

На правах рукописи

АБАКУШИНА

Елена Вячеславовна

**ЛИГАНДЫ РЕЦЕПТОРА NKG2D В КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКЕ ИММУНИТЕТА У
ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ И РАЗРАБОТКА МЕТОДА АДОПТИВНОЙ
ИММУНОТЕРАПИИ**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

14.01.12 – онкология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

доктора медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Медицинском радиологическом научном центре им. А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор

Козлов Иван Генрихович

доктор медицинских наук

Кудрявцев Дмитрий Владимирович

Официальные оппоненты:

Гариб Фируз Юсупович – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, кафедра иммунологии, профессор кафедры

Селедцов Виктор Иванович – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Центр медицинских биотехнологий, главный научный сотрудник

Титов Константин Сергеевич – доктор медицинских наук, доцент, ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова» ДЗМ, онкохирургическое отделение опухолей кожи и мягких тканей, заведующий отделением

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2019 года в ___ часов на заседании Диссертационного совета Д.208.040.08 на базе ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, Трубецкая улица, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2019 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Калюжин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Проблема ранней диагностики и лечения опухолей все еще остается в значительной степени нерешенной, несмотря на огромные многолетние усилия ученых и врачей. Современные способы терапии, которые предусматривают использование хирургических, лекарственных и лучевых методов терапии, часто бывают недостаточно эффективны. Кроме того, эти воздействия сами по себе вызывают иммуносупрессию. В итоге, иммунная система, возможно, уже ослабленная в результате развития опухоли, подвергается еще одному, дополнительному воздействию, подавляющему её активность [Terunuma H. et al. 2013, Preethy S. et al. 2017]. Вместе с тем, успешное излечение от опухоли может зависеть от баланса между эффективностью противоопухолевой терапии и потенциалом иммунной системы, достаточным (или недостаточным) для того, чтобы справиться с оставшимся после лечения количеством опухолевых клеток [Karakhanova S. et al. 2014].

Анализ данных литературы по современному состоянию проблемы свидетельствует об отсутствии стандартных подходов к иммунодиагностике, иммуномониторингу и иммунокоррекции у онкологических больных. В настоящее время нет комплексных подходов, позволяющих диагностировать уровень нарушений в иммунной системе и охарактеризовать их выраженность, а также выявить причину несостоятельности противоопухолевой защиты организма. Также нет точных данных, какие показатели иммунитета характеризуют иммуносупрессию при онкологии и какие подходы к иммунотерапии являются наиболее эффективными. Поэтому возникает необходимость разработки и внедрения данных методов в практическое здравоохранение, что представляется своевременным и актуальным.

Ведущую роль в преодолении толерантности клеток опухоли играет активация лимфоцитов, в том числе и NK-клеток, которые приобретают способность уничтожать более широкий спектр мишеней. Это может происходить за счет цитокинов или взаимодействия клеток с поверхностными рецепторами трансформированной клетки. На поверхности опухолевой клетки при трансформации экспрессируются стресс-индуцированные молекулы MICA, MICB (MHC class I-related molecules) и ULBP (UL16 binding proteins), которые относятся к семейству неканонических молекул гистосовместимости (MHC) класса I, впервые обнаруженных в конце 90-х годов [Groh V. et al. 1999]. Взаимодействие этих молекул с активирующим рецептором NKG2D на NK-клетках и цитотоксических T-лимфоцитах является одним из сигнальных каскадов, который приводит к активации лимфоцитов и уничтожению опухолевой клетки и играет важную роль в регуляции противоопухолевых иммунных реакций [Knorr D. et al. 2014, Iyer R.K. et al. 2018]. Избегая распознавания, трансформированные клетки сбрасывают внеклеточные домены молекул MICA/B и ULBP со своей поверхности, что может приводить к иммуносупрессии. Лиганды

NKG2D можно обнаружить в сыворотке крови онкологических больных. Экспериментально показано, что растворимые формы MICA могут негативно сказываться на NKG2D-зависимой клеточной цитотоксичности [Ullrich E. et al. 2013]. Однако на сегодняшний день, нет диагностических критериев оценки уровня данных молекул у онкологических больных и их клинической и прогностической значимости. Также не разработаны стандартные методы оценки нарушений в различных звеньях иммунитета у больных, что, несомненно, является актуальным.

В последние годы было предложено несколько дополнительных способов биотерапии онкологических больных, большинство из которых направлено на специфическое или неспецифическое усиление противоопухолевой активности иммунной системы [Титов К.С. и др. 2011; Нехаева Т.Л. 2013; Murray S., Lundqvist A. 2016, Halim L. et al. 2018]. Определенные надежды возлагаются на иммунотерапию. Данное направление включает в себя несколько подходов: введение цитокинов, активную иммунизацию за счет вакцин, введение дендритных клеток, нагруженных опухоли-ассоциированными антигенами, опухоли-инфильтрирующих лимфоцитов, использование различного типа моноклональных антител, CAR T-, NK-лимфоцитов и др. Вместе с тем нет единого мнения о том, какой вид иммунотерапии следует применять при том или ином злокачественном новообразовании. Особый интерес вызывает противоопухолевая адоптивная (от англ. adopt – принимать, усыновлять) иммунотерапия (АИТ) на основе активированных лимфоцитов и NK-клеток, противоопухолевый потенциал которых усиливают с помощью культивирования *in vitro* в присутствии цитокинов [Ullrich E. et al. 2013; Zhang G. et al. 2014; Navarro G.A. et al. 2015, Fang F. et al. 2017]. Именно активированные лимфоциты являются одним из важных компонентов противоопухолевой защиты и могут использоваться для АИТ. Однако место АИТ в лечении злокачественных новообразований по-прежнему окончательно не определено. Нет стандартных протоколов активации лимфоцитов, не сформировано единого мнения о количестве клеток, сроках и длительности проведения АИТ и критериях оценки эффективности иммунотерапевтических воздействий.

Таким образом, поиск значимых молекулярных мишеней для иммунодиагностики, комплексной оценки течения и прогноза онкологического заболевания является актуальной научно-практической проблемой. Разработка новых терапевтических подходов иммунологического сопровождения онкологических больных, активное внедрение адьювантной АИТ в клиническую практику позволят повысить эффективность существующих в настоящее время методов лечения онкологических больных.

Цель работы

Изучить состояние иммунитета онкологических больных с оценкой сывороточного уровня лигандов рецептора NKG2D и разработать новый способ адоптивной иммунотерапии с использованием активированных цитотоксических лимфоцитов.

Задачи исследования

1. У онкологических больных различных нозологических групп определить сывороточный уровень лигандов рецептора NKG2D – стресс-индуцированных молекул MICA.
2. Охарактеризовать дисбаланс субпопуляционного состава лимфоцитов у онкологических больных колоректальным раком и меланомой кожи.
3. В модельной системе установить влияние молекул MICA на экспрессию рецепторов NKG2D и цитотоксическую активность NK-клеток человека.
4. Разработать технологию активации цитотоксических лимфоцитов периферической крови для адоптивной иммунотерапии.
5. Апробировать способ лечения онкологических больных с использованием активированных *in vitro* цитотоксических лимфоцитов (персонифицированная адоптивная иммунотерапия).
6. Провести мониторинг показателей клеточного и гуморального звеньев иммунитета на фоне адоптивной иммунотерапии.
7. Изучить динамику изменения сывороточного уровня молекул MICA после адоптивной иммунотерапии.

Научная новизна

В результате работы расширен спектр показателей оценки дисбаланса иммунитета и функционального состояния иммунной системы у больных с различными злокачественными новообразованиями.

Достоверно показано наличие высоких концентраций лигандов рецептора NKG2D – молекул MICA у онкологических больных. Получены новые знания о роли молекул MICA при развитии онкологических заболеваний, которые могут являться прогностическими маркерами при развитии ряда солидных опухолей. Показано, что у большинства больных с высоким уровнем sMICA повышено содержание Treg и экспрессия маркера апоптоза CD95 на лимфоцитах, что является неблагоприятным фактором прогноза, а проведение АИТ у них не приводит к улучшению результатов лечения.

Впервые в сравнительном аспекте охарактеризованы субпопуляционный состав и активационные фенотипы лимфоцитов крови больных различными по иммуногенности новообразова-

ниями: колоректальным раком (КРР) и меланомой. Разработаны критерии комплексной оценки нарушений иммунного статуса, дана характеристика проявлений недостаточности клеточного и гуморального звеньев иммунитета у онкологических больных. Показано, что у больных КРР и меланомой повышено относительное и абсолютное содержание Treg и экспрессия альфа цепи рецептора IL-2 (CD25) на лимфоцитах. Для группы больных КРР характерно повышенное содержание NK-клеток и активированных NK-клеток, больным меланомой свойственно увеличение доли активированных субпопуляций Т-лимфоцитов. Общепринятая панель CD маркеров лимфоцитов дополнена рецепторами активации и малыми субпопуляциями лимфоцитов. Выявлено увеличение поверхностной экспрессии как ранних, так и поздних активационных молекул, а также маркера апоптоза лимфоцитов, что свидетельствует о хроническом угнетении иммунитета у онкологических больных различных по иммуногенности нозологических групп.

Используя рекомбинантный белок MICA, полученный в результате работы, экспериментально доказано, что sMICA может взаимодействовать с рецептором NKG2D и блокировать контактный цитоллиз, опосредованный NK-клетками, что выражается в снижении цитотоксической активности NK-клеток.

В результате исследования разработан оригинальный метод длительного культивирования и активации цитотоксических лимфоцитов *in vitro*. Данный способ активации лимфоцитов защищен патентом РФ на изобретение. Он даёт возможность проводить АИТ в течение нескольких месяцев без дополнительного забора крови. Метод отличается упрощенной процедурой активации лимфоцитов, без разделения моноклеарных клеток (МНК) на фракции и без использования фидерных клеток. Благодаря низкой концентрации и совместному применению двух цитокинов (IL-2 и IL-15) в питательной среде, а также отсутствию опухолевых антигенов, использование аутологических активированных лимфоцитов и бесклеточного продукта для АИТ онкологических больных является безопасным.

Разработан алгоритм персонифицированной АИТ онкологических больных с использованием активированных *in vitro* цитотоксических лимфоцитов. Данный способ лечения защищен патентом РФ на изобретение. На основе данного алгоритма методика персонифицированной АИТ была апробирована у больных раком желудка, пищевода, поджелудочной железы, молочной железы, почки, легкого, КРР и меланомой. Проведение АИТ позволило у части больных устранить нарушения в иммунной системе за счет увеличения содержания иммунореактивных клеток и снижения иммуносупрессивного влияния Treg и sMICA на лимфоциты и привести к контролю над опухолевым процессом. Предложенный способ лечения может дополнить стандартные схемы лечения онкологических больных с различными солидными новообразованиями.

Впервые проведен мониторинг уровня молекул МІСА в сыворотке крови онкологических больных и субпопуляционного состава лимфоцитов на фоне АИТ активированными цитотоксическими лимфоцитами. Комплексное и регулярное монитори́рование изменений показателей иммунитета и уровня sMICA позволили выявить несостоятельность противоопухолевого иммунного ответа и явились дополнительными критериями в оценке эффективности АИТ.

Теоретическая и практическая значимость

В результате диссертационной работы значительно расширен набор параметров диагностики и мониторинга состояния иммунной системы за счет комплексной оценки дисбаланса показателей иммунитета с учётом изменений в субпопуляционном составе лимфоцитов и уровне экспрессии маркёров ранней и поздней активации лимфоцитов периферической крови, а также определения количества молекул МІСА в сыворотке крови больных. Полученные данные могут быть использованы для улучшения результатов иммунодиагностики у онкологических больных, как дополнительные факторы прогноза, а также для проведения мониторинга изменения иммунологических показателей на фоне лечения.

В результате работы получен рекомбинантный человеческий белок МІСА (rhMICA), который можно использовать при выполнении НИР для изучения взаимодействия лиганда с НК-клетками в системах *in vitro* и *ex vivo* и его влияния на их активность, а также для получения анти-МІСА антител и разработки диагностической тест-системы для оценки сывороточного уровня молекул МІСА у онкологических больных.

Итогом данного исследования явилась разработка оригинального метода длительного культивирования и активации лимфоцитов *in vitro* за счет низких доз интерлейкинов. Полученные в работе данные позволяют рекомендовать предложенный метод активации лимфоцитов для длительного культивирования МНК и их дальнейшего применения в схемах сопроводительной АИТ у онкологических больных.

Определены критерии отбора пациентов для АИТ, а также выявлены параметры, которые могут свидетельствовать о благоприятном или неблагоприятном исходе основного заболевания.

Разработан и апробирован в клинической практике способ лечения онкологических больных, основанный на введении активированных цитотоксических лимфоцитов и клеточного супернатанта. За счет использования данного способа персонифицированной АИТ в схемах лечения онкологических больных был усовершенствован и оптимизирован метод усиления противоопухолевого иммунитета, который у части больных привел к стабилизации процесса и регрессу злокачественных образований.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Дисбаланс показателей иммунитета у онкологических больных происходит за счет изменения количества Treg, НКТ-, НК-клеток и CD25⁺лимфоцитов, а также уровня экспрессии маркеров активации лимфоцитов в сочетании с повышением в сыворотке крови концентрации молекул MICA, что может рассматриваться как длительная иммуносупрессия и являться неблагоприятным фактором прогноза у онкологических больных.
2. Совместное использование двух цитокинов IL-2 и IL-15 в низких концентрациях при длительном культивировании лимфоцитов является эффективным и позволяет увеличить жизнеспособность, пролиферативную и противоопухолевую активность лимфоцитов.
3. Адоптивная иммунотерапия активированными *in vitro* лимфоцитами является высокотехнологичным, оригинальным и безопасным методом клеточной иммунотерапии, который при длительном применении у определенной части онкологических больных позволяет добиться контроля над ростом опухоли.
4. Оценка исходного дисбаланса показателей иммунитета у больного (содержание Treg и сывороточных молекул MICA, экспрессия CD25, HLA-DR, CD38, CD69, NKG2D и CD95 на лимфоцитах) и регулярное его мониторинговое позволяет выявить несостоятельность противоопухолевого иммунного ответа и является дополнительным критерием в оценке эффективности адоптивной иммунотерапии.

Степень достоверности и апробация результатов диссертационной работы

Научные положения, описанные данные, выводы и рекомендации, сформулированные в работе, базируются на достаточном клиническом материале. Дизайн исследования включал лабораторные методы анализа, разработку метода клеточной терапии, клиническую оценку пациентов, экспериментальные и современные методы исследования. Полученные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием параметрических и непараметрических методов с помощью программ Microsoft Excel 2003, Statsoft Statistica 6.0 (StatSoft, USA) и пакета статистических программ SPSS® Statistics Subscription (IBM, USA).

Диссертационная работа являлась составной частью НИР Центра на 2007-2009 гг. «Изучение противоопухолевого иммунного ответа, процессов активации и ингибирования НК(Т)-клеток при взаимодействии с поверхностной и растворимой формой опухоли-ассоциированной молекулы MICA, как нового маркера злокачественного роста» в рамках госзадания (№ гос. регистрации 01200501319) подтемой №7 «Изучение опухолиассоциированных молекул MICA/B в качестве маркеров для диагностики и биотерапии онкологических заболеваний» на 2011-2013гг. и НИР «Разработка методов иммунотерапии, позволяющих повысить эффективность лечения онкологических больных» на 2012-2016гг. в рамках государственного задания «Изучение меха-

низмов физической, химической и биологической модификации радиационных эффектов» (№ гос. регистрации 01201262734). По заявленной теме выполнена совместная работа по гранту РФФИ № 08-04-01772-а «Распознавание опухолевых клеток и регуляция цитолитической активности натуральных киллеров. Роль стресс-индуцируемой молекулы МІСА» 2008-10 гг. и государственному контракту № 16.740.11.0200 «Механизмы и регуляция экспрессии белка МІСА, лиганда активирующего рецептора цитотоксических лимфоцитов человека, в норме и при опухолеобразовании» в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России». Выполняется работа по гранту РФФИ № 16-04-01867 «Роль аллельных групп белка МІСА, лиганда рецептора NKG2D, в регуляции противоопухолевой активности клеточного иммунитета» на 2016-18 гг.

