

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ЧИТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



На правах рукописи

Четверяков Андрей Валерьевич

**МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ОПУХОЛЕВОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ В
ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ**

3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Цепелев Виктор Львович

Чита – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. РОЛЬ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК, РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ CD25 И ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА- β 1 (TGF- β 1) В ФОРМИРОВАНИИ ОПУХОЛЕВОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ У БОЛЬНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ). 13	
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1 Дизайн исследования и характеристика обследуемых групп	33
2.2 Инструментальные методы исследования	35
2.3 Гистологический метод исследования	36
2.4 Лабораторные методы исследования	37
2.4.1 Исследование уровня иммунных контрольных точек, трансформирующего фактора роста- β 1, субъединицы альфа рецептора интерлейкина-2 (sCD25)	37
2.4.2 Определение количественного состава популяций Т-лимфоцитов.....	38
2.5 Статистические методы обработки данных.....	38
ГЛАВА 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ОПУХОЛЕВОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ	40
3.1 Уровень иммунных контрольных точек и их лигандов в сыворотке крови и ткани опухоли.....	40
3.1.1 Цитотоксический Т-лимфоцитарно-ассоциированный белок (CTLA-4) и его лиганд (B7-2).....	40
3.1.2 Белок-3, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и домен муцина (TIM-3), и его лиганд (Galectin-9)	46
3.1.3 Белок запрограммированной клеточной гибели (PD-1) и его лиганд PD-L1	51
3.1.4 Ген активации лимфоцитов-3 (LAG-3)	53

3.1.5 Белок-9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (4-1BB).....	55
3.2 Уровень субъединицы альфа рецептора интерлейкина-2 (CD25).	57
3.3 Уровень трансформирующего фактора роста- β 1 (TGF- β 1) в сыворотке крови и ткани опухоли.....	59
ГЛАВА 4. ИЗМЕНЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА СУБПОПУЛЯЦИЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ОПУХОЛЬЮ ТОЛСТОЙ КИШКИ.....	62
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	69
ВЫВОДЫ	83
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	85
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	86
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	87
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	89

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

По данным GCO (Global Cancer Observatory), колоректальный рак (КРР) занимает третье место в структуре заболеваемости онкологических больных. Прогноз для пациентов с КРР неблагоприятный, общая выживаемость составляет 25-30 месяцев [47]. Оперативное лечение первичной опухоли, а также применение лекарственной и лучевой терапии в послеоперационном периоде не могут обеспечить абсолютное выздоровление пациента. Постоянно сохраняется риск появления отдаленных метастатических очагов. В настоящее время для продления периода ремиссии заболевания ведется активное изучение механизмов онкорезистентности организма, которые включают неиммунный и иммунный компонент и обеспечивают уничтожение уже возникших опухолевых клеток [131]. Особую роль играет адаптивный клеточный иммунный ответ, реализуемый цитотоксическими Т-лимфоцитами ($CD3^+CD8^+$). Однако злокачественные клетки способны ингибировать активность вышеуказанных клеток путем взаимодействия с особыми молекулами на их поверхности [2]. Одной из таких молекул является белок CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) [44]. В течение последних двух десятилетий были выявлены мембранные белки, которые регулируют активацию иммунных процессов, предотвращают повреждение собственных клеток и тканей активированными иммунными клетками или, наоборот, стимулируют и поддерживают иммунный ответ против патогена. Эти молекулы получили название иммунные контрольные точки (ИКТ, immune control points) [79]. Все ИКТ разделяют на две группы: стимулирующие и ингибирующие иммунный ответ. Детальное изучение этих молекулярных структур позволило открыть механизм развития опухолевой иммуносупрессии, который используется опухолевыми клетками в процессе «ускользания» от иммунного надзора [2, 24]. Экспрессия лигандов иммунных контрольных точек на поверхности злокачественной опухоли опосредует запуск процессов ингибирования

деятельности Т-лимфоцитов, что приводит к прогрессированию опухоли и её метастазированию [62]. Канцерогенез имеет общие аспекты независимо от пораженного органа. Однако у каждой локализации, при которой развивается рак, существуют характерные особенности – специфические механизмы развития опухолевой иммуносупрессии, через которые осуществляется процесс «ускользания» от иммунного надзора. При раке молочной железы, меланоме, лимфоме и раке шейки матки эти механизмы установлены [1, 79, 139]. Также разработана таргетная терапия, основанная на моноклональных антителах, которые блокируют взаимодействие иммунной контрольной точки и ее лиганда и препятствуют ингибированию Т-клеточного иммунного ответа. Применение этих препаратов показало свою эффективность (уменьшение размеров первичного очага, увеличение времени ремиссии), и они были включены в линии лекарственной терапии. При колоректальном раке данных о роли ИКТ в патогенезе развития опухолевой иммуносупрессии недостаточно, часть из них противоречива [76, 139, 150]. Таким образом, выполнение исследования концентрации иммунных контрольных точек у пациентов с опухолями толстой кишки, определение количественного состава различных популяций Т-лимфоцитов на фоне изменения уровня ИКТ, установление корреляционных связей между количеством Т-клеток и концентрацией ИКТ в различных биологических средах является актуальным и позволит изучить аспекты развития опухолевой иммуносупрессии у пациентов с раком толстой кишки.

Степень разработанности темы исследования

В 1987 году на поверхности Т-лимфоцитов американским ученым Джеймсом Эллисоном был обнаружен белок CTLA-4, который ингибирует активность Т-клеточного иммунного ответа [51]. Позже в 1992 году японский иммунолог Тасуку Хондзё выявил еще один интегральный белок – PD-1, который также угнетает активность Т-лимфоцитов [98]. В 1996 году Джеймс Эллисон опубликовал фундаментальную работу о CTLA-4 и его предполагаемой роли в патогенезе роста и развития злокачественных опухолей [129]. В процессе исследований были установлены молекулы, регулирующие активность

