-Abate, P. Quaglino, A. Daud, S. Ortiz-Urda // *Cancer Biol Ther.* — 2014. — Vol.15, №6. — P. 665–674.
188. Schlesinger, M. Contribution of very late antigen-4 (VLA-4) integrin to cancer progression and metastasis / M. Schlesinger, G. Bendas // *Cancer Metastasis Rev.* — 2015. — Vol.34, №4. — P. 575-91
189. Schmidt, M. The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer / M. Schmidt, D. Bohm, C. von Torne, E. Steiner, A. Puhl, H. Pilch, H.A. Lehr, J.G. Hengstler, H. Kolbl, M. Gehrman // *Cancer Res.* — 2008. — Vol.68. — P.5405–5413.
190. Schmieg, J. Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide / J. Schmieg, G. Yang, R.W. Franck, M. Tsuji // *J Exp Med.* — 2003. — Vol.198, №11. — P. 1631–41
191. Schneiders F. L. Activated iNKT cells promote V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T cell anti-tumor effector functions through the production of TNF- $\alpha$  / F. L. Schneiders, R. C. G. de Bruin, S. J. A. M. Santegoets // *Clinical Immunology* — 2012. — Vol.142, № 2. — P. 194–200, 2012

192. Schrama D. Cytotoxic T Cells / D. Schrama, M.H. Andersen, Per thor Straten, J.C. Becker // *Journal of Investigative Dermatology* — 2006. — Vol.126. — P. 32–41.
193. Schriber, H. Tumor Immunology in Fundamental Immunology (ed. Paul, W.E.) / H. Schriber — Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins — 2003. —P. 1557–1592
194. Schnurr, M. Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and  $\gamma\delta$ T cells / M. Schnurr, C. Scholz, S. Rothenfusser // *Cancer Research*. — 2002. — Vol. 62, №8. — P.2347–2352
195. Screpanti, V. Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. / V. Screpanti, R.P. Wallin, A. Grandien, H.G. Ljunggren // *Mol Immunol*. — 2005. — Vol. 42. — P.495-9
196. Shankaran, V. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity / V. Shankaran, H. Ikeda, A.T. Bruce, J.M. Whighte, P.E. Swanson, L.J. Old, R.D. Schreiber // *Nature*. — 2001. — Vol. 410. — P.1107-11
197. Shen, Y. Analysis of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-suppressor cells in gastric cancer patients / Y. Shen, Q.X. Qu, Y.B. Zhu, X.G. Zhang // *J Immunoassay Immunochem*. — 2012. — Vol.33, №2. — P. 149-55
198. Shighn, M.S. Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers/ M.S. Shighn, H.S. Kim, S.H. Lee. // *Cancer Res*. — 2001. — Vol.61. — P.4942–4946
199. Sica, A. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development / A. Sica, V. Bronte // *Journal of Clinical Investigation*. — 2007. — Vol.117, №5. — P.1155–1166
200. Singh, AK. Differential dendritic cell-mediated activation and functions of invariant NKT-cell subsets in oral cancer / AK Singh, P Gaur, NK Shukla, SN Das // *Oral Dis*. — 2015. — Vol.21, №1. — P.105-13.

201. Singh, AK. Altered invariant natural killer T cell subsets and its functions in patients with oral squamous cell carcinoma / AK Singh, NK Shukla, SN Das // *Scand J Immunol.* — 2013. — Vol.78, №5. — P.468-77

202. Smyth, M.J. Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer / M.J. Smyth, M.E. Wallace, S.L. Nutt, H. Yagita, D.I. Godfrey, Y. Hayakawa // *J Exp Med.* — 2005. — Vol.201, №12. — P. 1973–85

203. Snook, A. Advances in cancer immunotherapy / A.E. Snook, S.A. Waldman // *Discoy Med.* — 2013. — Vol.15, №81. — P. 120-125

204. Sobao, Y. Visual demonstration of hepatitis C virus-specific memory CD8+ T-cell expansion in patients with acute hepatitis C / Y. Sobao, Tomiyama, S.Nakamura, H. Sekihara, K. Tanaka, M. Takiguchigh, // *Hepatology.* — 2001. — Vol.33. — P.287–294

205. Sommariva, M. Activation of NK cell cytotoxicity by aerosolized CpG-ODN/poly(I:C) against lung melanoma metastases is mediated by alveolar macrophages / M Sommariva, V. Le Noci, C. Storti, F. Bianchigh, E. Tagliabue, A. Balsari, L. Sfondrini // *Cell Immunol.* — 2017. — Vol.313. — P. 52-58.