Материалы диссертации доложены на международных и всероссийских научных конференциях, научных школах, сессиях и конгрессах: FEBS advanced course: “Chemistry meets biology” (Greece, Island of Spetses, 2005); IV международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2012 г.); заседании научно-технического совета департамента инновационной политики и науки Минздрава России (Москва, 2012); научной сессии НИЯУ МИФИ-2013 (Москва, 2013 г.); междисциплинарной конференции «Патология клетки» (Москва, 2013 г.); всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике» (Москва, 2014 г.); школе-семинаре с международным участием «Клеточные и генные технологии: от эксперимента к практике» (Светлогорск, Калининградская область, 2014 г.); конгрессе Российской ассоциации радиологов (Москва, 2014 г.); VI всероссийской школе по клинической иммунологии «Иммунология для врачей» (Пушкинские Горы, Псковская область, 2015 г.); XIX Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2015 г.); XII, XIII, XIV всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2015 г., 2016 г., 2017 г.); I-ом Калининградском научном иммунологическом форуме – 2016, (Калининград, 2016 г.); The I and II International Symposium “Physics, Engineering and Technologies for Bio-Medicine” (Moscow, 2016, 2017); III Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2017» (Санкт-Петербург, 2017 г.); III национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017 г.).

Результаты работы апробированы на совместной конференции МРНЦ им. А.Ф. Цыба и МНИОИ им. П.А. Герцена – филиалы ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России 5 июня 2018 года.

Личный вклад автора

Автору принадлежит основная и ведущая роль в выборе направления исследования и темы исследования, определении задач и поиске методов их решения, а также анализе теоретических данных, проведении экспериментов, интерпретации, статистической обработке и обобщении полученных результатов. Осуществлено планирование и проведение экспериментов, разработка метода активации лимфоцитов и внедрение новых способов лечения онкологических больных с использованием АИТ активированными лимфоцитами. Автором обозначены дальнейшие перспективы внедрения результатов работы.

Внедрение результатов диссертации в практику

Результаты работы внедрены и используются в практической деятельности Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, в лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России и в учебно-методической работе со студентами и магистрами отделения биотехнологии на кафедре ядерной медицины в Обнинском институте атомной энергетики НИЯУ МИФИ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научных специальностей: 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, конкретно пунктам 1, 2, 6, 8, 11, 14 и 16 области исследования, паспорта специальности. Также результаты диссертационной работы соответствуют специальности 14.01.12 – онкология, конкретно пунктам 2, 4, 5 и 6 области исследования, паспорта специальности. Большую часть в работе занимают иммунологические аспекты, которые оцениваются на достаточном клиническом материале онкологических больных.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 103 работы, среди которых 27 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, в том числе 17 оригинальных работ, 8 обзоров, 2 статьи в иностранных журналах. Получены 2 патента Российской Федерации на изобретение, издана новая медицинская технология.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 297 страницах машинописного текста, содержит 33 таблицы и 61 рисунок. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания клинического материала и методов исследования, четырех глав с результатами собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 91 отечественную и 307 зарубежных работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика клинического материала

В основе работы лежит анализ клинико-диагностических данных и результатов лечения 339 пациентов. В частности, в исследование включены 279 больных с онкологическими заболеваниями, контрольную группу составили 60 условно здоровых добровольцев (доноров) старше 18 лет. Все пациенты проходили обследование или находились на лечении в Медицинском радиологическом научном центре им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России с 2006 по 2017 гг. (далее Центр). Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека».

Так как работа состояла из нескольких этапов, то больные были разделены на группы в соответствии с дизайном исследования (рис. 1).

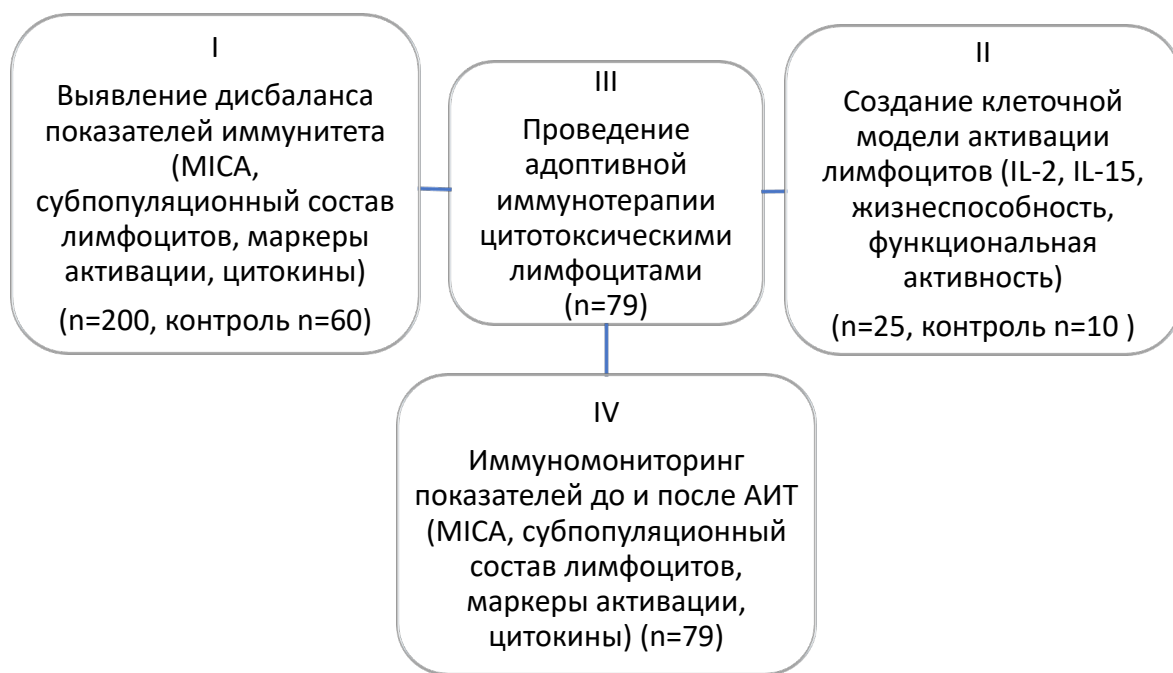


Рисунок 1 - Дизайн исследования

I – На первом этапе проводили выявление дисбаланса показателей иммунитета у 200 онкологических больных до проведения специфического лечения основного заболевания. Для сравнения показателей использовали кровь 60 здоровых доноров. Среди злокачественных новообразований диагностированы: рак молочной железы (n=11), щитовидной железы (n=19), предстательной железы (n=16), гортаноглотки (n=11), тела или шейки матки (n=12), мочевого пузыря (n=10), почки (n=5), толстой кишки (n=53) или желудка (n=19).

II – Для разработки метода активации лимфоцитов использовали периферическую кровь 25 онкологических больных, которым в последующем была проведена адоптивная иммунотерапия (АИТ) и 10 здоровых доноров (n=35).

III – Для проведения АИТ активированными лимфоцитами в исследование включены 79 онкологических больных на различных этапах противоопухолевой терапии (n=79).

IV – С целью проведения мониторинга иммунологических показателей осуществлялся забор крови у этих же 79 онкологических больных с различными злокачественными новообразованиями на этапах до и после АИТ (n=79).

Первоначально оценивали уровень сывороточных молекул МІСА у 200 первичных больных с солидными опухолями. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и уровень цитокинов среди них были оценены у 83 пациентов из двух различных по иммуногенности нозологических групп. В первую группу включены 45 больных меланомой кожи IIa-IV стадии в возрасте от 26 до 75 лет (медиана 56 лет), 30 женщин и 15 мужчин. Во вторую группу были включены 38 первичных больных с диагнозом – колоректальный рак (КРР) в возрасте от 42 до 88 лет (медиана 63 года), 18 женщин и 20 мужчин (таблица 1).

Таблица 1

Распределение больных по стадии заболевания для выявления дисбаланса показателей иммунитета

№	Стадия	Меланома		Колоректальный рак		Всего	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
1	I	–	–	6	15,8	6	7,2
2	II	8	17,8	14	36,8	22	26,5
3	III	31	68,9	10	26,3	41	49,4
4	IV	6	13,4	8	21,1	14	16,9
	Итого	45	100	38	100	83	100

У всех 83 больных были оценены иммунологические показатели клеточного звена иммунитета (субпопуляционный состав лимфоцитов, фенотип В-, Т-лимфоцитов, Treg, NKT-и NK-клеток периферической крови и маркеры активации (HLA-DR, CD38, CD69, CD314 (NKG2D), CD25, CD95). В дополнение к этому для характеристики гуморального звена иммунитета у этих же больных в работе оценен уровень цитокинов (TNF- α , IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-10).

В клиническое исследование по применению АИТ активированными ЦЛ были включены 79 больных с подтвержденным онкологическим заболеванием, которые дали согласие на участие в исследовании и подписали информированное согласие. Протокол утвержден этическим комитетом Центра.

Метод АИТ был первоначально апробирован у 15 больных с различными солидными опухолями в возрасте от 25 до 79 лет (медиана 57 лет). Женщин было 6, мужчин – 8 человек (таблица 2).

Таблица 2

Характеристика больных, у которых проводили апробацию адоптивной иммунотерапии

№	Больные, возраст	Заболевание	Пол	Стадия	Проведенное лечение	Время наблюдения, мес.
1	В., 60	РЛ	ж	IV	ПХТ	20
2	Т., 50	РМЖ	ж	IV	ЛТ, ХТ, ФДТ	12
3	Е., 79	РМЖ	ж	IIIb	Не было	22
4	Ш., 59	ПКР	м	IV	О	28
5	Л., 55	ПКР	м	IV	О	28
6	С., 66	ПКР	м	IV	О	24
7	Б., 57	ПКР	ж	IV	О, ХТ	12
8	А., 53	РПЖ	м	IIb	О, ПХТ	2
9	Ш., 47	РПЖ	м	IV	О, ПХТ	15
10	А., 45	РПЖ	ж	IV	ПХТ	18
11	Ч., 79	РПЖ	ж	IV	ЛТ	2
12	В., 25	РЖ	м	IIb	О, ПХТ, ФДТ	4
13	И., 63	РЖ	м	IIb	ПХТ	2
14	Ч., 46	РП	м	IVb	О, ЛТ, ПХТ	12
15	Л., 59	РП	м	IIIb	ЛТ	7

Примечание: РЛ - рак легкого, РМЖ - рак молочной железы, ПКР - почечно-клеточный рак, РПЖ - рак поджелудочной железы, РЖ - рак желудка, РП - рак пищевода. О – операция, ЛТ – лучевая терапия, ПХТ – полихимиотерапия, ФДТ – фотодинамическая терапия.

На следующем этапе работы были оценены результаты проведения АИТ. В данную часть исследования по АИТ были включены 64 больных: 13 больных колоректальным раком (КРР) (рак прямой кишки у 9 больных, сигмовидной у 3, анального канала у 1 больного) и 51 больной меланомой кожи (таблица 3).

Общее состояние больных данной части исследования, было оценено как ECOG-0 у 5 (7,8%), как ECOG-1-2 у 58 (90,6%) больных и только у 1 больного КРР было оценено как ECOG-3.

Оценка результатов лечения проводилась в соответствии с критериями irRC (Immunerelated Response Criteria), которые были опубликованы в 2013 году с целью обеспечения более точной оценки эффекта иммунотерапевтических агентов [Nishino M. et al. 2013]. Оценивали частичный ответ (ЧО), стабилизацию болезни (СБ), прогрессию болезни (ПБ), объективный эффект (ОЭ) – совокупный показатель частичной и полной регрессии опухоли, контроль над опухолью (ОЭ и СБ) и время до прогрессирования болезни (ВДП) от начала АИТ.

Характеристика больных, принимающих участие в исследовании с включением АИТ активированными цитотоксическими лимфоцитами

Характеристика	Нозология		Всего
	КРР	Меланома	
Количество больных, (%)	13 (37,8)	51 (62,2)	64 (100)
Женщины / Мужчины	1,6 / 1	1,4 / 1	38 / 26
Медиана возраста, интервал, лет	54 (40–78)	53 (26–82)	53 (26–82)
Стадия заболевания, абс. / %			
I	1 / 7,7	0	1 / 1,6
II	2 / 15,4	9 / 17,6	11 / 17,2
III	6 / 46,2	36 / 70,6	42 / 65,6
IV	4 / 30,8	6 / 11,8	10 / 15,6
Наличие метастазов или первичного очага, абс. / %	9 / 69,2	35 / 68,6	44 / 68,8
Предшествующее лечение: абс. / %			
Хирургическое	0	3 / 5,9	3 / 4,7
ХТ	0	2 / 3,9	2 / 3,1
Комплексное	1 / 7,7	35 / 68,6	36 / 56,3
Комбинированное	11 / 77,0	11 / 21,6	22 / 34,4
Не проводилось	1 / 7,7	0	1 / 1,6
Среднее время наблюдения, мес. (интервал)	19,4±13,2 (3-37)	21,9±13,3 (1-51)	20,6±13,2 (1-51)
Медиана времени наблюдения, мес.	25	24	24

Методы исследования

Объектом исследования служила периферическая венозная кровь. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли на градиенте плотности Nystopague-1077 по общепринятой методике.

Проточная цитофлуориметрия. Субпопуляционный состав лимфоцитов и маркеры активации оценивали при помощи иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови. Использовали антитела против CD3, CD4, CD8, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD45, CD56, CD80, CD86; маркеров активации лимфоцитов: HLA-DR, CD25, CD38, CD69, CD95, CD314 (NKG2D) и антигенов дифференцировки CD45⁺RO и CD45⁺RA, конъюгированные с флуоресцентными красителями PE, FITC, Alexa Fluor488 или PE-Cy5.5. Анализ флуоресценции и подсчет клеток осуществляли на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США) или Cytomics FC 500 MPL (Beckman Coulter, США).

Методы культивирования клеток. Все манипуляции с культурой клеток (K562), СНО и МНК проводили с соблюдением требований стерильности и безопасности. Для активации выделенные МНК культивировали на протяжении 7-14 дней в полной питательной среде (ППС) RPMI-1640 или X-vivo 20 (Lonza, США), содержащей человеческий рекомбинантный альбумин, с добавлением IL-2 (Биотек, Россия) в концентрациях 31, 62, 125, 250 или 500 МЕ/мл и IL-15 (ImmunoTools, Германия) в

концентрации 50 нг/мл или без него. Пролиферативную активность, жизнеспособность и оценку кинетики роста клеточной популяции культивируемых клеток оценивали с использованием флуоресцентных красителей (PE, CAM) и автоматической сканирующей системы микроскопирования в режиме реального времени IncuCyte Zoom (EssenBioScience, США). Полученные данные обрабатывали с помощью программы IncuCyte Software.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Содержание белка sMICA в сыворотке крови больных перед и на этапах АИТ определяли с помощью ИФА и набора антител Human ELISA Kit (R&D Systems или Abcam, США) по инструкции. Оценка концентраций IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α , IFN- γ и TNF- α в сыворотке крови или в клеточном продукте производили с использованием набора реагентов (Вектор Бест, РФ) по инструкции. Оптическую плотность образцов измеряли при длине волны 450 нм на фотометре ChroMate4300 (Awareness Technology, США).