иммунного ответа, которые получили название иммунные контрольные точки (ИКТ, immune control points). Было установлено, что ИКТ (CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3), отвечающие за ко-ингибирование иммунного ответа, используются опухолевыми клетками для подавления Т-лимфоцитов, что способствует росту и развитию опухоли [26, 39, 154]. В дальнейшем это послужило основанием для разработки терапевтических препаратов – моноклональных антител, которые блокируют взаимодействие ИКТ со своим лигандом и препятствуют ингибированию Т-лимфоцитов. В 2006 году в процессе исследований (CheckMate, KEYNOTE) была изучена эффективность применения моноклональных антител к CTLA-4 и PD-1 у пациентов с различными локализациями рака (меланома, рак желудка, молочной железы, почечно-клеточный рак, немелкоклеточный рак лёгкого) [74, 78, 84, 134]. Установлен положительный эффект в виде уменьшения размеров первичного очага, количества и размеров отдаленных метастазов, увеличения времени ремиссии заболевания [85, 136]. В 2011 году управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) одобрило применение моноклональных антител к CTLA-4 в качестве таргетного препарата в лечении меланомы [83]. На данный момент установлено, что иммунные контрольные точки играют роль в механизме развития опухолевой иммуносупрессии при различных локализациях [105, 121, 139]. Изучен уровень различных ИКТ в сыворотке крови и ткани опухоли у пациентов с меланомой, раком молочной железы, раком желудка, лимфомой. На основании этих данных выполнены экспериментальные исследования и клинические наблюдения, изучающие эффективность применения моноклональных антител к различным ИКТ (TIM-3, LAG-3, CTLA-4, PD-1) у пациентов с В-клеточной лимфомой, раком легкого, раком яичников, холангиокарциномой [121, 139]. Часть этих исследований продолжается до настоящего времени.

Однако данных о роли ИКТ в патогенезе развития опухолевой иммуносупрессии при новообразованиях толстой кишки недостаточно, и часть из них противоречива. К примеру, по данным института противоопухолевых

исследований (Нью-Джерси, США), которые были опубликованы в 2021 году, высказывается предположение, что рецептор TIM-3 снижает функцию Т-клеток в микроокружении опухоли при КРР, что возможно является патогенетическим звеном прогрессирования рака. В другом исследовании отрицается ключевая роль PD-1/PD-L1 в патогенезе рака толстой кишки, так как применение моноклональных антител к PD-1/PD-L1 у пациентов с КРР не показало ожидаемой эффективности и остаётся спорным [43]. Данных о концентрации белка CTLA-4 в сыворотке или ткани новообразования и его роли в канцерогенезе у пациентов с КРР нами обнаружены не были [40, 57].

Резюмируя вышеизложенное, сформулирована **цель исследования:** установить патогенетическое значение иммунных контрольных точек, растворимой формы CD25 и трансформирующего фактора роста- β 1 в формировании опухолевой иммуносупрессии при раке толстой кишки.

Задачи исследования:

1. Определить концентрацию ко-ингибирующих молекул (CTLA-4, TIM-3, PD-1, LAG-3) и их лигандов (B7-2, Galectin-9, PD-L1), ко-стимулирующей молекулы 4-1BB в ткани опухоли, а также установить наиболее патогенетически значимые молекулы в формировании опухолевой иммуносупрессии у больных со злокачественными новообразованиями толстой кишки.
2. Оценить уровень иммунных контрольных точек и их лигандов в сыворотке крови у пациентов с опухолями толстой кишки.
3. Определить уровень растворимой формы CD25 (sCD25) и трансформирующего фактора роста β 1 (TGF- β 1) в ткани опухоли и сыворотке крови у пациентов с новообразованиями толстой кишки.
4. Выявить изменения количественного состава популяций Т-лимфоцитов в крови у больных раком толстой кишки и установить их зависимость от уровня иммунных контрольных точек, sCD25 и TGF- β 1.
5. Исследовать количественный состав субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов в крови у больных с колоректальным раком и определить их взаимосвязь с уровнем иммунных контрольных точек, sCD25 и TGF- β 1.

Научная новизна

В результате исследования выявлены новые механизмы опухолевой иммуносупрессии, в основе которых лежит увеличение концентрации белка TIM-3 и его лиганда Galectin-9 в ткани опухоли и сыворотке крови у больных раком толстой кишки. Установлено, что высокий уровень белка LAG-3 в ткани опухоли и сыворотке крови является дополнительным фактором развития опухолевой иммуносупрессии у пациентов с колоректальным раком.

Установлено, что увеличение концентрации иммунных контрольных точек TIM-3 и LAG-3 в опухолевой ткани и сыворотке крови у больных раком толстой кишки сопровождается угнетением адаптивного иммунитета, что выражается в уменьшении количества Т-клеток (CD3⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) в крови.

Впервые показано, что основным патогенетическим механизмом действия молекул TIM-3 и LAG-3 при колоректальном раке является снижение количества субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов со следующими фенотипами: CD3⁺CD8⁺CD57⁺ и CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD45RO⁺CD62L⁺CCR7⁺.

Теоретическая и практическая значимость работы

Научная значимость полученных данных заключается в выявлении новых аспектов патогенеза опухолевой иммуносупрессии при раке толстой кишки. Установлено, что высокая концентрация белков TIM-3 и LAG-3 в ткани опухоли и сыворотке крови сопровождается снижением адаптивного иммунитета.

Практическая значимость работы состоит в определении пороговых значений для белка TIM-3 и его лиганда Galectin-9, а также молекулы sCD25 в сыворотке крови для ранней диагностики онкологической патологии толстой кишки. Установлены параметры для уровня белка CTLA-4 и его лиганда B7-2 в сыворотке крови, которые имеют значимость в скрининге онкологической патологии толстой кишки. На основании полученных данных разработана компьютерная программа для использования в клинической практике (Свидетельство о государственной регистрации программы ЭВМ № 2022613721).

Методология и методы исследования

Дизайн работы представлен в виде одномоментного контролируемого открытого исследования пациентов с колоректальным раком, доброкачественной опухолью толстой кишки и контрольной группы. В исследовании применялись следующие методы: метод опроса, метод инструментального обследования и выполнения биопсии опухолевого образования, гистологический метод определения типа опухоли, определение уровня исследуемых молекул в сыворотке крови и ткани опухоли, а также количественного состава Т-лимфоцитов методом проточной цитофлуометрии. Полученные результаты обработаны в соответствии с принципами Международного комитета редакторов медицинских журналов (ICMJE) и рекомендациями «Статистический анализ и методы в публикуемой литературе» (SAMPL). Объект исследования – пациент с опухолью толстой кишки. Предмет исследования – оценка уровня иммунных контрольных точек в ткани опухоли и сыворотке крови у пациентов с новообразованиями толстой кишки; определение количественного состава Т-лимфоцитов и их основных субпопуляций в крови; выявление корреляционных взаимосвязей между количеством Т-лимфоцитов и уровнем иммунных контрольных точек.