206. Soriani A. ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype / A. Soriani, A. Zingoni, C. Cerboni, M.L. Iannitto, M.R. Ricciardi, V. Di Gialleonardo, M. Cippitelli, C. Fionda, M.T. Petrucci, A. Guarini, R. Foà, A. Santoni // *Blood.* — 2009. — Vol.113, №15. — P. 3503–3511

207. Spaggiari, G.M. Soluble HLA class I molecules induce natural killer cell apoptosis through the engagement of CD8: evidence for a negative regulation exerted by members of the inhibitory receptor super-family / G.M. Spaggiari, P. Contini, R. Carosio, M. Arvigo, M. Ghio, D. Oddone, A. Dondero, M.R. Zocchi, F. Puppo, F. Indiveri, A. Poggi // *Blood.* — 2002. — Vol.99. — P.1706–1714.

208. Speiser, DE. Self antigens expressed by solid tumors do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy/ D.E. Speiser // *J Exp Med.* — 1997. — Vol.186. — P. 645–653

209. Stambrook, P. Cancer Immunotherapy: Whence and Whither / P. Stambrook, J. Maher, F. Farzaneh // *Mol Cancer Res.* — 2017. — Vol.15, №6. — P. 635-650

210. Stetson, D.B.. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function / D.B. Stetson, M. Mohrs, R.L. Reinhardt, J.L. Baron, Z.E. Wang, L. Gapin // *J Exp Med.* — 2003 — Vol.198, №7. — P. 1069–76

211. Stremmel, C. Characterization of the phenotype and function of CD8(+), alpha / beta(+) NKT cells from tumor-bearing mice that show a natural killer cell activity and lyse multiple tumor targets / C. Stremmel, M. Exley, S. Balk, W. Hohenberger, V.K. Kuchroo // *Eur J Immunol.* — 2001. — Vol.31. — P. 2818–2828

212. Sugawa, N. Frequency of IFN beta 1 gene loss in 47 primary human gliomas / N. Sugawa, A.J. Ekstrand, S. Ueda, V.P. Collins // *Noshuyo Byori.* — 1993. — Vol.10. — P.161–3

213. Takahashi, K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // *Cell.* — 2006. — Vol.126, №4. — P. 663-76.

214. Takahashigh, H. FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhighbitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes / H. Takahashigh, F. Feuerhake, J.L. Kutok // *Clin. Cancer Res.* — 2006. — Vol.12. — P.3265–3271

215. Talerico, R. NK cells control breast cancer and related cancer stem cell hematological spread/ R. Talerico, L. Conti, S. Lanzardo, R. Sottile, C. Garofalo, A.K. Wagner, M.H. Johansson, C.M. Cristiani, K. Kärre, E. Carbone, F. Cavallo // *Oncoimmunology.* — 2017. — Vol.6 №3 — Режим доступа: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2017.1284718>

216. Tarazona, R. Flow Cytometry Analysis of NK Cell Phenotype and Function in Aging / R. Tarazona, C. Campos, A. Pera, B. Sanchez-Correa, R. Solana // *Methods Mol Biol.* — 2015. — Vol.1343. — P.9-18

217. Teng, M.W. From mice to humans: developments in cancer immunoediting / M.W. Teng, J. Galon, W.H. Fridman, M.J. Smyth // *J Clin Invest.* — 2015. — Vol.125. — P.3338–3346;

218. Terabe, M. Tissue-Specific Roles of NKT Cells in Tumor Immunity / M. Terabe, J.A. Berzofsky // *Front Immunol.* — 2018. — Vol.9. — P. 1838. — Порядок доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6104122/>

219. Terabe, M. NKT cell mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway / M. Terabe, S. Matsui, N. Noben-Trauth // *Nature Immunology.* — 2000. — Vol.1, №6. — P. 515–520

220. Terabe, M. Transforming growth factor- $\beta$  production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence / M. Terabe, S. Matsui, J.-M. Park, M. Mamura, N. Noben-Trauth, D.D. Donaldson // *J Exp Med.* — 2003. — Vol.198, №11. — P. 1741–52

221. Tietze, JK. Low baseline levels of NK cells may predict a positive response to ipilimumab in melanomatherapy / J.K. Tietze, D. Angelova, M.V. Heppt, T. Ruzicka, C. Berking // *Exp Dermatol.* — 2017. — Vol.26, №7. — P.622-629