Определение цитотоксической активности лимфоцитов. Цитотоксическую активность лимфоцитов проводили с помощью набора реагентов «Live/Dead» (Molecular Probes, США) и окраски клеток флуоресцентными красителями этидием гомодимером-1 и кальцеином-AM. После инкубации клеток-мишеней линии K562, которые смешивали с эффекторами в различных соотношениях, оценивали процент мертвых клеток с использованием автоматического анализатора IncuCyte Zoom (EssenBioScience, США) или цитофлуориметра.

Получение, очистка и определение физико-химических свойств рекомбинантного белка MICA. Получение рекомбинантного белка MICA проводили в рамках сотрудничества с ЗАО «Протеинсинтез». Для этого осуществляли культивирование клеток-продуцентов линии CHO/hsMICA-3D в среде CD OPTICHO при 7,5% CO₂, 37⁰C и 100% влажности. Контроль концентрации клеток и их жизнеспособность проводили ежедневно, совмещая с процедурой смены среды. Очистку белка проводили в несколько циклов, единовременное нанесение на колонку составляло 3-3,5 л культуральной среды. Концентрацию rhsMICA определили с помощью спектрофотометра NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, США). Очистку белка rhsMICA из банкированной культуральной среды проводили с помощью иммуноаффинной хроматографии. Для определения чистоты, гомогенности и молекулярной массы генно-инженерных продуктов применяли метод вертикального электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Для иммуноблот анализа мембрану после переноса на нее белков инкубировали с моноклональными антителами мыши, после чего отмывали и инкубировали со вторичными антимышиными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Далее мембрану промывали и проявляли с использованием субстрата ECL plus, GE Healthcare (Великобритания). Детектировали люминесценцию мембраны с использованием системы ChemiDoc XRS, Bio-Rad (США).

Методика сопроводительной адоптивной иммунотерапии. Проведение АИТ начинали после основного лечения. Активированные *in vitro* лимфоциты вводили внутрикожно на 3, 5, 7, 9, 11 и 14 день культивирования в количестве 30-100 млн клеток. Далее лечение продолжали бесклеточным продуктом на протяжении 1-3 месяцев 1-2 раза в неделю в зависимости от общего количества клеток, пролиферативной активности и степени активации лимфоцитов. Курсы АИТ повторяли каждые 2-3 месяца в зависимости от особенностей течения заболевания, результатов общелабораторных исследований и показателей иммунитета пациента. До начала и после проведения АИТ осуществляли мониторинг субпопуляционного состава лимфоцитов, экспрессии маркеров активации, оценивали уровень цитокинов (IL-2, IL-10, IFN- α , IFN- γ и TNF- α) и молекул МІСА. Динамическую оценку клеточного состава и маркеров активации лимфоцитов повторяли после очередного курса АИТ через 1, 2-3, 4-6 и 8-12 месяцев.

Статистический анализ данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Microsoft Excel 2003, Statsoft Statistica 6.0 (StatSoft, USA) и SPSS® Statistics Subscription (IBM, USA). Для сравнения показателей использовали t-критерий Стьюдента и непараметрический метод Манна-Уитни с использованием программного обеспечения SigmaPlot 11.0 (SystatSoftwareInc., США). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

I – Результаты оценки дисбаланса показателей иммунитета у онкологических больных

На первом этапе оценивали уровень сывороточного МІСА (sMІСА) у нелеченых онкологических больных различных по иммуногенности нозологических групп, дисбаланс лимфоцитов периферической крови и уровень цитокинов.

Было показано, что в контрольной группе стресс-индуцированные молекулы МІСА обнаруживались в минимальных количествах ($37 \pm 9,5$ пг/мл). Средний уровень sMІСА у онкологических больных с различными солидными опухолями достоверно отличался от группы контроля и превышал его в 3-4 раза ($p < 0,002$) (рис. 2).

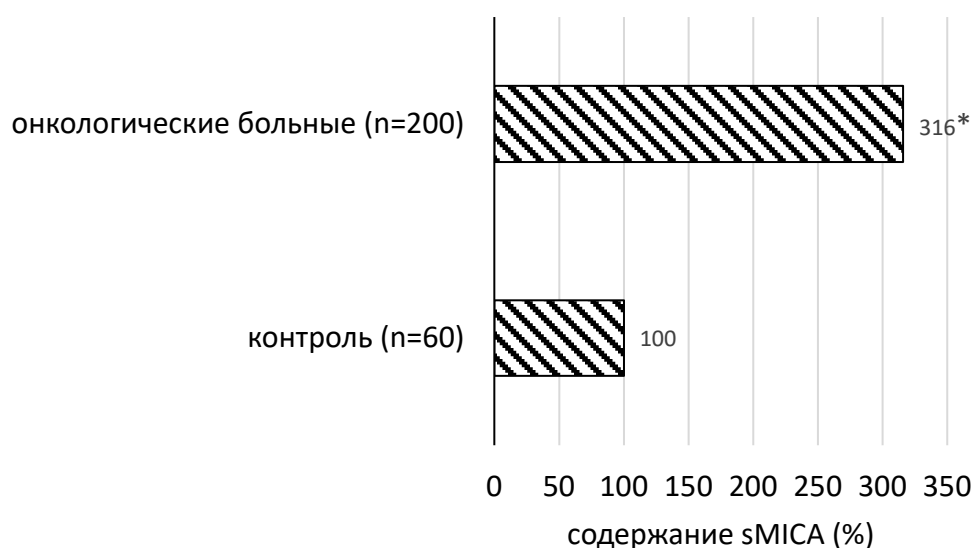


Рисунок 2 - Уровень стресс-индуцированных растворимых молекул МІСА в сыворотке крови здоровых доноров и онкологических больных;

***достоверное отличие значения по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$)**

Данные по содержанию sMІСА и распределению больных солидными опухолями отражены в таблице 4. Достоверные отличия количества sMІСА от контрольной группы были выявлены в следующих нозологических подгруппах: рак тела или шейки матки, рак предстательной железы, меланома, рак языка или гортани, рак молочной железы, КРР, рак желудка ($p < 0,005$) (таблица 4). В данных группах наблюдался значительный разброс концентраций sMІСА, максимальные значения (более 1000 пг/мл) были зарегистрированы в группе больных меланомой и КРР. Эти нозологии были выбраны для дальнейшего сравнительного анализа показателей иммунитета, а именно для выявления особенностей субпопуляционного состава и уровня цитокинов в сыворотке крови.

Таблица 4

Концентрация молекул МІСА в сыворотке крови здоровых добровольцев и онкологических больных солидными опухолями

№	Группы	Количество пациентов	Среднее ± SD (пг/мл)	Достоверность
	Здоровые добровольцы	60	36,9±9,5	
1	Рак щитовидной железы	19	30,7±18,3	p=0,078
2	Рак мочевого пузыря	10	44,6±35,6	p=0,326
3	Рак почки	6	65,2±85,6	p=0,149
4	Рак тела или шейки матки	12	91,1±56,6	p=0,002
5	Рак предстательной железы	16	125,4±99,5	p=0,003
6	Меланома	43	120,9±54,8	p<0,001
7	Рак языка или гортани	11	168,3±76,7	p=0,002
8	Рак молочной железы	11	168,5±76,7	p<0,001
9	Колоректальный рак	53	198,7±49,5	p<0,001
10	Рак желудка	19	210,7±111,1	p<0,001
	Всего онкологических больных	200	126,5±12,7	p=0,002

В работе показано, что среди 155 больных с солидными опухолями, у которых средний уровень sMICA достоверно отличается от контрольной группы, чувствительность метода составила 41,3%. Специфичность метода была достаточно высокой – 96,7%. Прогностичность положительного результата составила – 96,9%. Таким образом, вероятность наличия болезни при положительных результатах исследования при солидных опухолях велика.

При анализе показателей уровня sMICA у больных меланомой по течению основного заболевания в отдаленные сроки после первичной диагностики и оценки уровня sMICA пациенты были разделены на две группы: первая со стабилизацией процесса и вторая группа с прогрессированием заболевания.

Было обнаружено, что у больных с прогрессированием заболевания средняя концентрация sMICA при первичном обследовании была в 2,8 раз выше, чем в первой группе (p=0,02) (таблица 5).

Таблица 5

Содержание sMICA в зависимости от исхода заболевания у больных меланомой

Исход заболевания	Концентрация sMICA (пг/мл)
Стабилизация (n=19)	78,6±35,4
Прогрессия (n=16)	217,8±134,8*

* достоверно отличающиеся значения относительно показателей другой группы (p<0,05)

Это указывает на то, что обнаружение растворимых форм молекул МІСА в высоких концентрациях служит фактором плохого прогноза и указывает на неблагоприятное течение

меланомы у данных больных. Однако, при анализе аналогичных показателей у больных КРР такой зависимости выявлено не было.

Было показано, что у больных КРР клинической стадии I (n=6) и II (n=14) достоверно снижена концентрация sMICA по сравнению с III (n=10) и IV (n=8) стадией заболевания (p=0,005) (таблица 6).

Таблица 6

Уровень sMICA в зависимости от стадии заболевания у больных

Стадия	Концентрация sMICA, (пг/мл)	
	КРР	меланома
I и II	183,5±47,8	99,9±71,2
III и IV	404,8±116,1*	353,5±300,3*

* достоверно отличающиеся значения относительно показателей другой группы больных той же нозологии (p<0,05)

Подобные результаты были получены при анализе и сравнении данных у больных меланомой с различной распространенностью опухолевого процесса. Значимые отличия были выявлены у пациентов со стадией I (n=0) и II (n=8) по сравнению с III (n=31) и IV (n=6) стадией с наличием регионарных и отдаленных метастазов. Полученные результаты подтверждают взаимосвязь концентрации sMICA с опухолевой нагрузкой, т.е. стадией заболевания, и могут указывать на распространенный процесс.

Установленные тенденции подтверждают взаимосвязь между уровнем sMICA, развитием злокачественного новообразования и негативным прогнозом болезни и не исключают влияния молекул MICA на противоопухолевый иммунный ответ у онкологических больных с солидными опухолями.

При анализе фенотипа лимфоцитов у больных меланомой и КРР относительное содержание популяций В- и Т-лимфоцитов находилось в пределах референсных значений (таблица 7). Отмечено, что в среднем по каждой группе повышено абсолютное и относительное содержание Treg и активированных HLA-DR+ лимфоцитов.

У больных КРР отмечается не только увеличение содержания NK-клеток, но и активированных NKG2D⁺ NK-клеток и CD69⁺ NK-клеток (p<0,05). Экспрессия активирующего рецептора NKG2D (CD314) была выявлена на 90% NK-клеток, а рецептора CD69 на 43% NK-клеток, что превышает данные показатели у группы больных меланомой (таблица 7). С другой стороны, у больных КРР было обнаружено значимое снижение Т-лимфоцитов и активированных CD38⁺Т-клеток (p<0,05) по сравнению с группой больных меланомой, которой в свою очередь более свойственно повышение количества лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD38⁺, CD38⁺, CD3⁺CD95⁺, CD95⁺ (таблица 7).

Фенотипическая картина лимфоцитов и маркеров активации у онкологических больных

Фенотип лимфоцитов	Референсные значения	Количество клеток (%)	
	(%)	меланома	КРР
Лимфоциты	19-37	29,8±13,4	29,0±10,5
В-лимфоциты	7-17	7,1±2,8	6,5±3,5
Т-лимфоциты	61-85	74,7±9,9*	69,4±10,8*
Т хелперы	35-55	44,7±12,4	42,7±9,0
Treg	1,6-5,8	8,2±5,9	6,5±3,7
CTL	19-35	30,6±11,2	27,5±8,9
NKT-клетки	0,5-6	3,0±2,3	2,2±1,9
NK-клетки	8-19	15,1±9,2*	22,9±10,4*
HLA-DR ⁺ Т-лимфоциты	7-11	11,7±7,6	10,0±4,9
Активированные лимфоциты (HLA-DR)	8-18	19,5±8,2	18,8±6,2
Альфа цепь рецептора IL-2 (CD25)	2-9	10,9±6,9	8,6±5,1
CD314 (NKG2D)	31-54	42,3±11,9	53,2±9,8
NKG2D ⁺ NK-клетки	7-12	12,6±9,1*	20,1±9,1*
CD38	9-15	21,1±15,5*	10,3±6,6*
CD38 ⁺ Т-клетки	20-50	38,3±18,3	31,3±12,2
CD69	10-30	14,6±10,6	21,1±10,9
CD69 ⁺ NK-клетки	3-10	5,4±4,0*	8,9±5,0*
CD95 (Fas/APO-1)	23-60	52,9±21,1	46,0±16,4
CD95 ⁺ Т-клетки	12-50	43,7±17,1	36,2±11,1

*достоверно отличающиеся значения относительно показателей другой группы больных (p<0,05).

Полученные данные свидетельствуют в пользу преобладания и большей активации NK-клеток у больных КРР и преобладании доли Т-клеток и их активации у больных меланомой. Данные результаты могут служить обоснованием для расширения общепринятой панели маркеров при фенотипировании лимфоцитов и оценки субпопуляционного состава лимфоцитов крови у онкологических больных.

Экспериментальное моделирование блокирования активирующих рецепторов NKG2D на NK-клетках

Для того, чтобы проверить, что циркулирующий МІСА может блокировать NKG2D и изучить влияние растворимых форм стресс-индуцированных молекул МІСА на активность NK-клеток мы провели серию экспериментов *ex vivo*. Для этого был получен, охарактеризован и очищен рекомбинантный белок человека МІСА (rhMІСА).

В качестве источника sMІСА использован rhMІСА в концентрациях 0, 1, 5 и 10 мкг/мл. Измеряли долю NK-клеток и уровень экспрессии NKG2D на их поверхности. Было

установлено, что кратковременная инкубация свежeweделенных лимфоцитов с rhMICA приводит к резкому снижению уровня поверхностной экспрессии NKG2D на NK-клетках (рис.3).

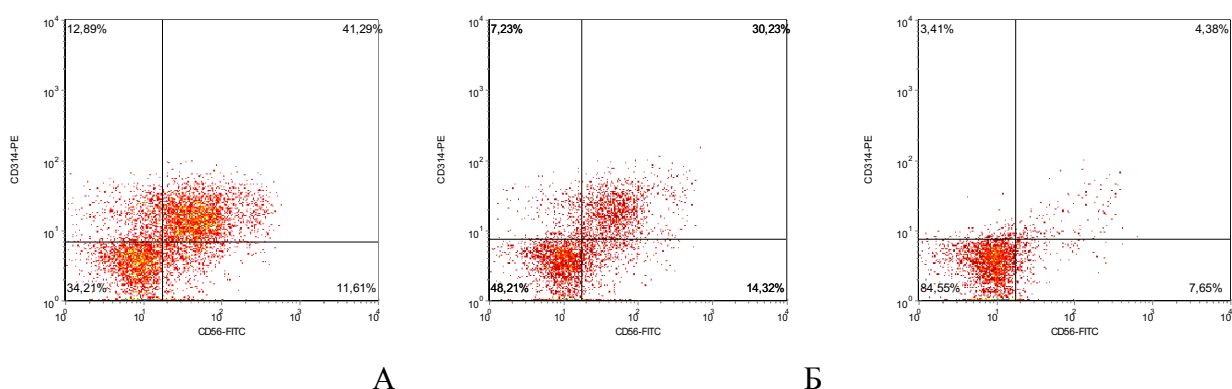


Рисунок 3 - Снижение уровня поверхностной экспрессии NKG2D на CD3-CD56⁺ лимфоцитах здорового донора после инкубации лимфоцитов в присутствии высоких концентраций rhMICA (типичный пример). Без обработки rhMICA (А), обработка мононуклеаров rhMICA в концентрации 1 мкг/мл (Б) и 5 мкг/мл (В)

Однако, после активации МНК в присутствии IL-2 и IL-15 цитотоксические лимфоциты обладали повышенной экспрессией NKG2D, которая не ингибировалась в полной мере, несмотря на присутствие rhMICA. Также показано, что активированные лимфоциты, даже после инкубации с лигандом NKG2D, обладают более высокой цитотоксической активностью по сравнению с нативными NK-клетками. Полученные данные могут свидетельствовать в пользу проведения АИТ с помощью активированных цитотоксических лимфоцитов. Экспериментальные данные указывают на наличие опосредованных NKG2D механизмов в регуляции функций естественных киллеров при взаимодействии с опухолевыми клетками, экспрессирующими лиганды NKG2D, и растворимыми формами этих молекул.