Личный вклад автора в выполнение исследования

Автором самостоятельно выполнен обзор отечественной и зарубежной литературы, соответствующей направлению исследования. Совместно с научным руководителем сформулирована концепция исследования, выбрана тема исследования, поставлены цель, задачи, определены клинические и лабораторные методы исследования. Тема диссертационного исследования утверждена научно-методической комиссией, план работ одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО ЧГМА (протокол № 98 от 27.11.2019). Автором самостоятельно выполнено: клиническое исследование пациентов, оперативное пособие, во время которого получена ткань опухоли и ткань лимфатических узлов, забор венозной крови, статистическая обработка результатов исследования. Автором самостоятельно проведена систематизация данных, анализ, обобщение полученных результатов.

На основании полученных данных совместно с научным руководителем сформулированы научные положения работы и выводы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Центральным патогенетическим звеном формирования опухолевой иммуносупрессии при колоректальном раке является белок TIM-3 и его лиганд Galectin-9, а также ко-ингибирующая молекула LAG-3.

2. Увеличение концентрации иммунных контрольных точек (TIM-3 и LAG-3) в опухолевой ткани и сыворотке крови у больных раком толстой кишки сопровождается угнетением адаптивного иммунитета.

3. Основным патогенетическим механизмом действия молекул TIM-3 и LAG-3 при колоректальном раке является снижение количества субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов со следующими фенотипами: $CD3^+CD8^+CD57^+$ и $CD3^+CD8^+CD45RA^-CD45RO^+CD62L^+CCR7^+$.

Степень достоверности

Достоверность результатов диссертации основывается на обследовании 94 человек, из них 44 пациента с диагнозом рак толстой кишки, 25 больных с доброкачественной опухолью толстой кишки и 25 пациентов составили контрольную группу, о чем свидетельствуют записи в медицинских картах стационарных больных, представленных на проверку первичной документации. Диагнозы рак толстой кишки и доброкачественная опухоль толстой кишки установлены при выполнении фиброколоноскопии. Гистологический вариант опухоли подтвержден патологоанатомическим исследованием и официальным гистологическим заключением. Номинальные данные описывали с указанием абсолютных и относительных значений. Сравнение номинальных данных исследования проводили при помощи критерия χ^2 Пирсона, позволяющего оценить значимость различий между фактическим количеством исходов или качественных характеристик выборки, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы. При минимальном значении ожидаемого явления менее 10,0 использовали χ^2 Йейтса на непрерывность. Нормальность

распределения количественных признаков при численности исследуемых групп менее 50 человек оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Учитывая распределение признаков, отличное от нормального во всех исследуемых группах, полученные данные представляли в виде медианы, первого и третьего квартилей: Me [Q₁; Q₃]. Ранговый анализ вариаций по Краскелу-Уоллису (H) выполняли для сравнения трех независимых групп по одному количественному признаку. Затем, при наличии статистически значимых различий, с учетом поправки Бонферрони, проводили попарное сравнение с помощью критерия Манна-Уитни (U). Для определения корреляционных связей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент Спирмена. Диагностическая модель была построена путем бинарной логистической регрессии. Для установления ценности указанной модели использовался ROC-анализ, что позволило оценить чувствительность, специфичность и точность модели. Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0 (International Business Machines Corporation, США).

Апробация диссертации

Результаты исследования представлены на Форуме онкологов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, 10-11 июня 2022 г.); Международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы патофизиологии" (Чита, 11 ноября 2022 г.); VII Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 21-23 декабря 2022 г.); V Юбилейном международном форуме онкологии и радиотерапии (г. Москва, 19-23 сентября 2022 г.).

Внедрение результатов в практику

Результаты работы внедрены в практическую работу поликлиники ГУЗ «Забайкальский краевой онкологический диспансер» (г. Чита). Материалы диссертационной работы используются при чтении лекций и проведении практических занятий на кафедре патологической физиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России.

Апробация результатов

Основные результаты диссертации опубликованы в виде 16 печатных работ, в том числе 10 представлены в научных изданиях, входящих в список, определенный Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертационных работ на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, одна публикация представлена в научном рецензируемом журнале, входящем в список международных реферативных баз данных и систем цитирования (Scopus Q4).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, двух глав собственных исследований, главы обсуждения, выводов, списка литературы, включающего 167 источников (18 отечественных и 149 иностранных), списка условных сокращений. Текст работы иллюстрирован 19 таблицами и 7 рисунками.

ГЛАВА 1. РОЛЬ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК, РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ CD25 И ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА- β 1 (TGF- β 1) В ФОРМИРОВАНИИ ОПУХОЛЕВОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ У БОЛЬНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Иммунная система играет важную роль в обнаружении и уничтожении опухолевых клеток. Однако злокачественные клетки способны «ускользнуть» от иммунного ответа, изменяя свои характеристики или манипулируя клетками в своем окружении [34, 35]. Эти механизмы уклонения представляют особую область интереса и берут своё начало из концепции иммунного редактирования, положения которой начали высказываться в 1950-х годах [55]. Концепция, согласно которой иммунная система способна обнаруживать и уничтожать опухолевые клетки, была разработана независимо друг от друга учеными M. Brunet и L. Thomas [33, 152]. Первым серьезным толчком в раскрытии механизмов «ускользания» атипичных клеток от иммунного надзора стало открытие и описание различных типов Т- и В-лимфоцитов в 1960-х годах [108, 112]. Были определены ключевые роли В-клеток и Т-клеток в иммунном ответе. Выполнено детальное изучение поверхности В- и Т-лимфоцитов, что привело к обнаружению разнообразных поверхностных белков и дополнительных молекул, которые играют существенную роль в регулировании иммунного ответа [22, 139]. Позже был открыт и изучен мембранный белок CD28, который участвует в стимуляции и активации Т-клеток [66]. Исследования, связанные с изучением рецепторов, влияющих на активацию или угнетение иммунного ответа при различных патологических процессах, были продолжены учеными Brunet и Linsley в 1980-х годах [64]. В 1987 году группа американских ученых во главе с Джеймсом Эллисоном обнаружила на поверхности Т-лимфоцитов интегральный белок CTLA-4, а также его способность негативно влиять на активность клеток иммунной системы, в особенности на Т-клеточный иммунный ответ [75, 89].