222. Tomiyama, H. Differentiation of human CD8<sup>+</sup> T cells from a memory to memory/effector phenotype / H. Tomiyama, T. Matsuda, M. Takiguchi, // *J. Immunol.* — 2002. — Vol.168. — P.5538–5550

223. Trapani, J.A. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. / J.A. Trapani, M.J. Smyth, // *Nat Rev Immunol.* — 2002. — Vol.2. — P. 735–747

224. Van Pel, A. Protection against a nonimmunogenic mouse leukemia by an immunogenic variant obtained by mutagenesis. / A. Van Pel, T. Boon, // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 1982. — Vol.79. — P. 4718–4722

225. Vander Heiden M.G. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation / M.G. Vander Heiden, L.C. Cantley, C.B. Thompson // *Science*. — 2009. — Vol.324. — P.1029–1033

226. Verma, C. Natural killer (NK) cell profiles in blood and tumour in women with large and locally advanced breast cancer (LLABC) and their contribution to a pathological complete response (PCR) in the tumour following neoadjuvant chemotherapy (NAC): differential restoration of blood profiles by NAC and surgery / C. Verma, V. Kaewkangsadan, J.M. Eremin, G.P. Cowley, M. Ilyas, M.A. El-Sheemy, O. Eremin // *J Transl Med*. — 2015. — Vol.13. — P. 180.

227. Verma, N.K. Adaptor regulation of LFA-1 signaling in T lymphocyte migration: Potential druggable targets for immunotherapies? // N.K. Verma, D. Kelleher // *Eur J Immunol*. — 2014. — Vol.44, №12. — P. 3484-99.

228. Villegas, F.R. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer / F.R. Villegas, S. Coca, V.G. Villarrubia, R. Jimenez, M.J. Chighllon, J. Jareno, M. Zuil, L. Callol // *Lung Cancer*. — 2002. — Vol. 35. — P. 23-28

229. Vivier, E. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells / E. Vivier, D. H. Raulet, A. Moretta // *Science*. — 2011. — Vol.331, №6013. — P. 44–49

230. Vivier, E. Functions of natural killer cells / E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, S. Ugolini // *Nat Immunol*. — 2008. — Vol.9. — P.503-510

231. Vokurková, D. CD8+ natural killer cells have a potential of a sensitive and reliable biosimetricmarker in vitro / D. Vokurková, J. Sinkora, J. Vávrová, M. Rezacová, J. Knízek, J. Ostreicher // *Physiol. Res*. — 2006. — Vol.55. — P.689–698.

232. Waggoner, S.N. Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells / S.N. Waggoner, M. Cornberg, L.K. Selin, R.M. Welsh // *Nature*. — 2012. — Vol.481. — P. 394–8

233. Wald, O. IFN-g acts on T cells to induce NK cell mobilization and accumulation in target organs. / Wald O, Weiss I, Wald H // *J Immunol*. — 2006. — Vol.176. — P. 4716—29.

234. Wang, C. CD8(+)NKT-like cells regulate the immune response by killing antigen-bearing DCs / Wang C, Liu X, Li Z, Chai Y, Jiang Y, Wang Q, Ji Y, Zhu Z, Wan Y, Yuan Z, Chang Z, Zhang M. // *Sci Rep.* — 2015. — Vol.5. — P. 14124. — Порядок доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26369936>
235. Wang, J. Screening for cytotoxic defects with flow cytometric detection of CD107 $\alpha$  on natural killer cells and cytotoxic lymphocyte cells / J. Wang, Z. Liu, L.P. Jiang, Y.F. An, X.D. Zhao // *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* — 2012. — Vol.50, №5. — P. 386-91
236. Wang, M. Current advances in T-cell-based cancer immunotherapy / M. Wang, B. Yin, H.Y. Wang, Rong-Fu Wang // *Immunotherapy.* — 2014. — Vol.6, №12. — P. 1265–1278.
237. Wang, W.J. Variation of blood T lymphocyte subgroups in patients with non- small cell lung cancer / W.J. Wang, Z. Tao, W. Gu, L.H. Sun // *Asian Pac J Cancer Prev.* — 2013. — Vol.14, №8. — P. 4671-3.
238. Wen, X. A Subset of CD8 $\alpha\beta$ + Invariant NKT Cells in a Humanized Mouse Model / X. Wen, S. Kim, R. Xiong, M. Li, A. Lawrenczyk, X. Huang, S.Y. Chen, P. Rao, G.S. Besra, P. Dellabona, G. Casorati, S.A. Porcelli, O. Akbari, M.A. Exley, W. Yuan // *J Immunol.* — 2015. — Vol.195, №4. — P. 1459-69
239. Williams, M.A. Effector and memory CTL differentiation / M.A. Williams, M.J. Bevan // *Annu Rev Immunol.* — 2007. — Vol.25. — P. 171–192.
240. Williams, MA. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. / M.A. Williams, A.J. Tyznik, M.J. Bevan // *Nature.* — 2006. — Vol.441. — P. 890–893
241. Wolchok, J.D. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. J.D. Wolchok, H. Kluger, M.K. Callahan // *N Engl J Med.* — 2013. — Vol.369. — P.122–133
242. Wood, A. Alpha interferon gene deletions in post-transplant lymphoma / A. Wood, B. Angus, P. Kestevan, J. Dark, G. Notarianni, S. Miller, M. Howard, S. Proctor, P. Middleton // *Br J Haematol.* — 1997. — Vol. 98. — P.1002–3