II – Разработка метода длительного культивирования и активации лимфоцитов для адоптивной иммунотерапии

В данном исследовании для активации МНК первоначально использовали IL-2 в различных концентрациях от 31,25; 62,5; 125; 250 до 500 МЕ/мл и культивировали их на протяжении 10-14 дней. Было показано, что лимфоциты пролиферируют пропорционально увеличению концентрации цитокина. Наибольшая пролиферативная активность наблюдалась при максимальной концентрации IL-2 в 500 МЕ/мл, однако в данном случае была достоверно снижена жизнеспособность лимфоцитов ($p < 0,05$), что не позволяло длительно культивировать лимфоциты. Отмечено, что в присутствии IL-2 в более низких концентрациях пролиферация лимфоцитов в первые трое суток культивирования в среднем увеличивалась на $75 \pm 15\%$. При активации в присутствии IL-2 в концентрации 250 МЕ/мл количество клеток

увеличивается в два раза через 5-6 дней культивирования. Поэтому мы выбрали данную концентрацию IL-2. Замечено, что в данных условиях культивирования со второго дня лимфоциты начинают изменять форму с круглой на продолговатую и неровную и увеличиваться в размерах (рис.4А). Некоторые CD45⁺CD14^{neg} лимфоциты прилипали к пластику (рис.4Б).

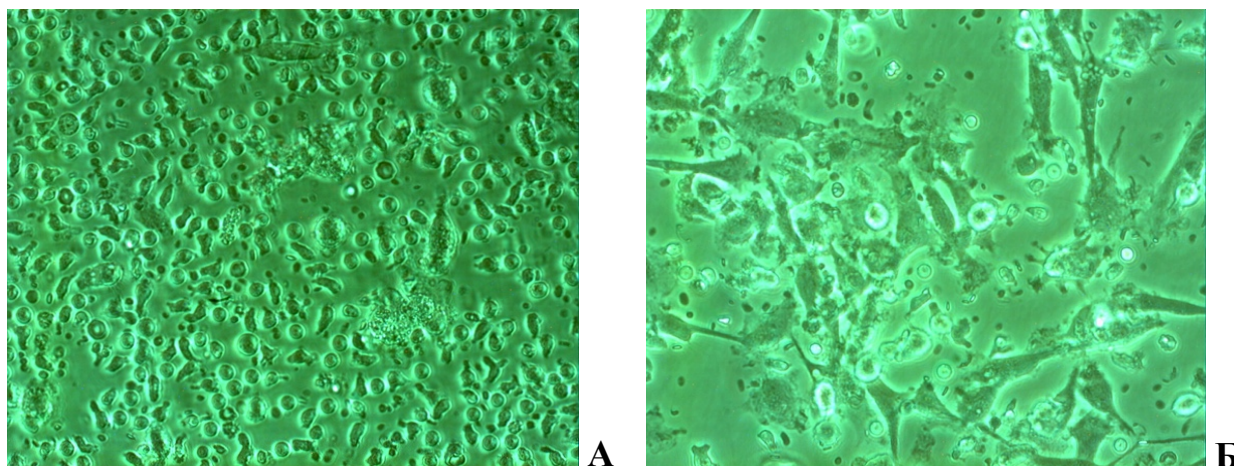


Рисунок 4 - Влияние IL-2 на морфологию лимфоцитов (ув. x400)
А) морфология мононуклеаров через 3 дня культивирования в среде с IL-2;
Б) через 5 дней культивирования в среде с IL-2

Показано, что при добавлении в среду второго цитокина – IL-15, пролиферация лимфоцитов достоверно выше, чем в среде с одним IL-2 (рис.5). При дальнейшем культивировании к 14 дню количество клеток увеличивалось в несколько раз, чего не было достигнуто в среде с IL-2.

На фоне увеличения пролиферации повышалась цитокинопродукция и значимо возросла экспрессия маркеров активации лимфоцитов. У больных с ОЖКТ экспрессия альфа цепи рецептора IL-2 (CD25) увеличилась в 1,7 раз, HLA-DR – в 1,5 раз, CD314 – в 1,5 раза, а CD38 – в 1,7 раз, CD69 на лимфоцитах в 2,9 раз, а на NK-клетках – в 2,2 раза ($p < 0,05$). У больных меланомой изменения в активации были более выражены. Экспрессия CD25 на лимфоцитах значимо увеличилась в 2,2 раза, HLA-DR – в 3,2 раза, CD314 – в 1,6 раз, CD38 – в 1,4 раза, CD69 на лимфоцитах в 4,3 раза, а CD69 на NK-клетках в 3,6 раз ($p < 0,05$). Количество незрелых CD45⁺RA⁺-клеток уменьшилось пропорционально увеличению доли зрелых CD45⁺RO⁺ клеток в культуре [Абакушина Е.В. и др. 2016, Кудрявцев И.В. и др. 2015].

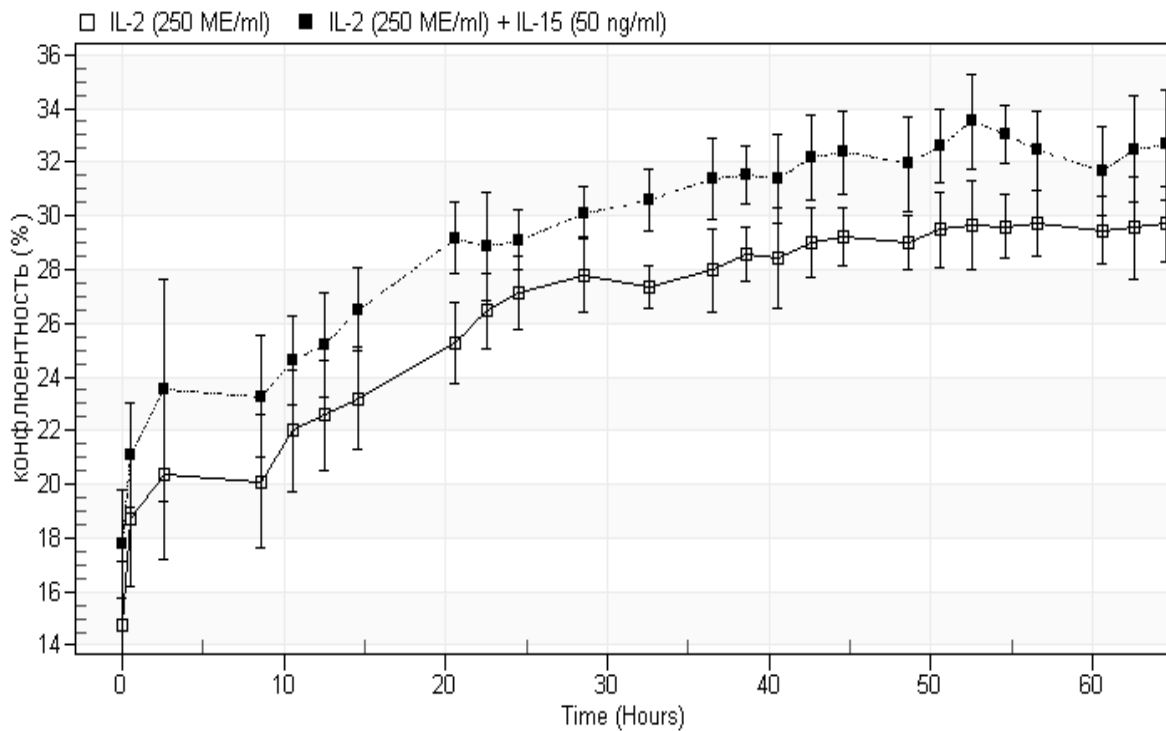


Рисунок 5 - Влияние IL-2 и IL-15 на конфлюентность лимфоцитов больного

При культивировании клеток в среде с IL-2 и IL-15 значительно увеличилось количество НК-клеток на 49,4% и активированных лимфоцитов, среди которых в большей степени возросла экспрессия HLA-DR на 183,3%, CD69 на 97,1%, CD25 на 58% и в меньшей степени увеличилась экспрессия CD38 на 37,9% и NKG2D на 28,9% ($p < 0,05$) (рис.6).

Доля CTL незначительно увеличилась в среднем с $37,4 \pm 8,9\%$ до $41,2 \pm 11\%$ по сравнению с культивированием в среде только с IL-2. Количество НКТ-клеток в большей степени начинало увеличиваться уже после 3 дня культивирования с двумя интерлейкинами и к 6 дню их доля составляла в среднем 14%. Таким образом, количество цитотоксических лимфоцитов в популяции активированных МНК составило более 80%.

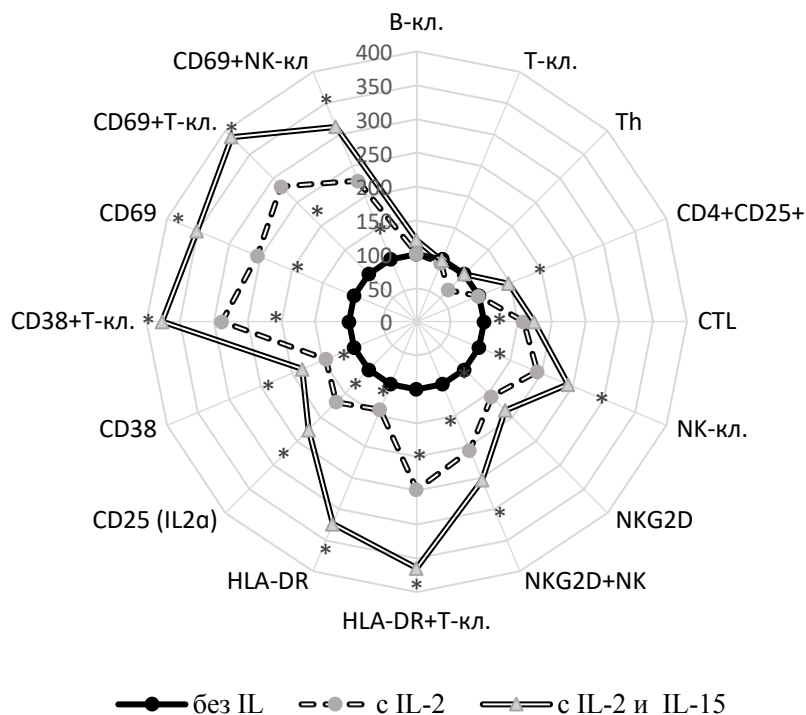


Рисунок 6 - Изменение поверхностной экспрессии маркеров активации на культивируемых лимфоцитах сразу после выделения (100%) и через 3 дня в среде с ИЛ-2 и при совместном культивировании с ИЛ-2 и ИЛ-15;

***значимое отличие количества клеток до и после активации МНК ($p < 0,05$)**

Было доказано, что параллельно с увеличением поверхностной экспрессии маркеров активации повышается цитотоксическая активность эффекторных лимфоцитов. Показано, что активность ЦИК-клеток в 1,6 раз выше, чем не активированных лимфоцитов и достоверно выше, чем у ЛАК-клеток ($p < 0,05$) (рис. 7).

Через 24 часа после начала культивирования наблюдается стремительный рост цитотоксической активности ЦИК-клеток, который достигает максимальных значений через 42 часа, что почти на сутки раньше, чем при активации одним ИЛ-2. Данная противоопухолевая активность лимфоцитов по отношению к клеткам-мишеням линии K562 сохраняется и в последующие дни культивирования.

В результате данного раздела исследования разработан метод длительного культивирования и активации лимфоцитов, выделенных из периферической крови человека. Установлено, что культура активированных лимфоцитов характеризуется присутствием 70-80% эффекторных клеток (CTL, NK, NKT) и повышенной пролиферативной и цитотоксической активностью, а также отличается высоким уровнем экспрессии активирующих рецепторов CD38, CD25, CD69, NKG2D и HLA-DR.

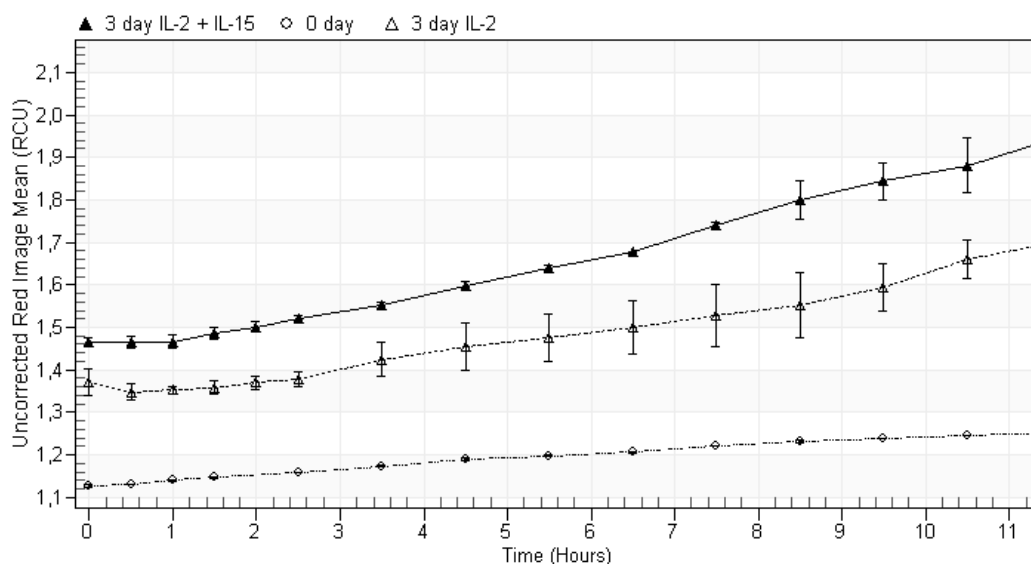


Рисунок 7 - Увеличение количества мертвых клеток-мишеней (красная флуоресценция Ethd-1) после инкубации с лимфоцитами больного меланомой без активации (0 день) и через 3 дня культивирования в средах с ИЛ-2 и в комбинации ИЛ-2/ИЛ-15 (соотношение мишень:эффектор 1:20)

Таким образом, в настоящей работе представлена комплексная морфофункциональная и иммунофенотипическая характеристика активированных цитотоксических лимфоцитов, которые использовались для АИТ злокачественных новообразований.

III – Результаты клинической апробации метода адаптивной иммунотерапии

Целью данного этапа исследования была оценка безопасности и переносимости АИТ с использованием активированных цитотоксических лимфоцитов (АЦЛ), полученных на предыдущем этапе работы. Каждому из 79 больных, включенных в исследование, было проведено от одного до двенадцати курсов АИТ, длительностью от 20 дней до 3 месяцев в зависимости от количества полученных лимфоцитов и индивидуальной схемы лечения.

Иммунотерапия АЦЛ была первоначально апробирована у 15 больных с различными онкологическими заболеваниями (таблица 2).

Всем больным было суммарно проведено 40 курсов АИТ, в среднем по 2,7 курса. Введение биологического продукта проводили паравертебрально внутрикочно в несколько точек (рис. 8).

Проведенная оценка клинической эффективности АИТ у этой группы больных раком позволила диагностировать ЧО у двух (13,3%) пациентов. Стабилизация процесса была отмечена у 6 больных (40%), у 4 из которых АИТ проводилась в самостоятельном режиме. Прогрессирование заболевания было у 5 больных (33,3%).