Отрицательное регулирование CTLA-4 было доказано при изучении антигенпрезентирующих клеток (АПК) с высокой экспрессией лиганда В7, пула Т-лимфоцитов с высокой экспрессией CD28 и растворимой формы CTLA-4, которая препятствовала взаимодействию CD28 и В7, что опосредовало истощение Т-лимфоцитов. В 1992 году японский иммунолог Тасуку Хондзё при изучении Т-лимфоцитов выявил еще один интегральный белок – PD-1. Позже в 1999 году были опубликованы данные исследований японского ученого Н. Nishimura, которые подробно описывали функции PD-1 [55]. В 2018 году Джеймс Эллисон и Тасуку Хондзё были удостоены Нобелевской премии за вклад в развитие иммунологии. Эти открытия стали революцией в иммунологии и иммунотерапии злокачественных опухолей. Было введено новое понятие – иммунные контрольные точки (ИКТ, immune control points), которые включают в себя ряд ко-стимулирующих и ко-ингибирующих молекул, образующих многофункциональную систему регуляции иммунных процессов, направленную на предотвращение повреждения собственных тканей активированными клетками иммунитета [97]. Наибольший интерес вызывает тот факт, что ИКТ активно участвуют в «ускользании» опухолевых клеток от иммунного надзора [79]. Поэтому был пересмотрен и дополнен процесс иммунного редактирования, который условно разделили на три фазы: элиминация (elimination), равновесие (equilibrium) и уклонение (escape). В фазу элиминации происходит разрушение опухолевых клеток врожденной иммунной системой и представление их антигенных структур АПК и Т-лимфоцитам. Фаза равновесия наступает, когда опухолевые клетки «выживают» после стадии элиминации, но не способны прогрессировать так как любая активность приведет к конфликту с иммунной системой. Стадия уклонения или ускользания наступает, когда количество опухолевых клеток начинает увеличиваться на фоне потери контроля иммунной системой. Раковые клетки экспрессируют на своей поверхности ряд рецепторов, которые способны взаимодействовать с ИКТ на поверхности Т-клеток, что приводит к ингибированию иммунного ответа [89]. В 1996 г. ученые Leach D.R., Krummel M.F., Allison J.P. сообщили, что применение моноклональных антител,

блокирующих CTLA-4, способствуют регрессии опухоли на мышинных моделях [89]. Эти препараты стали известны как ингибиторы иммунных контрольных точек (immune checkpoint inhibitors, ICIs). Вышеописанные лекарственные средства обладают мощным терапевтическим эффектом, однако число локализаций опухоли для применения этих препаратов ограничено. Также исследования последних лет не способны раскрыть все особенности канцерогенеза, основанного на ИКТ при различных локализациях, и требуют дальнейшего изучения. Особое внимание в изучении заслуживают нозологические единицы, занимающие ведущие места в структуре заболеваемости онкологических пациентов, такие как колоректальный рак, рак легкого и молочной железы [98].

Таким образом, изучение концентрации иммунных контрольных точек в ткани опухоли и сыворотке крови при раке толстой кишки является актуальным и позволит раскрыть механизмы развития опухолевой иммуносупрессии.

Цитотоксический Т-лимфоцитарно-ассоциированный белок (CTLA-4) и его лиганд (B7-2)

Цитотоксический Т-лимфоцитарно-ассоциированный белок (Cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4, CTLA-4, CD152) – это трансмембранный гликопротеин, который является одной из иммунных контрольных точек и экспрессируется преимущественно на поверхности CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток. Белок CTLA-4 состоит из 223 аминокислот, принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов, структура включает в себя внеклеточную часть, трансмембранный домен и цитоплазматический хвост. Лигандами к CTLA-4 являются B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86), которые экспрессируются преимущественно антигенпрезентирующими клетками (АПК, antigen-presenting cell), а также опухолевыми клетками. Лиганд B7-2 – мембранный белок, принадлежащий к семейству иммуноглобулинов, его можно обнаружить на АПК, дендритных клетках, макрофагах и активированных В-лимфоцитах [50, 51].

Белок CTLA-4 – это ингибирующая молекула, которая контролирует активность Т-клеточного иммунитета и является важнейшим регулятором иммунного ответа в целом. Конкурентное взаимодействие CTLA-4 со своими лигандами является важным и общепринятым механизмом в регулировании деятельности Т-клеток. Наряду с CTLA-4 существует молекула CD28, которая схожа по структуре с CTLA-4, но отвечает за стимуляцию и активацию Т-клеток. Белок CTLA-4 выигрывает у CD28 конкуренцию за взаимодействие с лигандами [50]. Это происходит из-за константы аффинности CTLA-4 и CD28 к B7-1 и B7-2. Молекула CTLA-4 связывается с молекулой CD80 и CD86 в 16 раз сильнее, чем CD28. Механизм ингибирующей иммунной регуляции осуществляется при взаимодействии CTLA-4 с лигандами B7-1 или B7-2, которые находятся на поверхности АПК или опухолевой клетки. Угнетение активности Т-клеточного иммунного ответа происходит благодаря сигналам, исходящим из цитоплазматического домена CTLA-4 [31]. Однако, несмотря на проведенные исследования, механизмы, которые индуцируются цитоплазматическим доменом, остаются до конца неизученными. Известно, что цитоплазматический домен CTLA-4 состоит из 36 аминокислот и имеет четыре основных функциональных мотива: лизин, тирозин-201, пролин и тирозин-29. Тирозиновые мотивы были изучены больше других. Оба мотива связываются с внутриклеточными белками Т-клеток, такими как фосфатидилинозитол-3-киназой (PI3K) и фосфатаза, имеющими домен SH2, и инициируют дальнейшее развитие сигнального каскада истощения Т-лимфоцитов [3, 4, 31].