243. Xu, L. Advanced Lung Cancer Is Associated with Decreased Expression of Perforin, CD95, CD38 by Circulating CD3+CD8+ T Lymphocytes. / L Xu, D Chen, C Lu, X Liu, G Wu, Y Zhang // *Ann Clin Lab Sci.* — 2015. — Vol.45, №5. — P. 528-32.
244. Yang, Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer / Y.Yang // *J. Clin Invest.* — 2015. — Vol.125, №9. — P.3335-7
245. Yoon, H. The cell cycle time of CD8+ T cells responding in vivo is controlled by the type of antigenic stimulus / H. Yoon, T.S. Kim, T.J. Braciale // *PLoS ONE.* — 2010. — Vol.5, №11 — Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0015423>
246. Yu, D.P. CD3+ CD4+ and CD3+ CD8+ lymphocyte subgroups and their surface receptors NKG2D and NKG2A in patients with non-small cell lung cancer / D.P. Yu, Y. Han, Q.Y. Zhao, Z.D. Liu // *Asian Pac J Cancer Prev.* — 2014. — Vol.15, №6. — P. 2685-8.
247. Zamai, L. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells / L. Zamai, M. Ahmad, I.M. Bennett, L. Azzoni, E.S. Alnemri, B. Perussia // *J Exp Med.* — 1998. — Vol.188. — P.2375-80
248. Zamai, L.. Cytotoxic functions and susceptibility to apoptosis of human CD56bright NK cells differentiated in vitro from CD34+ hematopoietic progenitors / L. Zamai, G. Del Zotto, F. Buccella // *Cytometry Part A.* — 2012. — Vol.81. — P.294–302
249. Zamora, A.E. Models to Study NK Cell Biology and Possible Clinical Application / A.E. Zamora, S.K. Grossenbacher, E.G. Aguilar, W.J. Murphy // *Curr Protoc Immunol.* — 2015. — Vol.110. — P.1-14
250. Zdrzilova-Dubska, L. NKT-like cells are expanded in solid tumour patients / Zdrzilova-Dubska L1, Valik D, Budinska E, Frgala T, Bacikova L, Demlova R. // *Klin Onkol.* — 2012. — Vol.25, Suppl 2 — P. 2S21-5.
251. Zhang, Nu. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System / N. Zhang, M.J. Bevan // *Immunity.* — 2011. — Vol.35, №2. — P. 161–168

252. Zhang, L. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer / L. Zhang, J.R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, P.A. Gimotty, , M. Massobrio, G. Regnani, A. Makrigiannakis, H. Gray, K. Schlienger, , M.N. Liebman, // N. Engl. J. Med. — 2003. — Vol.348. — P.203–213

253. Zinkernagel, R.M. The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1996. Cellular immune recognition and the biological role of major transplantation antigens. / R.M. Zinkernagel // Scand J Immunol. — 1997. — Vol.46. — P. 421–436

254. Zsiros, E. Immunotherapy for ovarian cancer: recent advances and perspectives // E.Zsiros, J. Tanyi, K. Balint, L.E. Kandalaft // Curr Opin Oncol. — 2014. — Vol.26, №5. — P.492-500