Ни у одного из 15 пациента не было замечено ухудшения самочувствия, нежелательных явлений и выраженных побочных реакций (изъязвлений в месте инъекции, аллергиче-

ских реакций, желудочно-кишечных расстройств), связанных с введением клеток или биопродукта. В 4 (26,7%) случаях у больных наблюдалась местная гиперреакция, которая появлялась через 24-72 часа после повторного введения активированных клеток, проявлялась участками гиперемии в местах введения и зудом и сохранялась от нескольких дней до нескольких недель. У трети больных (5/15; 33,3%) наблюдалась немедленная местная реакция, которая проявлялась гиперемией кожи вокруг мест введения биопродукта (рис. 9).



Рисунок 8 - Введение активированных цитотоксических лимфоцитов внутривенно паравентрально в несколько точек.



Рисунок 9 - Местная реакция гиперемии на введение активированных цитотоксических лимфоцитов

После проведения апробации метода АИТ мы продолжили исследование и объединили 13 пациентов с КРР в одну группу, вторую группу составил 51 больной меланомой кожи.

Большинство больных КРР – 12 (92,3%) исчерпали возможности стандартного лечения. Они получали различные виды противоопухолевого лечения. Комбинированное лечение проведено у 11 (15%) больных, комплексное у 1 (15%) больного. Среди 51 больного меланомой комплексное или комбинированное лечение получили 46 больных (90,2%). Оно включало оперативное вмешательство у 45 человек, пред- и/или после операционную ЛТ у 44 больных, одну линию ХТ дакарбазином или две с мустофораном у 42 больных, ИТ была проведена у 3 (5,9%) и ФДТ у 3 (5,9%) пациентов. Единственный метод лечения предшествовал АИТ у 5 (9,8%) больных.

Всем больным КРР суммарно было проведено 26 курсов АИТ, а больным меланомой суммарно проведено 164 курса АИТ, в среднем по 2-3 курса в интервале от 1 до 12 курсов АИТ. Ни у одного больного не было замечено нежелательных явлений и побочных реакций, кроме незначительного зуда в месте введения биопродукта. Аллергические реакции и какие-либо иные виды непереносимости АИТ не были зарегистрированы. У онкологических больных АИТ, вызвала, главным образом, гриппоподобный синдром, основным проявлением которого были

умеренная гипертермия в 35,3% случаев, которая не требовала медикаментозной коррекции и была связана с терапевтическим действием АИТ. Изменения показателей периферической крови, функции почек и печени при данном виде лечения не отмечалось.

У всех 64 больных были оценены результаты проведения АИТ по критериям irRC (таблица 8, 9) и статус физического состояния по шкале ECOG.

Полного объективного ответа на лечение получено не было. Однако ЧО зафиксирован у 6 из 51 больного меланомой, чего не наблюдалось у больных КРР. СБ была достигнута почти в половине наблюдений у больных меланомой (52,9%) и КРР (46,2%) (таблица 8). У остальных больных наблюдалось прогрессирование заболевания.

Среди больных с достигнутым ответом на лечение медиана времени до достижения клинического ответа составила в среднем 3,3 месяца в интервале от 1 до 7 месяцев, а продолжительность безрецидивного периода на момент анализа, составила 27 месяцев (от 7 до 48 месяцев).

Таблица 8

Эффективность комплексного лечения с включением АИТ активированными лимфоцитами у больных КРР и меланомой

	КРР, n=13 (%)	Меланома, n=51 (%)
Стабилизация болезни	6 (46,2)	21 (41,2)
Частичная регрессия	0 (0)	6 (11,8)
Контроль над ростом опухоли	6 (46,2)	27 (52,9)
Прогрессирование болезни	7 (53,8)	24 (47,1)
Медиана ВДП от начала АИТ, интервал (мес.)	13,5 (3-37)	27 (7-48)

Гиперемия, подобная замедленной провоспалительной реакции, отмечалась в месте введения биопродукта у 14 (27,5%) больных меланомой. Основным оцениваемым параметром у данных больных была медиана ВДП. В группе больных с кожной реакцией она составила 26 месяцев (95% ДИ 14-36,1 мес), а в группе без местных проявлений провоспалительной реакции – 5 месяцев (95% ДИ 3-10,6 мес) (рис. 10). При статистической обработке полученных данных и применении Log Rank (Mantel-Cox) теста у больных меланомой, отмечено наличие взаимосвязи между кожной реакцией гиперемии и ВДП ($p=0,002$). Хочется отметить, что в 85,7% (12/14) случаев у больных из группы с местной реакцией наблюдалась СБ. У остальных пациентов без местных кожных проявлений СБ наблюдалась только в 35,1% (13/37) случаев ($p<0,05$).

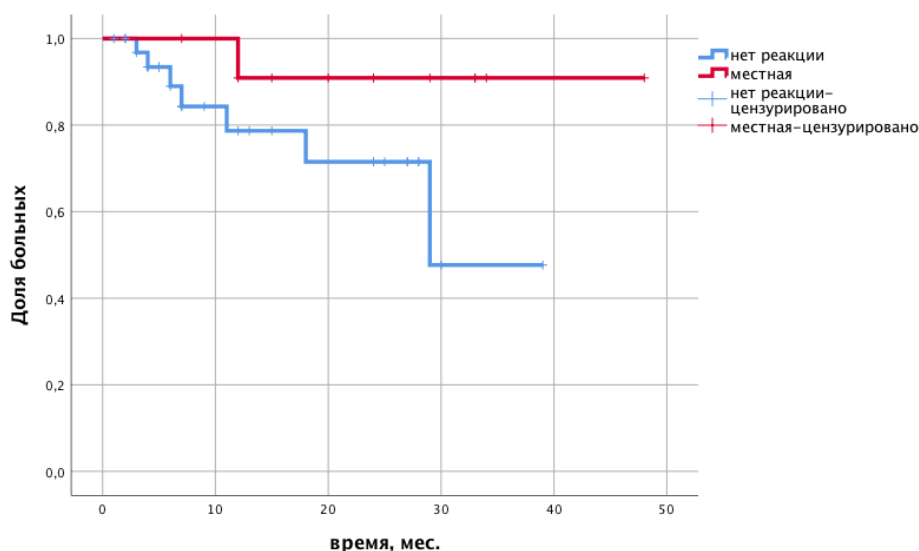


Рисунок 10 - Время до прогрессирования у больных меланомой с наличием и отсутствием кожной реакции на введение биопродукта

У больных КРР и меланомой, у которых АИТ проводилась в самостоятельном режиме, оценивали клинические показатели крови. Изменений в общем и биохимическом анализе при данном виде лечения не наблюдалось. Следовательно, гематологической и других видов токсичности у пациентов на фоне АИТ отмечено не было. На фоне АИТ в адьювантном режиме у 78,1% больных данной группы не наблюдалось снижения абсолютного количества лейкоцитов – $5,17 \pm 1,26 \cdot 10^9/\text{л}$, лимфоцитов – $1,15 \pm 0,43 \cdot 10^9/\text{л}$ и тромбоцитов – $251,67 \pm 28,15 \cdot 10^9/\text{л}$, а также показателей АСТ – $<40 \text{ Е/л}$, АЛТ – $<35 \text{ Е/л}$, ЩФ – $<220 \text{ Е/л}$. Данный факт свидетельствует о снижении побочных эффектов ХТ и уменьшение миелотоксичности ХТ препаратов у больных, которым проводили АИТ в адьювантном режиме. При этом следует отметить хорошую переносимость данного метода ИТ.

Показано, что статус состояния большинства пациентов по шкале ECOG после АИТ улучшился (таблица 9).

Таблица 9

Статус больных меланомой и КРР по шкале ECOG до и после АИТ

Статус ECOG	КРР (n=13)		Меланома (n=51)	
	До АИТ	После АИТ	До АИТ	После АИТ
0	0	6	5	23
1	6	6	32	27
2	6	1	14	1
3	1	0	0	0
Среднее±SD	1,5±0,7	0,6±0,6 (p<0,01)	1,2±0,6	0,6±0,5 (p<0,01)

В среднем в каждой группе пациентов после проведения АИТ наблюдалось значимое уменьшение показателей статуса ECOG ($p < 0,05$), что свидетельствует в пользу улучшения качества жизни больных КРР и меланомой на фоне АИТ. Данные результаты и отдельные случаи объективного ответа на включение АИТ в схему лечения онкологических больных позволяют обосновать дальнейшее исследование по оценке эффективности данного вида клеточной иммунотерапии в прямом контролируемом исследовании.

IV – Мониторинг показателей иммунитета у онкологических больных на этапах адоптивной иммунотерапии

На данном этапе работы охарактеризована взаимосвязь между состоянием клеточного и гуморального звеньев иммунитета у онкологических больных различных нозологических групп до начала и в процессе проводимой АИТ. Для этого мы объединили больных с опухолями ЖКТ в одну группу ($n=21$) (13 больных КРР, 4 больных раком поджелудочной железы (РПЖ), 2 больных раком желудка (РЖ) и 2 больных раком пищевода (РП)) так как данные нозологии имеют сходные изменения в иммунологических показателях, как нами было показано ранее [Абакушина Е.В. и соавт. 2012]. Вторую группу составили больные меланомой ($n=51$). Данные нозологии интересны с точки зрения иммунного ответа и чувствительности к АИТ.

Был проведен анализ результатов фенотипирования лимфоцитов в динамике на протяжении 6-12 месяцев. Для большинства больных не характерно изменение количества основных популяций лимфоцитов на фоне АИТ, системный эффект терапии проявлялся в изменении доли клеток в минорных субпопуляциях и в экспрессии маркеров активации (рис.11).

Одинаковая тенденция наблюдается у больных КРР и меланомой в снижении количества NK-клеток после АИТ. Разнонаправленный характер изменений выявлен в числе $CD25^+$ лимфоцитов, доля которых после АИТ увеличивается у больных с ОЖКТ и уменьшается у больных меланомой. Рецептор NKG2D наоборот экспрессируется в большей степени в отдаленные сроки после АИТ у больных меланомой и снижается у больных с ОЖКТ. Одинаковая тенденция к повышению поверхностной экспрессии маркеров активации $CD38$ и $CD95$ прослеживается у пациентов обеих групп. У больных меланомой дополнительно обнаруживаются значимые количества $HLA-DR^+$ лимфоцитов в первые месяцы после начала АИТ и $CD69^+$ лимфоцитов через 4-6 месяцев АИТ.

Возможно, эти явления обусловлены запуском долгосрочных каскадных реакций активации иммунитета у данных пациентов. У больных с ОЖКТ данные субпопуляции лимфоцитов не реагировали на введение АЦЛ, что еще раз подтверждает различную иммуногенность этих злокачественных новообразований.

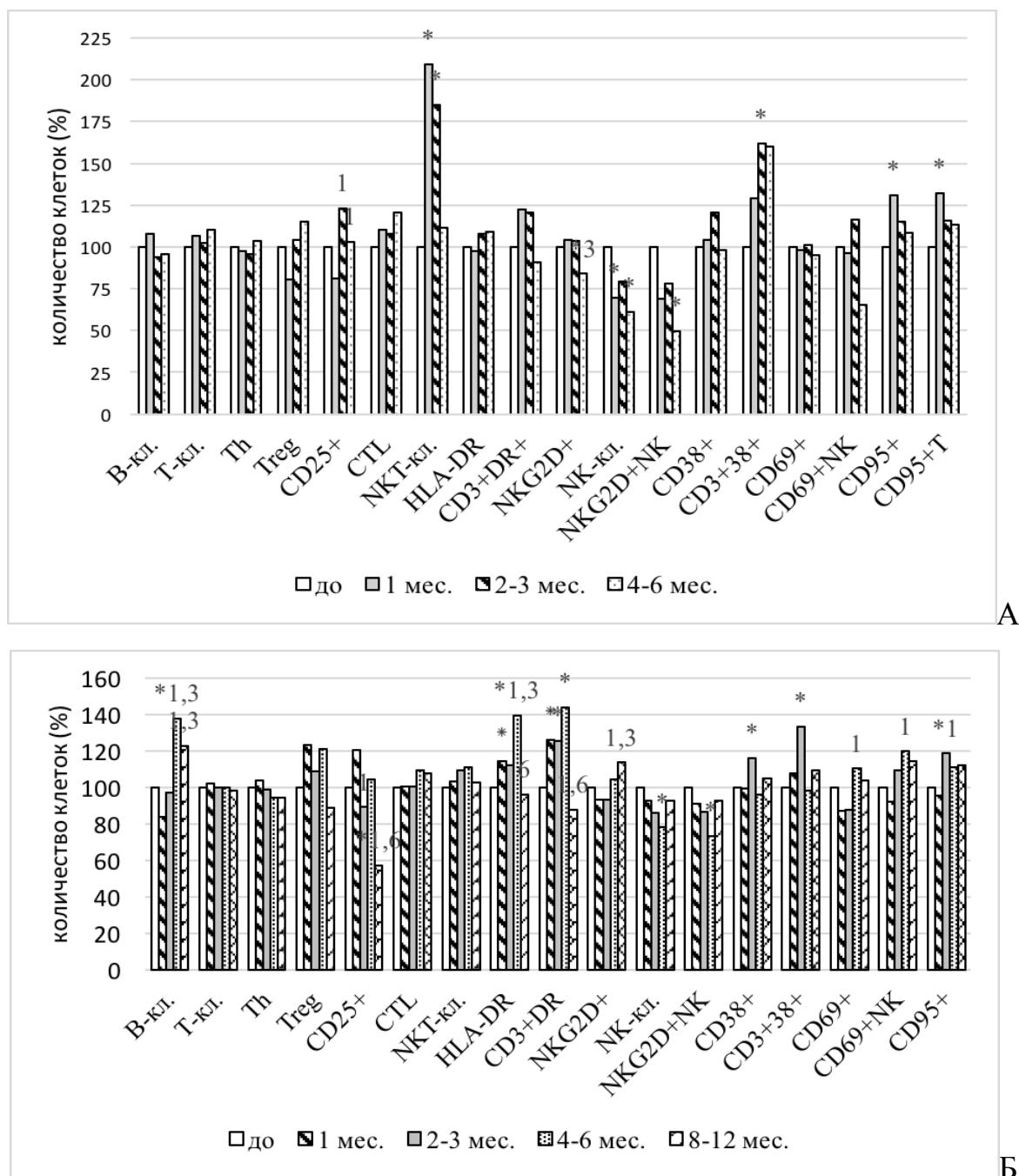


Рисунок 11 - Изменение количества лимфоцитов в периферической крови у больных с ОЖКТ (А) и меланомой (Б) до АИТ (100%) и через 1, 2-3, 4-6 и 8-12 месяцев.

***достоверное отличие значения от уровня перед лечением среди пациентов той же нозологической группы;**

¹достоверное отличие значения от уровня 1 месяц после начала АИТ;

³достоверное отличие значения от уровня 2-3 месяца после начала АИТ;

⁶достоверное отличие значения от уровня 4-6 месяцев после начала АИТ

Также в работе был измерен уровень цитокинов сыворотки крови больных перед началом и после окончания первого курса АИТ (таблица 10). Результаты данного исследования по оценке влияния АИТ на гуморальное звено иммунитета подтверждают системный эффект данного вида лечения.