Изучение свойств и функций CTLA-4 позволило рассмотреть эту молекулу как терапевтическую мишень в лечении рака. Джеймс Эллисон и его коллеги изучили применение моноклональных антител к CTLA-4 на мышинных моделях с трансплантированной фибросаркомой и раком толстой кишки [148]. Было установлено, что блокирование CTLA-4 способствует регрессии опухолевого очага. Однако, гетерогенность различных локализаций рака показала противоречивые результаты. После эффективного применения моноклональных антител к CTLA-4 на мышинных моделях было анонсировано несколько крупных

исследований эффективности блокирования CTLA-4 у пациентов с меланомой и раком молочной железы. Применение моноклональных антител к CTLA-4 оказалось эффективным в клинических испытаниях у пациентов с нерезектабельной формой меланомы III и IV стадий. Применение препарата опосредовало выраженный некроз опухолевого очага и уменьшение его размеров, также было отмечено увеличение общей выживаемости пациентов на 3 месяца. При изучении долгосрочных данных было отмечено, что у 22% больных общая выживаемость составила более 3 лет [87]. В 2011 году моноклональные антитела к CTLA-4 (ипилиумаб, ниволумаб) были одобрены управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств на территории США (U.S., Food and Drug Administration, FDA) и включены в линии иммунотерапевтического лечения пациентов с меланомой и раком молочной железы [109]. Ингибирование CTLA-4 усиливает ответ Т-клеток на связанные с опухолью антигены. Большое количество антигенов на поверхности опухолевых клеток способствует выраженному Т-клеточному ответу [148]. На мышинных моделях было отмечено истощение регуляторных Т-клеток и смещения баланса от иммуносупрессии к активации. Однако это явление требует дальнейшего изучения [87].

Особое внимание заслуживает уровень CTLA-4 в сыворотке крови и ткани новообразования при различных локализациях рака. Также важно, какая популяция Т-лимфоцитов активно экспрессирует данную молекулу. В исследовании Bagbudar S. (2022) детально изучен количественный состав Т-клеток (tumor infiltrating lymphocytes, TILs) в ткани опухоли у пациентов с меланомой, а также экспрессия CTLA-4 на этих Т-лимфоцитах. Результаты исследования показывают, что высокое количество TILs с выраженной экспрессией CTLA-4 имеет корреляционную связь с благоприятным исходом у пациентов, которые получали моноклональные антитела к CTLA-4 [122].

При исследовании белка CTLA-4 у больных раком молочной железы, особое внимание было уделено концентрации этой молекулы в сыворотке крови и ткани опухоли. Отмечалось увеличение уровня CTLA-4 в сыворотке крови в 7 раз в сравнении с контрольной группой. В ткани опухоли исследуемый белок также

превышал показатели группы контроля [50]. Ряд других исследований показал, что высокая концентрация CTLA-4 в ткани новообразования (рак молочной железы, меланома) ответственна за создание среды, которая способствует предотвращению элиминации клеток рака. При изучении уровня CTLA-4, PD-1 и TIM-3 в ткани опухоли при раке молочной железы именно значения CTLA-4 преобладали над остальными, поэтому было выдвинуто предположение, что сигнальный путь через белок CTLA-4 является основным в канцерогенезе при раке молочной железы [93, 129].

Белок CTLA-4 является важной ко-ингибирующей молекулой. Дальнейшее изучение экспрессии CTLA-4 на различных Т-лимфоцитах, а также сигнальных механизмов цитоплазматического домена внутри Т-лимфоцита позволит более эффективно воздействовать на эту «мишень».

Белок запрограммированной клеточной гибели (PD-1) и его лиганд PD-L1

Белок запрограммированной клеточной гибели (Programmed cell death-1, PD-1, CD279) – мембранный рецептор, который является ко-ингибирующей иммунной контрольной точкой [94]. Роль PD-1 заключается в регулировании Т-клеточного ответа путем угнетения эффекторных функций Т-лимфоцитов (цитотоксичность, секреция цитокинов) и их пролиферации. Мембранный белок PD-1 состоит из 268 аминокислот. Структура PD-1 представлена тремя доменами: внеклеточным иммуноглобулиноподобным доменом V-типа (extracellular), трансмембранным (helical) и внутриклеточным (cytoplasmic). Экспрессия PD-1 отмечается на В-клетках, моноцитах, естественных киллерах (natural killer cells, NKs), дендритных клетках (dendritic cells, DCs) и активированных CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитах [29]. Для реализации своих функций PD-1 взаимодействует со своими лигандами PD-L1 (Programmed cell death ligand 1, B7-H1, CD274) и PD-L2 (Programmed cell death ligand 2, B7-DC, CD273). Экспрессия PD-L1 отмечается на поверхности лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток. Лиганд PD-L2 экспрессируется только на макрофагах и дендритных клетках [142]. В 2002 году

была обнаружена экспрессия рецептора PD-L1 на поверхности опухолей. Это подтвердило вовлечение PD-1 в процесс «ускользания» злокачественных клеток от иммунного надзора [9, 146].

Взаимодействие PD-1 с лигандами PD-L1 и PD-L2 запускает процесс апоптоза CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов. Осуществление этого процесса происходит через тирозин-фосфатазу SHP 1 и 2 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase). Последняя ингибирует сигнальный путь PI3K (Phosphoinositide 3-kinases)/Akt, а также угнетает передачу сигналов Т-клеточного рецептора [3, 4, 128]. Кроме сигнального пути PI3K существует связь между сигнальным путём MAPK (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) и осью PD-1/PD-L1. Сигнальный путь MAPK регулирует пролиферацию, дифференцировку и гибель многих клеток, в том числе и Т-лимфоцитов. Включает в себя ряд других сигнальных путей: ERK (Extracellular signal-regulated kinase), ERK-5 (Extracellular signal-regulated kinase 5), JNK (C-Jun N-terminal kinase) и p-38 (Mitogen-activated protein kinases) [106]. В исследованиях T.S. Stutvoet показано, что ингибирование сигнального пути MAPK препятствует экспрессии эпидермального фактора роста (Epidermal Growth Factor, EGF) и IFN-гамма-индуцированной мРНК гена CD274, а также самого белка PD-L1 [101]. Кроме этого, в исследованиях Jalali S. отмечена связь между блокированием PD-L1 и низкой экспрессией белков, относящихся к сигнальному каскаду MAPK в клетках лимфомы Ходжкина. При использовании моноклональных антител против PD-L1 отмечено снижение p-38 и p-ERK в клетках лимфомы Ходжкина [127]. Была выявлена связь между сигнальным путем JAK-STAT и экспрессией PD-L1. Сигнальный путь JAK-STAT является ключевым регулятором клеточной пролиферации, дифференцировки, миграции, апоптоза и передачи этих сигналов в ядро клетки, с последующей активацией процессов клеточного деления и дифференцировки клеток [72]. В исследованиях учёного Toshifumi показано, что AG490, который является ингибитором JAK2 (один из белков сигнального пути JAK-STAT), подавляет повышенную экспрессию PD-L1 как на уровне мРНК, так и на уровне самого белка [146]. Эти результаты подтверждают, что путь JAK-STAT участвует в регуляции экспрессии PD-L1.

Молекулярная характеристика, а также большое количество сигнальных путей, которые зависят от оси PD-1/PD-L1, требуют изучения экспрессии белка PD-1 на различных Т-клетках. При детальном изучении ткани опухоли особое внимание уделяется Т-лимфоцитам (TILs). В исследованиях микроокружения опухоли у пациентов с меланомой отмечается высокая экспрессия PD-1 на Т-клетках, что подтверждает роль PD-1 в канцерогенезе. Именно препараты, основанные на блокировании оси PD-1/PD-L1, включены в первую линию лечения пациентов с меланомой, что значительно продлевает их жизнь [102]. В исследованиях, которые посвящены изучению оси PD-1/PD-L1 у пациентов с раком легкого особое внимание уделено концентрации PD-L1 в ткани новообразования. Несколько проведенных исследований (программа KEYNOTE) показывают высокую экспрессию PD-L1 на поверхности злокачественных клеток, поэтому FDA в ускоренном режиме одобрило применение моноклональных антител, блокирующих PD-L1. Включение этих препаратов в линию лечения пациентов с раком лёгкого демонстрирует увеличение общей выживаемости больных [77]. Ещё одной важной особенностью является снижение количества CD8⁺Т-клеток в ткани новообразования у пациентов с раком лёгкого на фоне высокой экспрессии PD-L1 на клетках опухоли. Эти данные свидетельствуют о вовлечении оси PD-1/PD-L1 в канцерогенез рака лёгкого путём формирования иммуносупрессивной среды и снижения активности цитотоксических лимфоцитов [77]. В 2022 году опубликованы данные мета-анализа применения ингибиторов оси PD-1/PD-L1 у пациентов с колоректальным раком. Блокирование взаимодействия PD-1 со своим лигандом в целом оказывает положительное влияние на лечение пациентов с запущенными формами КРР, но не является ведущим звеном в патогенезе рака толстой кишки [43].

Белок-3, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и домен муцина (TIM-3) и его лиганд Galectin-9

Мембранный белок TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3) является трансмембранным белком I типа и ко-ингибирующей иммунной

контрольной точкой [166]. Функция TIM-3 заключается в снижении иммунного ответа путем истощения CD8⁺T-лимфоцитов [85]. Белок TIM-3 состоит из внеклеточного иммуноглобулиноподобного домена V-типа, в котором содержится 6 цистеиновых мотивов, отвечающих за высокую вариативность домена. Эта вариативность обусловлена наличием уникального связывающего кармана (FG-CC), благодаря чему белок TIM-3 способен взаимодействовать с лигандами, которых в настоящее время известно четыре. Также белок TIM-3 состоит из трансмембранного муцинового домена и внутриклеточного цитоплазматического хвоста, на котором находится Vat3 (HLA-b, связанный транскрипт 3) и остатки тирозина. Экспрессия TIM-3 отмечается на T-лимфоцитах, NK-клетках и АПК [153]. Молекула TIM-3 имеет четыре лиганда: Galectin-9, который активно экспрессируется на опухолевых клетках, Phosphatidylserine (PtdSer), HMGB1 (High mobility group protein B1), и Ceacam-1 (Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1). Взаимодействие TIM-3 и его лигандов опосредует повышение концентрации ионов кальция внутри T-клетки. Концентрация ионов кальция инициирует процессы фосфорилирования тирозиновых остатков на внутриклеточной части TIM-3, что приводит к отрыву Vat3 от внутриклеточной части TIM-3. Отрыв Vat3 ингибирует TCR-сигналинг и усиливает иммунную супрессию путём истощения CD8⁺T-лимфоцитов [79]. Высокая экспрессия TIM-3 на T-клетках определяется у пациентов с меланомой, раком желудка, В-клеточной неходжкинской лимфомой [96].

Недавние исследования показали, что высокий уровень белка TIM-3 зарегистрирован в сыворотке крови и ткани опухоли у пациентов с меланомой. К тому же при анализе поверхности T-лимфоцитов в ткани опухоли отмечалась высокая экспрессия TIM-3 на цитотоксических лимфоцитах, что коррелирует с истощением CD8⁺T-клеток. Изучение микроокружения опухоли показало низкий уровень цитокинов и хемокинов, продуцируемых этим пулом T-клеток [117]. Применение моноклональных антител к TIM-3 на мышинных моделях привело к получению интересных эффектов. На модели с аденокарциномой толстой кишки в комбинации с моноклональными антителами к PD-1 был зафиксирован

выраженный регресс новообразования. Применение данной комбинации препаратов было обусловлено высоким уровнем экспрессии этих ИКТ на пуле CD8⁺T-клеток. Было произведено сравнение полученных данных с моделями рака молочной железы, где также были получены данные о высокой экспрессии TIM-3 и PD-1. К тому же изучаемый пул T-клеток в исследовании был распределен на различные субпопуляции (наивные, клетки эффекторной и центральной памяти, TEMRA) [145]. При применении препарата на лабораторных мышах с раком предстательной железы отмечалось уменьшение размеров опухоли [48]. В исследовании Pagliano O. изучали блокирование TIM-3 на мышинных моделях с раком яичников, к тому же была выполнена сопутствующая активация CD137 (4-1BB). Внутри брюшной полости была имплантирована опухоль, также внутри брюшной полости вводили моноклональные антитела к TIM-3. Особое внимание уделялось общей выживаемости мышей и составу опухолевой ткани. В 60% случаев была замечена регрессия опухолевой ткани до полного ее исчезновения и отсутствие рецидива в течение трёх месяцев. Также было отмечено увеличение количества CD4⁺ и CD8⁺T-клеток. Установлено, что совместная блокада TIM-3 и активация CD137 оказывают выраженный эффект [155]. В настоящее время ведется исследование моноклонального антитела к TIM-3 (INCAGN02390) в группе пациенток с раком яичников. Другим зарегистрированным исследованием, в которое включены 219 больных с различными локализациями рака, является клиническое изучение препарата MBG453 (гуманизированное антитело к TIM-3) [116].