Изменение сывороточного содержания цитокинов у онкологических больных до и после проведения АИТ

Группы	Концентрация цитокинов (пг/мл)			
	IFN- α	TNF- α	IL-2	IL-10
Контрольная	0,9 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	0 \pm 0,01	1,4 \pm 0,2
До адоптивной иммунотерапии				
ОЖКТ	4,2 \pm 3,1 ¹	11,1 \pm 3,1 ¹	0 \pm 0,01	1,3 \pm 0,5
Меланома	5,6 \pm 4,7 ¹	3,9 \pm 2,7	0 \pm 0,01	1,2 \pm 0,6
После адоптивной иммунотерапии				
ОЖКТ	3,7 \pm 2,7 ¹	7,9 \pm 6,4 ¹	0,1 \pm 0,3	2,0 \pm 0,4 ²
Меланома	2,8 \pm 3,3 ²	4,2 \pm 3,6	0,1 \pm 0,1	1,3 \pm 0,7

¹ достоверно отличающиеся значения относительно группы контроля;

² достоверно отличающиеся значения относительно показателей до АИТ (p<0,05).

При оценке уровня sMICA на этапах АИТ было показано, что после АИТ средняя концентрация sMICA несколько увеличивалась, но различия не были достоверными. При разделении пациентов на две подгруппы по течению заболевания со СБ и ПБ можно отметить, что у больных с ОЖКТ с ПБ исходно уровень sMICA повышен в 1,4 раза. В процессе наблюдения уровень sMICA дополнительно увеличился в 1,3 раза. У больных с ОЖКТ со СБ после АИТ уровень sMICA был в 1,9 раз меньше чем в другой подгруппе (p<0,05). У больных меланомой со СБ после проведения курса АИТ наблюдалась тенденция к снижению уровня sMICA в 1,4 раза. Противоположные изменения наблюдались у больных с ПБ. Концентрация sMICA у данных больных увеличилась в 1,3 раза и значимо отличалась от исходных показателей в группе со СБ (p<0,05).

При разделении больных на три группы: I – с низким, II – со средним и III – с высоким уровнем sMICA было показано, что у больных с ОЖКТ и меланомой из III группы исходно увеличен уровень sMICA и снижена экспрессия NKG2D у больных меланомой и на НК-клетках у больных с ОЖКТ (p<0,05), что свидетельствует о лиганд рецепторном взаимодействии (таблица 11, 12).

Также у больных различных нозологических групп с высоким sMICA повышенное количество Treg, которое после АИТ снизилось у больных с ОЖКТ и повысилось у больных меланомой III группы (p<0,05), что указывает на преобладание иммуносупрессивных механизмов. После АИТ концентрация sMICA несколько повысилась у больных с ОЖКТ и не изменилась у больных меланомой, что указывает на неэффективность данного вида терапии у больных с изначально высоким уровнем sMICA и повышенным содержанием Treg в периферической крови. Дополнительно у больных с ОЖКТ из III группы до АИТ было снижено количество НК-клеток по сравнению с пациентами II группы (p<0,05).

Таблица 11

Уровень молекул МІСА и количество лимфоцитов периферической крови у групп больных ОЖКТ до и после проведения АИТ

этап АИТ	МІСА, пг/мл	NKG2D ⁺ клетки, %	NKG2D ⁺ NK-клетки, %	NK-клетки, %	Treg, %
I группа (sMІСА < 1500 пг/мл) (n=4)					
До	886,0±649,9	43,0±19,1	16,5±4,0	23,8±8,2	9,0±2,0
После	794,5±1101,2	34,0±8,5	15,5±5,0	15,5±2,1	5,5±0,7*
II группа (sMІСА от 1500-4000 пг/мл) (n=9)					
До	2546,2±488,9 ¹	46,6±12,0	19,1±11,4	22,1±12,3	8,6±3,1
После	3827,6±2265,6	44,8±5,7	18,0±12,1	23,5±11,5	8,8±6,7
III группа (sMІСА > 4000 пг/мл) (n=8)					
До	6709,5±1385,8 ^{1,2}	42,4±15,4	11,0±3,0 ²	15,6±2,9 ¹	12,0±3,1 ²
После	8348,5±1969,0 ^{1,2}	44,8±7,9	15,4±13,4	16,0±14,1	9,2±3,1*

*достоверные отличия от показателей той же группы до АИТ,

¹ достоверные отличия от показателей первой группы данного этапа лечения,

² достоверные отличия от показателей второй группы данного этапа лечения.

Таблица 12

Уровень молекул МІСА и количество лимфоцитов периферической крови у групп больных меланомой до и после проведения АИТ

Этап АИТ	МІСА, пг/мл	NKG2D ⁺ клетки, %	NKG2D ⁺ NK-клетки, %	NK-клетки, %	Treg, %
I группа (sMІСА < 1500 пг/мл) (n=16)					
До	131,6±120,5	40,7±11,7	12,5±5,0	16,6±6,3	9,9±7,1
После	1027,6±886,2	39,6±12,3	13,7±9,6	16,7±7,2	10,9±8
II группа (sMІСА от 1500-4000 пг/мл) (n=18)					
До	2619,7±300,4 ¹	43,7±12,2	12,9±8,2	15,2±7,8	9,0±7,3
После	2785,1±641,1 ¹	42,7±9,2	14,3±9,6	15,9±9,2	9,4±4,5
III группа (sMІСА > 4000 пг/мл) (n=17)					
До	6638,1±1103,2 ^{1,2}	36,5±12,0 ²	13,5±10,5	17,1±10,4	11,9±5,3
После	6175,3±1639,1 ^{1,2}	35,4±10,2	11,6±4,7	18±6,6	16,6±6,5* ^{1,2}

*достоверные отличия от показателей той же группы до АИТ,

¹ достоверные отличия от показателей первой группы данного этапа лечения,

² достоверные отличия от показателей второй группы данного этапа лечения.

Оценка клинической эффективности проведенной терапии показала отсутствие эффекта от АИТ в подгруппе больных с ОЖКТ и меланомой с уровнем sMICA >4000 пг/мл. У 75% пациентов из которых наблюдалась прогрессия заболевания. Можно заключить, что высокий уровень sMICA у онкологических больных может служить отправной точкой для исключения пациентов из протоколов лечения с использованием иммунотерапевтических подходов аутологичными лимфоцитами. Возможно, именно этим пациентам необходимо предложить аллогенные ЦЛ от здоровых доноров.

Таким образом, у онкологических больных различных по иммуногенности нозологических групп прослеживается одинаковая тенденция в увеличении концентрации sMICA в сыворотке крови при наличии большой опухолевой массы и прогрессировании болезни. Было отмечено, что если у больных с ОЖКТ или меланомой уровень sMICA на фоне терапии резко возрастает и превышает значения в 10000 пг/мл, то отмечается рецидив заболевания, несмотря на проведенное лечение. Данный показатель может быть использован для мониторинга прогноза развития заболевания и контроля за увеличением опухолевой массы.

Персонализированная оценка показателей иммунитета и изучение закономерностей изменения субпопуляционного состава лимфоцитов, маркеров активации и цитокинов позволит дополнить наше представление об изменениях в иммунной системе при канцерогенезе. Данные изменения параметров иммунитета могут служить дополнительными критериями в оценке эффективности проводимой АИТ наряду с критериями irRC.

ВЫВОДЫ

1. Уровень стресс-индуцированных молекул MICA (лигандов рецептора NKG2D) в сыворотке крови онкологических больных превышает контрольные значения в 3-8 раз при раке тела или шейки матки, предстательной железы, меланоме, раке языка или гортани, молочной железы, толстой кишки или желудка ($p < 0,002$).
2. Дисбаланс в субпопуляционном составе лимфоцитов у большинства больных колоректальным раком и меланомой проявляется в повышении относительного и абсолютного содержания Treg и экспрессии CD25; повышении содержания NK-клеток, за счет активированных NKG2D⁺ и CD69⁺NK-клеток у больных колоректальным раком и повышении количества HLA-DR⁺ лимфоцитов и CD38⁺T-лимфоцитов у больных меланомой кожи.
3. В модельной системе показано, что рекомбинантный человеческий белок MICA может взаимодействовать *in vitro* с рецептором NKG2D на NK-клетках и снижать их цитотоксическую активность, что предполагает участие сывороточных молекул MICA в супрессии противоопухолевого иммунного ответа.
4. При длительном культивировании *in vitro* мононуклеарных клеток, в присутствии комбинации цитокинов IL-2 и IL-15 в низких концентрациях, формируется пул цитотоксических лимфоцитов, который характеризуется увеличенной экспрессией активирующих рецепторов, повышенной пролиферативной и цитотоксической активностью и сохранением высокой жизнеспособности.
5. Персонафицированная адоптивная иммунотерапия с использованием активированных *in vitro* цитотоксических лимфоцитов является безопасной, не вызывает серьезных побочных эффектов и позволяет улучшить качество жизни онкологических больных за счет значимого снижения показателей состояния больных, оцененных по шкале ECOG.
6. Системный эффект адоптивной иммунотерапии на организм онкологического больного проявляется в изменении доли NK-клеток, минорных популяций (NKT-, Treg) и экспрессии маркеров активации лимфоцитов, а также концентрации цитокинов (IFN- α , IL-10) и сывороточного уровня молекул MICA.
7. Увеличение концентрации молекул MICA в сыворотке крови онкологических больных на фоне адоптивной иммунотерапии может свидетельствовать о прогрессии заболевания, а снижение данного параметра - о стабилизации болезни или об объективном ответе на терапию.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для выявления иммуносупрессии и улучшения иммунодиагностики рекомендуется определять уровень растворимых форм молекул MICA в сыворотке крови онкологических больных. Перед началом и после каждого курса АИТ целесообразно проводить мониторинг молекул MICA. Изменение концентрации сывороточных лигандов NKG2D может быть использовано в качестве прогностического фактора, что позволит проследить эффективность проводимой терапии.
2. При оценке иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови у онкологических больных кроме основных популяций В-, Т- и NK-клеток целесообразно дополнительно определять NKT-клетки, Treg, экспрессию Fas (CD95) и маркеров активации лимфоцитов CD25, CD38 и CD69.
3. Для активации МНК, увеличения пролиферативной и функциональной активности NK-клеток человека рекомендуется использовать комбинацию цитокинов IL-2 (250 МЕ/мл) и IL-15 (50 нг/мл).
4. Разработанный метод длительного культивирования и активации цитотоксических лимфоцитов можно применять в клинической практике для АИТ онкологических больных, а также для изучения биологии и эффекторных функций NK-клеток в фундаментальных научных исследованиях.
5. Целесообразно включать АИТ активированными цитотоксическими лимфоцитами в качестве безопасного метода персонафицированной иммунотерапии в схемы комплексного лечения онкологических больных с солидными опухолями. Достоинством метода является возможность проведения АИТ в амбулаторных условиях.
6. Адоптивную ИТ рекомендуется проводить онкологическим больным у кого ожидаемая продолжительность жизни не менее 3-х месяцев. Курсы АИТ следует повторять каждые 2-3 месяца в течение длительного периода времени параллельно с основным лечением или в самостоятельном режиме.
7. Для уменьшения побочных эффектов и снижения миелотоксичности химиотерапии целесообразно проводить АИТ в адьювантном режиме. В данном случае забор периферической крови для активации лимфоцитов рекомендуется производить непосредственно перед очередным курсом ХТ.
8. Для оценки клинической эффективности проводимой АИТ и иммунологической реактивности организма больного кроме критериев irRC необходимо оценивать степень местной провоспалительной кожной реакции на введение биопродукта, концентрацию лигандов рецептора NKG2D, количество популяций Treg, NKT-, Т-лимфоцитов и NK-

клеток с маркерами активации (CD25, HLA-DR, CD38, CD69, NKG2D и CD95) и цитокиновый профиль (IFN- α , TNF- α , IL-10).

9. Рекомбинантный человеческий белок MICA можно использовать для изучения влияния растворимых форм молекул на NK-клетки человека, а также для получения анти-MICA антител и разработки методов таргетной и радиоиммунотерапии злокачественных опухолей.

Список работ, опубликованных по теме диссертационной работы

1. Kovalenko, E.I. CD15 and related oligosaccharides upregulate NK-cell-mediated cytotoxicity / E.I. Kovalenko, **E.V. Khirova (Abakushina)**, S.V. Khaidukov, T.V. Ovchinnikova, M.A. Sablina, N.V. Bovin // *Leucocyte typing VII* (Edited by D. Mason et al.). Proceedings of VII International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. – Oxford: Oxford University press. – 2002. – p. 183-185.
2. Kovalenko, E.I. The modification of cell surface with lipophilic glycoconjugates and the interaction of modified cells with natural killer cells / E.I. Kovalenko, **E.V. Khirova (Abakushina)**, I.M. Molotkovskaya, T.V. Ovchinnikova, M.A. Sablina, A.M. Sapozhnikov, S.V. Khaidukov, N.V. Bovin // **Russ J Bioorganic Chem.** – 2004. – V.30. – p.250-260 (translated from *Bioorganicheskaya Khimiya* (Russian) – 2004. – V.30. – p.281-292).
3. **Abakushina, E.V.** The modulation of NK cell – mediated cytotoxicity using synthetic glycoconjugates containing various carbohydrate ligands / **E.V. Abakushina**, E.I. Kovalenko, M.A. Sablina, S.V. Khaidukov, N.V. Bovin // In book of abstracts FEBS advanced course: "Chemistry meets biology". – Greece, Island of Spetses. – 2005. - July 17-29. – p. 5.
4. Kovalenko, E.I. Clustered carbohydrates as a target for natural killer cells: a model system / E.I. Kovalenko, **E.V. Abakushina**, V. Kapoor, E. Korchagina, S. Khaidukov, I.M. Molotkovskaya, A.M. Sapozhnikov, P.A. Vlaskin, N.V. Bovin, W.G. Telford // In book of abstracts: The ISAC XXIII International congress "The International society of analytical cytology". – Quebec City, Canada – 2006. – May 20-24.
5. Kovalenko, E.I. Clustered carbohydrates as a target for natural killer cells: A model system / E.I. Kovalenko, **E.V. Abakushina**, W. Telford, V. Kapoor, E.Yu. Korchagina, S.V. Khaidukov, I.M. Molotkovskaya, A. Sapozhnikov, P.A. Vlaskin, N.V. Bovin. // **Histochem Cell Biol.** – 2007. – V.127. – №3. – p. 313-326.
6. Коваленко, Е.И. Влияние стресс-индуцируемой молекулы МІСА на активность НК-клеток человека / Е.И. Коваленко, Ю.И. Стрельникова, Л.М. Коневский, **Е.В. Абакушина** // **Омский научный вестник.** – 2007. –Т.61. – №3. – С. 29-31.
7. Каневский, Л.М. Влияние циркулирующих молекул МІСА на активность натуральных киллеров человека / Л.М. Каневский, Ю.И. Стрельникова, **Е.В. Абакушина**, А.В. Орлов, Е.И. Коваленко // *Российский иммунологический журнал.* – 2008. – Т.2(11). – №2-3. – С. 121.
8. Кузьмина, Е.Г. Определение опухолеассоциированной молекулы МІСА в сыворотке крови больных гемобластозами / Е.Г. Кузьмина, Е.И. Коваленко, Е.В. Абакушина // *Материалы XIV Российского онкологического конгресса.* – Москва. – 2010. – 23-25 ноября. – С. 222.
9. **Абакушина, Е.В.** Определение функциональной активности естественных киллеров человека методом проточной цитометрии / **Е.В. Абакушина** // *Клинико-лабораторный консиллиум.* – 2011. – Т.39. – №3. – С. 17-25.