Повышенный уровень белка TIM-3 в ткани опухоли коррелировал с прогрессированием заболевания и ранним метастазированием у пациентов с раком желудка и В-клеточной лимфомой. В исследованиях, посвященных изучению роли TIM-3 в прогрессировании В-клеточной лимфомы, показано, что CD4⁺ и CD8⁺ T-клетки с повышенной экспрессией TIM-3 на поверхности проявляют пониженную способность к пролиферации в ответ на активацию TCR. Кроме того, у этих популяций клеток была отмечена низкая продукция цитокинов [79]. Эти результаты подтверждают роль TIM-3 в ингибировании T-клеточного

иммунного ответа и неблагоприятном влиянии на прогноз заболевания у пациентов. В другом исследовании отмечался высокий уровень TIM-3 на поверхности NK-клеток у пациентов с раком желудка по сравнению с контрольной группой. Высокая концентрация TIM-3 также коррелировала с поздней стадией заболевания, что послужило предположением о роли TIM-3 в ингибировании Т-клеточного иммунного ответа [166]. В данных международного института противоопухолевых исследований (Нью-Джерси, США), опубликованных в 2021 году, высказывается предположение, что рецептор TIM-3 снижает функцию Т-клеток в микроокружении опухоли при КРР, что возможно является патогенетическим звеном роста и прогрессирования рака этой локализации [110].

В настоящее время белок TIM-3 признан отрицательным регулятором противоопухолевого иммунного ответа. Это делает его идеальной мишенью для иммунотерапии. Выявление определённых популяций Т-клеток, которые активно экспрессируют данный белок, обеспечит избирательную терапию, что позволит избежать системной токсичности. Концентрация этой молекулы в ткани опухоли и сыворотке крови при различных локализациях требует изучения.

Ген активации лимфоцитов-3 (LAG-3)

Ген активации лимфоцитов-3 (Lymphocyte-activation gene 3, LAG-3, CD223) – это мембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов, который был открыт в 1990 году и является ко-ингибирующей иммунной контрольной точкой [21]. Основная функция LAG-3 заключается в подавлении активности Т-лимфоцитов и снижении секреции цитокинов [112]. Отмечено, что LAG-3 эффективно предупреждает развитие аутоиммунных реакций. Молекулярная структура LAG-3 представлена внеклеточной частью, трансмембранным доменом и цитоплазматическим хвостом. Внутриклеточная часть или цитоплазматический хвост имеет уникальную структуру и состоит из трёх доменов [133]. Первый состоит из аминокислоты серина, второй представлен уникальным мотивом KIEELE, третий глутаминовым повтором пролина. Именно мотив KIEELE

препятствует переходу Т-клеток в S-фазу, в которой происходит репликация ДНК, следовательно, количество Т-клеток снижается [147]. Экспрессия LAG-3 отмечается на поверхности различных TILs, активированных CD4⁺ и CD8⁺Т-клетках, регуляторных Т-лимфоцитах (Tregs), NK-клетках и дендритных клетках. Отмечается, что LAG-3 имеет близкое родство с белком CD4 благодаря схожим аминокислотным составам. Белок LAG-3 взаимодействует с главным комплексом гистосовместимости-II (Major histocompatibility complex-II, МНС-II) [150]. Функции LAG-3 осуществляются, когда происходит взаимодействие LAG-3 с МНС-II на поверхности антигенпрезентирующих клеток, что исключает взаимодействие Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR) с МНС-II и приводит к подавлению активации Т-клеток [90]. Однако, рецептор МНС-I на поверхности опухолевых клеток используется ими для взаимодействия с LAG-3 и осуществления «ускользания» от иммунного ответа [65]. Точный механизм передачи сигналов, опосредуемых LAG-3 до конца не изучен. Высокая экспрессия LAG-3 на Т-клетках способствует выживанию клеток меланомы благодаря сигнальным путям MAPK/ERK и PI3K/AKT [3, 4, 126]. Экспрессирующие LAG-3 на своей поверхности Tregs способны косвенно ингибировать дендритные клетки (DCs) через мотив ITAM [115]. Однако последние исследования показали, что в некоторых случаях модулирование иммунного ответа происходит без участия МНС-I, это стало причиной поиска дополнительных лигандов к LAG-3. Полученные данные указывают на наличие еще 2 лигандов к LAG-3 – это Galectin-3 и LSECtin. Взаимодействие с последним опосредует снижение уровня IFN-у активированными Т-клетками [88].

Известно, что TILs являются важным компонентом микроокружения опухоли, которое состоит из CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов, Tregs, NK-клеток, В-клеток, макрофагов и дендритных клеток [130]. Высокий уровень LAG-3 на поверхности CD4⁺Т-клеток опосредует снижение уровня выделяемых ими цитокинов, таких как IL-2, IL-7, IL-12 и IFN-у [140]. Благодаря LAG-3 подавляется эффекторная функция CD8⁺Т-лимфоцитов, снижается пролиферация NK-клеток и подавляется активация DCs [115, 126]. В клинических испытаниях