10. **Абакушина, Е.В.** Стресс-индуцированные молекулы МІСА/В и их роль в развитии онкологических заболеваний / **Е.В. Абакушина**, Е.Г. Кузьмина // Молекулярная медицина. – 2012. – №2. – С. 16-20.
11. **Абакушина, Е.В.** Основные свойства и функции НК-клеток человека / **Е.В. Абакушина**, Е.Г. Кузьмина, Е.И. Коваленко // Иммунология. – 2012. – Т.33. – №4. – С. 220-225.
12. **Абакушина, Е.В.** Роль стресс-индуцированных молекул МІСА/В в противоопухолевом иммунном ответе / **Е.В. Абакушина** // Злокачественные опухоли. – 2012. – Т.2. – №2. – С. 103-105.
13. Клинкова, А.В. Стресс-индуцированные молекулы МІСА в сыворотке крови больных лимфопролиферативными заболеваниями / А.В. Клинкова, Е.И. Коваленко, **Е.В. Абакушина**, Е.Г. Кузьмина, Г.С. Неприна // Злокачественные опухоли. – 2012. – Т.2. – №2. – С. 165-166.
14. Коваленко, Е.И. Иммунорегуляторные молекулы МІСА в сыворотке крови онкологических больных / Е.И. Коваленко, **Е.В. Абакушина**, А.В. Клинкова, Е.Г. Кузьмина, Л.М. Каневский // Злокачественные опухоли. – 2012. – Т.2. – №2. – С. 167.
15. Цыб, А.Ф. Новые иммунобиотехнологические подходы к ранней диагностике онкологических заболеваний / А.Ф. Цыб, **Е.В. Абакушина**, Ю.С. Романко // Сборник статей IV международной научно-практической конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине". Под ред. А.П. Кудинова, Б.В. Крылова. – СПб. – 2012. – 15-16 ноября. – С. 109-113.
16. **Абакушина, Е.В.** Перспективы радиоиммунотерапии в диагностике и лечении различных заболеваний / **Е.В. Абакушина**, Д.Н. Абакушин, Ю.Н. Анохин // Материалы научной сессии НИЯУ МИФИ. – Москва. – 2013. – 1-6 января. – С. 263.
17. Абакушин, Д.Н. Поиск нового прогностического фактора в развитии хронического лимфолейкоза / Д.Н. Абакушин, **Е.В. Абакушина**, Г.С. Неприна, А.А. Даниленко, Т.Г. Шкаврова, Е.И. Коваленко // Материалы научной сессии НИЯУ МИФИ. – Москва. – 2013. – 1-6 января. – С. 281.
18. **Абакушина, Е.В.** Новый фактор прогноза течения хронического лимфолейкоза / **Е.В. Абакушина**, Г.С. Неприна, А.А. Даниленко, В.В. Павлов, Т.Г. Шкаврова, Е.И. Коваленко // Материалы 10-ой международной конференции "Иммунология гемопозеза". – Москва. – 2013. – 6-7 июня. – №1-2. – С. 170.
19. Цыб, А.Ф. Настоящее и будущее радиоиммунотерапии / А.Ф. Цыб, **Е.В. Абакушина**, Д.Н. Абакушин, Ю.С. Романко // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2013. – Т.58. – №3. – С. 48-55.

20. Абакушин, Д.Н. Поиск новых мишеней для радиоиммунотерапии онкологических заболеваний / Д.Н. Абакушин, **Е.В. Абакушина**, Ю.Н. Анохин // Вопросы онкологии. – 2013. – Т.59. – №3. – Т.Ш. – С. 1150.
21. **Абакушина, Е.В.** Опухолеассоциированные молекулы МІСА в сыворотке крови онкологических больных абдоминальной области / **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова, Г.С. Неприна, Б.А. Бердов, А.В. Клинкова, Е.И. Коваленко // Вопросы онкологии. – 2013. – Т.59. – №3. – Т.Ш. – С. 1151.
22. Кудрявцев, Д.В. Опыт применения терапии лимфокин-активированными киллерами (ЛАК) в лечении метастатической меланомы кожи / Д.В. Кудрявцев, **Е.В. Абакушина**, Г.С. Неприна, Г.Т. Кудрявцева, Н.В. Селиванова // Злокачественные опухоли. – 2013. – Т.6. – №2. – С. 142.
23. Маризина, Ю.В. Фенотипическая картина лимфоцитов и маркеров активации у онкологических больных / Ю.В. Маризина, **Е.В. Абакушина**, Г.С. Неприна, И.А. Пасова, Д.В. Кудрявцев // Злокачественные опухоли. – 2013. – Т.6. – №2. – С. 177.
24. **Абакушина, Е.В.** Изменение фенотипа лимфоцитов у больных со злокачественными новообразованиями абдоминальной области после иммунотерапии / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, И.А. Пасова, Б.А. Бердов // Новости клинической цитологии России. – 2013. – №3-4. – С. 46.
25. Клинкова, А.В. Циркулирующий белок МІСА при лимфопролиферативных заболеваниях / А.В. Клинкова, **Е.В. Абакушина**, Е.Г. Кузьмина, Е.И. Коваленко // Материалы XXVI зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". – Москва. – 2014. – 10-14 февраля. – С. 54.
26. **Абакушина, Е.В.** Иммунорегуляторные молекулы и субпопуляционный состав цитотоксических лимфоцитов у больных раком желудка и кишечника / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, И.А. Пасова, Д.Н. Абакушин, А.В. Клинкова, Е.И. Коваленко // Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Молекулярная диагностика". – 2014. – М.: МБА. – 2014. – 18-20 марта. – Т.2. – С. 39-40.
27. Абакушин, Д.Н. Цитокины и стресс-индуцированные молекулы в сыворотке крови больных раком желудка и толстой кишки / Д.Н. Абакушин, Ю.В. Маризина, **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова, А.В. Клинкова, Е.И. Коваленко, Б.А. Бердов // Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Молекулярная диагностика". – 2014. – М.: МБА. – 2014. – 18-20 марта. – Т.2. – С. 58-59.
28. **Абакушина, Е.В.** Оценка фенотипа лимфоцитов у больных раком желудка и толстого кишечника после иммунотерапии / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, И.А. Пасова, Б.А. Бердов // Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конфе-

- ренции с международным участием "Молекулярная диагностика". – 2014. – М.: МБА. – 2014. – 18-20 марта. – Т.2. – С. 64-65.
29. Маризина, Ю.В. Изменение субпопуляционного состава и фенотипа лимфоцитов у больных меланомой после иммунотерапии / Ю.В. Маризина, **Е.В. Абакушина**, Г.С. Неприна, Д.В. Кудрявцев, Н.В. Селиванова, Г.Т. Кудрявцева // Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Молекулярная диагностика". – 2014. – М.: МБА. – 2014. – 18-20 марта. – Т.2. – С. 65-66.
30. **Абакушина, Е.В.** Изучение фенотипа лимфоцитов после иммунотерапии больных раком желудка и толстого кишечника / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, И.А. Пасова, Б.А. Бердов // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т.13. – № 1. – С. 57.
31. Маризина, Ю.В. Фенотип лимфоцитов у больных меланомой после иммунотерапии / Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, Д.В. Кудрявцев, Н.В. Селиванова, **Е.В. Абакушина** // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т.13. – № 1. – С. 109.
32. Пасова, И.А. Изучение влияния адоптивной иммунотерапии на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у онкологических больных / И.А. Пасова, Ю.В. Маризина, **Е.В. Абакушина**, Г.С. Неприна, Б.А. Бердов // Таргетная терапия в онкологии: материалы Российской научно-практической конференции с международным участием. Под редакцией А.Ф. Лазарева. – Барнаул: АЗБУКА. – 2014. – 19-20 июня. – С. 137-138.
33. Селиванова, Н.В. Влияние иммунотерапии активированными лимфоцитами на экспрессию маркеров активации лимфоцитов у больных меланомой / Н.В. Селиванова, **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, Д.В. Кудрявцев, Г.Т. Кудрявцева // Таргетная терапия в онкологии: материалы Российской научно-практической конференции с международным участием. Под редакцией А.Ф. Лазарева. – Барнаул: АЗБУКА. – 2014. – 19-20 июня. – С. 146-147.
34. **Абакушина, Е.В.** Увеличение растворимых форм стресс-индуцированных молекул МІСА при онкологических заболеваниях / **Е.В. Абакушина**, А.В. Клинкова, Л.М. Каневский, Е.И. Коваленко // **Молекулярная медицина**. – 2014. – №3. – С.34-38.
35. **Абакушина, Е.В.** Экспериментальные и клинические аспекты радиоиммунотерапии в онкологии / **Е.В. Абакушина**, Д.Н. Абакушин, Ю.Н. Анохин // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – Т.63. – №3. – С. 56-64.
36. Маризина, Ю.В. Метод выращивания и активации лимфоцитов и NK-клеток / Ю.В. Маризина, **Е.В. Абакушина**, Г.С. Неприна // Клинико-лабораторный консилиум. – 2014. – Т.49. – №2, прил.2. – С. 31-32.
37. **Абакушина, Е.В.** Фотодинамическая терапия увеличивает цитотоксическую активность NK-клеток / **Е.В. Абакушина**, Ю.С. Романко, М.А. Каплан, Ю.В. Маризина, В.А. Молоч-

- ков, А.В. Молочков, Т.Е. Сухова, О.В. Матвеева, Е.И. Третьякова, Ж.С. Кунцевич, А.А. Прокофьев, К.В. Казанцева, С.Д. Дибирова // Сборник статей научно-практической конференции дерматовенерологов и косметологов ЦФО РФ «Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии». – М. – 2014. – 2-3 июня. – С. 3-4.
38. **Абакушина, Е.В.** Фенотип лимфоцитов у больных раком желудка и прямой кишки после иммунотерапии активированными лимфоцитами / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, И.А. Пасова, Б.А. Бердов // **Медицинская иммунология**. – 2014. – Т.16. – №5. – С. 449-456.
39. **Абакушина, Е.В.** Новые молекулярные мишени для радиоиммунотерапии онкологических заболеваний / **Е.В. Абакушина**, Ю.Н. Анохин, Е.И. Коваленко // Материалы конгресса Российской ассоциации радиологов. – М. – 2014. – 6-8 ноября – С. 4-6.
40. Селиванова, Н.В. Опыт применения иммунотерапии активированными лимфоцитами после предоперационной лучевой терапии в комплексном лечении больных метастатической меланомой / Н.В. Селиванова, **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, Д.В. Кудрявцев, Г.Т. Кудрявцева // Материалы конгресса Российской ассоциации радиологов. – М. – 2014. – 6-8 ноября. – С. 315-317.
41. **Абакушина, Е.В.** Увеличение уровня стресс-индуцированных молекул МІСА и цитокинов в сыворотке крови больных раком желудка и толстой кишки / **Е.В. Абакушина**, Д.Н. Абакушин, Г.С. Неприна, И.А. Пасова, А.В. Клинова, Е.И. Коваленко // Злокачественные опухоли. – 2014. – Т.10. – №3. – С. 291-292.
42. **Абакушина, Е.В.** Субпопуляционный состав лимфоцитов и маркеры активации у онкологических больных / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, Д.В. Кудрявцев, И.А. Пасова, Н.В. Селиванова // Злокачественные опухоли. – 2014. – Т.10. – №3. – С. 292-293.
43. **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.
44. **Абакушина, Е.В.** Иммунорецепторы при иммунотерапии онкологических заболеваний / **Е.В. Абакушина**, И.Г. Козлов, А.Д. Каприн// Материалы научно-практической конференции "Новые технологии в онкологии". – Самара. – 2014. – 4 декабря. – С. 5-6.
45. **Абакушина, Е.В.** Субпопуляционный состав цитотоксических лимфоцитов и иммунорегуляторные молекулы в крови больных раком желудка и кишечника / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, И.А. Пасова, Д.Н. Абакушин, А.В. Клинова, Е.И. Коваленко // Материалы научно-практической конференции "Новые технологии в онкологии". – Самара. – 2014. – 4 декабря. – С. 7-8.

46. **Абакушина, Е.В.** Противоопухолевый иммунный ответ и фотодинамическая терапия / **Е.В. Абакушина**, Ю.С. Романко, М.А. Каплан, А.Д. Каприн // Радиация и риск. – 2014. – Т.23. – №4. – С. 92-98.
47. **Абакушина, Е.В.** Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов у онкологических больных при комбинированном лечении с включением адоптивной иммунотерапии / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, Д.В. Кудрявцев, И.А. Пасова, Н.В. Селиванова // **Сибирский онкологический журнал**. – 2015. – №1. – С. 45-50.
48. **Абакушина, Е.В.** Уровень иммунорегуляторных молекул в сыворотке крови больных меланомой кожи / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Н.В. Селиванова, Д.В. Кудрявцев, А.Д. Каприн // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т.14. – №1. – С. 57.
49. **Абакушина, Е.В.** Фенотип лимфоцитов больных почечно-клеточным раком на этапах проведения адоптивной иммунотерапии активированными НК-клетками / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, А.М. Попов, О.Б. Карякин, С.А. Иванов, А.Д. Каприн // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т.14. – №1. – С. 57.
50. Пасова, И.А. Влияние иммунотерапии на изменение экспрессии рецепторов NKG2D и их лигандов в сыворотке крови больных меланомой / И.А. Пасова, **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Н.В. Селиванова, Д.В. Кудрявцев, А.Д. Каприн // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т.14. – №1. – С. 119.
51. **Абакушина, Е.В.** Изменение фенотипа лимфоцитов периферической крови после проведения адоптивной иммунотерапии больным раком желудка и толстой кишки / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, И.А. Пасова, Б.А. Бердов, А.Д. Каприн // Медицина Кузбасса. – 2015. – №1. – С. 44.
52. **Абакушина, Е.В.** Повышение уровня цитокинов и стресс-индуцированных молекул МІСА в сыворотке крови больных раком желудка и толстой кишки / **Е.В. Абакушина**, Д.Н. Абакушин, Г.С. Неприна, И.А. Пасова, Б.А. Бердов, А.В. Клинкова, Е.И. Коваленко, А.Д. Каприн // **Цитокины и воспаление**. – 2015. – Т.14. – №1. – С. 63-67.
53. **Абакушина, Е.В.** Критерии отбора пациентов больных меланомой для иммунотерапии активированными лимфоцитами на основе исходного уровня стресс-индуцированных молекул МІСА / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, И.А. Пасова, И.Г. Козлов, А.Д. Каприн // Медицинская иммунология. – 2015. – Т.17. – №S. – С. 228.
54. Абакушина, Е.В. Уровень цитокинов IFN- γ и TNF- α в сыворотке крови онкологических больных / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, И.А. Пасова, Б.А. Бердов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – Т.60. – №9. – С. 119.
55. Маризина, Ю.В. Повышение уровня молекул МІСА и НК-клеток в крови больных меланомой свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе / Ю.В. Маризина, **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова // Межрегиональный сборник трудов конференции "Повышение эффективно-

- сти комплексного лечения больных злокачественными новообразованиями". - Под ред. С.Л. Гуло, В.И. Соловьева, Е.Н. Семкиной. – Смоленск. – 2015. – С. 58.
56. **Абакушина, Е.В.** Ультразвуковая оценка эффективности сопроводительной иммунотерапии больной меланомой (клинический случай) / **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова, Ю.В. Маризина, З.П. Шепель, Е.С. Фомина, Г.С. Неприна, Г.Т. Кудрявцева // Материалы конгресса российской ассоциации радиологов. – Москва. – 2015. – 5-7 ноября. – С. 107-108.
57. Пасова, И.А. Лучевая диагностика в оценке эффективности иммунотерапии активированными лимфоцитами у онкологических больных / И.А. Пасова, **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Н.К. Силантьева, З.П. Шепель, Д.В. Кудрявцев, Н.В. Селиванова, Е.С. Фомина, Г.Т. Кудрявцева // Материалы конгресса российской ассоциации радиологов. - Москва. – 2015. – 5-7 ноября. – С. 262-263.
58. Анохин, Ю.Н. Лиганды рецептора NKG2D - молекулы MICA как потенциальные мишени для радиоиммунотерапии рака / Ю.Н. Анохин, **Е.В. Абакушина**, А.В. Клинова, Е.И. Коваленко, А.Д. Каприн // Материалы конгресса российской ассоциации радиологов. - Москва. – 2015. – 5-7 ноября. – С. 115-116.
59. **Абакушина, Е.В.** Мониторинг иммунорегуляторных молекул на фоне адоптивной иммунотерапии активированными НК-клетками больных почечно-клеточным раком (клинический случай) / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, И.А. Пасова, А.М. Попов, О.Б. Карякин, А.Д. Каприн // Злокачественные опухоли. – 2015. – №4. – S2. – С. 114-115.
60. Маризина, Ю.В. NKG2D иммунорецептор и его лиганды в периферической крови больных меланомой и раком кишечника / Ю.В. Маризина, **Е.В. Абакушина**, Г.С. Неприна, И.А. Пасова // Злокачественные опухоли. – 2015. – №4. – S2. – С. 313.
61. Маризина, Ю.В. Разработка метода биотерапии онкологических заболеваний на основе активированных лимфоцитов / Ю.В. Маризина, **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова // Материалы конференции молодых ученых, посвященной памяти А.Ф. Цыба «Перспективные направления в онкологии и радиологии». – Обнинск. – 2015. – 20 ноября. – С. 130-131.
62. Пасова, И.А. Эффективность сопроводительной иммунотерапии активированными лимфоцитами больной раком / И.А. Пасова, Ю.В. Маризина, **Е.В. Абакушина**, Л.В. Евдокимов, Т.А. Агабабян, Н.К. Силантьева, Б.А. Бердов // Материалы II национального конгресса по регенеративной медицине. – Москва. – 2015. – 3-5 декабря. – С. 130-131.
63. **Абакушина, Е.В.** Эффективность совместного применения IL-2 и IL-15 для активации цитотоксических лимфоцитов *in vitro* / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна // **Гены и клетки**. – 2015. – Т.10. – №2. – С. 78-85.
64. **Абакушина, Е.В.** Метод проточной цитометрии для оценки НК-клеток и их активности / **Е.В. Абакушина** // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2015. – Т.60. – №11. – С. 37-44.

65. **Абакушина, Е.В.** Стресс-индуцированные молекулы МІСА в сыворотке крови онкологических больных / **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова, Ю.В. Маризина // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – Т.2. – №4. – С. 56.
66. **Абакушина, Е.В.** Эффективность иммунотерапии цитокин-индуцированными киллерами больных меланомой / **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова, Ю.В. Маризина, Д.В. Кудрявцев, Г.Т. Кудрявцева, А.Д. Каприн // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т.15. – №1. – С. 3-4.
67. Клинкова, А.В. Циркулирующий белок МІСА у больных злокачественными лимфомами / А.В. Клинкова, Е.Г. Кузьмина, **Е.В. Абакушина**, Л.М. Каневский, Г.С. Неприна, В.В. Павлов, Е.И. Коваленко // **Медицинская иммунология**. – 2016. – Т.18. – №2. – С.151-162.
68. Абакушин, Д.Н. Влияние адоптивной клеточной иммунотерапии на уровень цитокинов в сыворотке крови онкологических больных / Д.Н. Абакушин, И.А. Пасова, **Е.В. Абакушина** // Клинико-лабораторный консилиум. 2016. – №1 (52). – С. 62-63.
69. **Абакушина, Е.В.** Количество растворимых лигандов активирующего рецептора NKG2D и его экспрессия на лимфоцитах онкологических больных / **Е.В. Абакушина**, Г.С. Неприна, И.Г. Козлов // Клинико-лабораторный консилиум. 2016. – №1 (52). – С. 63-64.
70. **Абакушина, Е.В.** Биотехнологические подходы к созданию отечественных препаратов для радиоиммунотерапии опухолей / **Е.В. Абакушина**, Ю.Н. Анохин // Клинико-лабораторный консилиум. 2016. – №1 (52). – С. 64.
71. **Абакушина, Е.В.** Роль лигандов NKG2D иммунорецептора в развитии онкологических заболеваний / **Е.В. Абакушина**, Г.С. Неприна, И.Г. Козлов // **Российский иммунологический журнал**. - 2016. – Т.10 (19). – №2 (1). – С. 152-154.
72. **Абакушина, Е.В.** Адоптивная иммунотерапия активированными цитотоксическими лимфоцитами больных меланомой / **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова, Д.В. Кудрявцев, Е.С. Фомина, Г.Т. Кудрявцева, А.Д. Каприн // **Российский иммунологический журнал**. – 2016. – Т.10 (19). – №2 (1). – С. 564-566.
73. Пасова, И.А. Результаты комбинированного лечения больных меланомой с применением адоптивной иммунотерапии / И.А. Пасова, **Е.В. Абакушина**, Д.В. Кудрявцев, Г.Т. Кудрявцева, Е.С. Фомина, А.Д. Каприн // Евразийский онкологический журнал. – 2016. – Т.4. – №2. – С. 721.
74. **Абакушина, Е.В.** Уровень стресс-индуцированных молекул МІСА как критерий отбора больных меланомой для иммунотерапии активированными лимфоцитами / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, И.А. Пасова, Г.С. Неприна, И.Г. Козлов, А.Д. Каприн // Евразийский онкологический журнал. – 2016. – Т.4. – №2. – С. 742.
75. **Абакушина, Е.В.** Результаты проведения иммунотерапии цитокин-индуцированными киллерами у больных меланомой / **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова, Ю.В. Маризина, Д.В.

- Кудрявцев, Г.Т. Кудрявцева, А.Д. Каприн // Евразийский онкологический журнал. – 2016. – Т.4. – №2. – С. 743.
76. Пасова, И.А. Место адоптивной иммунотерапии активированными лимфоцитами в комбинированной терапии меланомы / И.А. Пасова, **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Маризина, А.Д. Каприн // **Российский иммунологический журнал**. – 2016. – Т.10 (19). – №2 (1). – С. 566-568.
77. **Абакушина, Е.В.** Морфо-функциональная характеристика лимфоцитов человека после активации *in vitro* / **Абакушина Е.В.**, Маризина Ю.В., Каприн А.Д. // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2016. – Т.161. – №5. – С. 678-683.
78. **Абакушина, Е.В.** Иммунотерапия с использованием естественных киллеров в лечении онкологических заболеваний / **Е.В. Абакушина**, И.Г. Козлов // **Российский иммунологический журнал**. – 2016. – Т.10 (19). – №2 (1). – С. 131-142.
79. Анохин, Ю.Н. Опухолеспецифический иммунный ответ после фотодинамической терапии / Ю.Н. Анохин, **Е.В. Абакушина** // **Медицинская иммунология**. – 2016. – Т. 18. – № 5. – С. 405-416.
80. Anokhin, Yu.N. Prospects for use in radio immunotherapy in oncology / Yu.N. Anokhin, **E.V. Abakushina**, A.D. Kaprin // In book of abstract The First International Symposium «Physics, Engineering and Technologies for Bio-Medicine» – Moscow. – 2016. – October 20-23, – p.34.
81. **Abakushina, E.V.** Molecules MICA as potential target for radioimmunotherapy of cancer / **E.V. Abakushina**, Yu.N. Anokhin, A.D. Kaprin // In book of abstract The First International Symposium «Physics, Engineering and Technologies for Bio-Medicine» - Moscow. – 2016. – October 20-23, – p.39.
82. **Абакушина, Е.В.** Клиническая эффективность сопроводительной иммунотерапии активированными лимфоцитами больной меланомой (случай из практики) / **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова, Ю.В. Маризина, Д.В. Кудрявцев, Г.Т. Кудрявцева, Е.С. Фомина // **Сибирский онкологический журнал**. – 2016. – №5. – С. 89-94.
83. **Абакушина, Е.В.** Ингибирование экспрессии активирующего рецептора NKG2D на НК-клетках рекомбинантным белком MICA / **Е.В. Абакушина**, Е.Ю. Лысюк, А.В. Посвятенко, А.В. Кибардин // **Медицинская иммунология**. – 2017. – Т.19, – №1. – С. 81-88.
84. **Abakushina, E.V.** Stress-induced molecules MICA as potential target for radioimmunotherapy of cancer / **E.V. Abakushina**, Yu.N. Anokhin, D.N. Abakushin, A.D. Kaprin // **Journal of Physics: Conf Series**. – 2017. – 784(1): 012001.
85. Спелков, А.А. Распределение аллелей MICA в российской популяции / А.А. Спелков, **Е.В. Абакушина**, Е.И. Коваленко, Е.Г. Кузьмина, Т.Ю. Мушкарина, М.А. Стрельцова, Л.М. Каневский // В книге: Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. Полиграфический участок ИБХ РАН. – 2017. – С. 97.

86. **Абакушина, Е.В.** Адоптивная иммунотерапия активированными лимфоцитами в комплексной терапии больных раком желудочно-кишечного тракта / **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова, Т.П. Почуев, Л.В. Евдокимов, Б.А. Бердов, А.Д. Каприн // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т.16. – №S1. – С. 3.
87. **Абакушина, Е.В.** Информативность выявления молекул MICA в сыворотке крови при онкологических заболеваниях / **Е.В. Абакушина**, Д.Н. Абакушин // Материалы IX всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017». – Москва. – 2017. – 18-20 апреля. – Т.1. – С. 136-137.
88. **Абакушина, Е.В.** Уровень лигандов рецептора NKG2D стресс-индуцированных молекул ULBP в сыворотке крови онкологических больных / **Е.В. Абакушина**, Д.Н. Абакушин, Ю.В. Гельм, А.Д. Каприн // Материалы IX всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017». – Москва. – 2017. – 18-20 апреля. – Т.1. – С. 166-167.
89. **Абакушина, Е.В.** Взаимосвязь между экспрессией рецептора NKG2D на лимфоцитах и его лигандами в периферической крови больных раком желудка и кишечника / **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова, Г.С. Неприна, А.Д. Каприн // Медицинская иммунология. – 2017. – Т.19. – №S. – С. 155-156.
90. **Абакушина, Е.В.** Опыт проведения адоптивной иммунотерапии активированными цитотоксическими лимфоцитами у онкологических больных / **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова, И.Г. Козлов, А.Д. Каприн // Медицинская иммунология. – 2017. – Т.19. – №S. – С. 156-157.
91. Лысюк, Е.Ю. Ингибирование экспрессии активирующего рецептора NK-клеток NKG2D рекомбинантным белком MICA / Е.Ю. Лысюк, Е.А. Шуленина, А.В. Посвятенко, А.В. Кибардин, **Е.В. Абакушина** // Медицинская иммунология. – 2017. – Т.19. – №S. – С. 274-275.
92. Гельм, Ю.В. Оценка функциональной активности лимфоцитов онкологических больных с целью использования для клеточной иммунотерапии / Ю.В. Гельм, И.А. Пасова, Е.В. Абакушина // Клинико-лабораторный консилиум. – 2017. – №1 (53). – С. 40-41.
93. Гельм, Ю.В. Оценка функциональной активности цитотоксических лимфоцитов у больных меланомой при культивировании *in vitro* / Ю.В. Гельм, **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова // Материалы всероссийской конференции онкологов забайкальского края, посвященной 70-летию работы онкологической службы забайкальского края, Чита, 21-22 сентября 2017г. – С. 45-47.
94. **Абакушина, Е.В.** Применение в онкологии технологии клеточной иммунотерапии с помощью цитокин-индуцированных клеток киллеров / Ю.В. Гельм, **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова, Г.С. Неприна, Д.В. Кудрявцев, А.Д. Каприн // Научно-практическая ревматология. – 2017. – Т.55. – №5(2). – С. 4.

95. Gelm, Yu. Methodological approaches for the NK cells immunotherapy of cancer / Yu. Gelm, I. Pasova, Yu. Anokhin, **E. Abakushina** // In book of abstracts 2nd International Symposium on «Physics, Engineering and Technologies for BioMedicine», October 10-14, 2017, Moscow, Russia. – pp. 124-125.
96. **Абакушина, Е.В.** Разработка метода клеточной иммунотерапии цитокин-индуцированными клетками киллерами в онкологии / **Е.В. Абакушина**, Ю.В. Гельм, И.А. Пасова, Г.С. Неприна, Д.В. Кудрявцев, А.Д. Каприн // Гены и клетки. – 2017. – Т.12. – №3. – С. 69.
97. Гельм, Ю.В. Содержание молекул MICA, ULBP1 и ULBP2 в сыворотке крови больных меланомой на фоне адоптивной иммунотерапии / Ю.В. Гельм, **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова, Д.В. Кудрявцев, Ю.В. Гуменецкая, А.Д. Каприн // Злокачественные опухоли. – 2017. – Т.7. – №3 (s.1). – С. 152-153.
98. Гельм, Ю.В. Уровень цитокинов при активации лимфоцитов *ex vivo* для клеточной иммунотерапии / Ю.В. Гельм, **Е.В. Абакушина** // Успехи молекулярной онкологии. – 2017. – Т.4. – №4. – С. 135.
99. Шуленина, Е.А. Перспективы использования NK клеток и NKG2D-позитивных лимфоцитов как мишень для терапии болезни Крона / Е.А. Шуленина, **Е.В. Абакушина**, Е.Ю. Лысюк // Медицинская иммунология. – 2017. – Т.19. – №4. – С. 461-470.
100. Гельм, Ю.В. Клиническая эффективность клеточной иммунотерапии в лечении онкологических больных / Ю.В. Гельм, **Е.В. Абакушина**, И.А. Пасова // Проблемы медицинской микологии. – 2018. – Т.20. – № 2. – С. 61.
101. Каприн, А.Д. Адоптивная иммунотерапия онкологических больных активированными цитотоксическими лимфоцитами (новая медицинская технология) / Каприн А.Д., **Абакушина Е.В.**, Пасова И.А., Гельм Ю.В., Иваненко К.В., Попов С.В., Круглов Д.П., Шегай П.В., Иванов С.А., Костин А.А., Неприна Г.С. // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. – 2018. – 2 илл. – 19 с. (ISBN 978-5-85502-235-3).
102. **Абакушина Е.В.**, Маризина Ю.В., Пасова И.А., Неприна Г.С., Каприн А.Д. «Способ лечения онкологических больных цитотоксическими лимфоцитами» // **Патент на изобретение** RUS № 2596505, зарегистрирован в государственном реестре изобретений 02.07.2015. Опубликовано: 10.09.16 г. Бюл. №25.
103. Каприн А.Д., **Абакушина Е.В.**, Маризина Ю.В., Неприна Г.С. «Способ активации цитотоксических лимфоцитов человека» // **Патент на изобретение** RUS № 2603079. Зарегистрирован в государственном реестре изобретений 16.03.2015. Опубликовано: 20.11.2016 г. Бюл. №32.

Список сокращений

АИТ – адоптивная клеточная иммунотерапия
ВДП – время до прогрессирования
КРР – колоректальный рак
ЛАК-клетки – лимфокин-активированные клетки киллеры
ЛТ – лучевая терапия
МНК – моноклеарные клетки
ОЖКТ – опухоли желудочно-кишечного тракта
ОЭ – объективный эффект
ПБ – прогрессия болезни
ПКР – почечно-клеточный рак
ППС – полная питательная среда
РЛ – рак легкого
РМЖ – рак молочной железы
РП – рак пищевода
СБ – стабилизация болезни
ФДТ – фотодинамическая терапия
ХТ – химиотерапия
ЦИК-клетки – цитокин-индуцированные клетки киллеры
ЧО – частичный ответ
CD – cluster of differentiation
CTL – цитотоксические Т-лимфоциты
НК-клетки – natural killer cells – клетки естественные киллеры
NKG2D – активирующий рецептор НК-клеток
НКТ-клетки – natural killer T-cells – естественные киллерные Т-клетки
MICA/B – major histocompatibility complex class I chain-related protein A or B
sMICA – soluble MICA – сывороточный MICA
ULBP-1/-2 – UL16-binding protein family member 1/2