установлена повышенная концентрация LAG-3 в ткани опухоли у пациентов с различными локализациями. Интересные сведения были показаны в исследовании уровня LAG-3 в ткани опухоли у пациентов со злокачественным новообразованием поджелудочной железы. Детально было изучено микроокружение опухоли и выявлено высокое количество TILs, на которых отмечалась высокая экспрессия LAG-3. Данные исследования указывают, что экспрессия LAG-3 свидетельствует об отрицательной прогностической роли у пациентов с раком поджелудочной железы, так как высокая экспрессия коррелировала с поздней стадией заболевания и ранним метастазированием. К тому же, высокий уровень LAG-3 на поверхности Т-клеток, окружающих опухоль, может быть использован для взаимодействия белка LAG-3 и МНС на поверхности опухолевой клетки, что приводит к ингибированию Т-лимфоцитов [80]. В 2022 году исследовательская группа во главе с американским ученым Nicole E. James представила данные, свидетельствующие о потенциальной роли LAG-3 в патогенезе рака яичников. Фиксированные в парафине образцы ткани опухоли пациенток с раком яичников были изучены на предмет количества Treg в микроокружении опухоли. Известно, что Treg играют важную роль в патогенезе рака яичников. На поверхности регуляторных Т-клеток отмечалась высокая экспрессия LAG-3, что коррелировало с низкодифференцированной гистологической формой рака яичников. Однако высокая экспрессия LAG-3 на Treg связана с более длительной выживаемостью, что выглядит парадоксально [82]. В исследованиях Rhyner Agocs (2021) получены данные о высокой экспрессии LAG-3 на TILs в ткани опухоли у пациентов с колоректальным раком (КРР) и корреляционной связи с низкой выживаемостью пациентов с раком толстой кишки. Было выдвинуто предположение об использовании LAG-3 как прогностического маркера [91]. Дальнейшее изучение роли LAG-3 в канцерогенезе при колоректальном раке продолжается.

Таким образом, несмотря на подтверждение роли LAG-3 в ингибировании локального иммунного ответа и роли в канцерогенезе, требуется изучение

молекулярных механизмов, с помощью которых LAG-3 опосредует свой сигнальный путь.

Белок-9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (4-1BB)

Гликопротеин 4-1BB (TNF-receptor superfamily 9, TNFR9, CD137) – это мембранный адаптерный белок, член суперсемейства TNF-рецепторов (Tumor necrosis factor receptors) [19,20]. Белок 4-1BB является иммунной контрольной точкой, оказывает ко-стимулирующее действие на активированные Т-лимфоциты, способствует их пролиферации и выживанию, также усиливает эффекторные функции CD8⁺Т-клеток [158]. Для индукции данного белка требуется 24 часа. Экспрессия 4-1BB обнаружена на поверхности CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, НК-клетках, моноцитах, макрофагах, дендритных клетках, регуляторных Т-клетках [92]. Для осуществления функций 4-1BB требуется взаимодействие со своим лигандом (4-1BBL), который экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках, дендритных клетках [19]. Для передачи сигналов в клетку 4-1BB использует адаптерные белки (TRAFs), ассоциированные с суперсемейством TNF-рецепторов, вместе они формируют сигналосому (молекулярные сигнальные комплексы). Белки TRAFs взаимодействуют с 4-1BB только после активации последнего, действуют как каркасные белки. Благодаря особому домену в структуре они способны проникать в различные структуры готовой сигналосомы, тем самым модулируя активность комплекса. Стимулирование Т-клеток происходит при активации таких путей, как NF-κB1 и NF-κB2, c-Jun и p-38 [104].

Белок 4-1BB стал важной молекулярной мишенью в иммунотерапии рака благодаря своей способности стимулировать противоопухолевый иммунный ответ [20]. Были разработаны антитела к 4-1BB, которые показывали выраженную противоопухолевую активность. Первые доклинические модели были основаны на трансплантируемой саркоме в мышинных моделях. Было показано, что стимулирование 4-1BB повышало активность Т-клеток в микроокружении опухоли [56]. Наряду с успешным применением монотерапии сообщалось о широком исследовании различных комбинаций с моноклональными антителами к

PD-1 и CTLA-4. Эффективность применения комбинации с PD-1 исследовалась у пациентов с раком яичников и легких. Полученные данные свидетельствуют об увеличении времени выживаемости эффекторных Т-клеток в микроокружении опухоли [114]. Комбинацию с моноклональными антителами к CTLA-4 изучали на лабораторных мышах с меланомой. Наблюдали усиление противоопухолевого эффекта и уменьшение размеров первичного очага. Усиление противоопухолевого иммунитета подтверждали прижизненной микроскопией образцов ткани [114]. В настоящее время ведутся клинические исследования по подбору оптимальной дозы [103]. Свойства 4-1BB позволили использовать этот белок в адаптивной Т-клеточной терапии (cellular adoptive immune therapy), суть которой заключается в переносе Т-клеток, выращенных *in vitro* в организм пациента. Однако эффект такой терапии усиливается при использовании активирующих молекул, таких как 4-1BB [38]. Применение адаптивной Т-клеточной терапии, основанной на активации 4-1BB показало высокую эффективность у пациентов с меланомой, раком яичников, мелкоклеточным раком легкого [20, 62]. Первоначальные данные о тестировании таких препаратов стали показывать положительные результаты у пациентов с запущенными формами меланомы, но испытания были остановлены из-за серьезных побочных эффектов, таких как гепатотоксичность [163]. Комплексный анализ выявил, что развитие побочных явлений связано с дозой препарата (более 1 мг/кг). Уменьшение дозы препарата до 0,1 мг/кг и сочетание с моноклональными антителами к CTLA-4 и PD-1 показали лучшую переносимость и многообещающие клинические ответы у пациентов [163]. В работе Lian-sheng Cheng (2022) изучение эффективности стимуляции белка 4-1BB на мышинных моделях с колоректальным раком (КРР) продемонстрировало существенную противоопухолевую активность и послужило толчком для использования молекулы 4-1BB у пациентов с раком толстой кишки [20].

Таким образом, белок 4-1BB – это мощный ко-стимулирующий фактор при злокачественных новообразованиях различных локализаций. Молекулярная характеристика показывает его неограниченные возможности в адаптации и

модулировании иммунного ответа. Доклинические испытания это подтвердили, однако клинические исследования сопровождались развитием осложнений, что заставило пересмотреть стратегии воздействия на 4-1BB. В настоящее время комбинация с моноклональными антителами к CTLA-4 и PD-1 показывает многообещающие клинические результаты.

Трансформирующий фактор роста β 1 (TGF- β 1)

Трансформирующий фактор роста- β 1 (Transforming growth factor β 1, TGF- β 1) – это сложный полипептид, который является членом семейства трансформирующих ростовых факторов, которое включает 40 молекул со схожей структурой. Полипептид TGF- β 1 является одной из трех изоформ TGF- β . Белок продуцируется активированными Т-лимфоцитами, макрофагами и тромбоцитами. По отношению к иммунной системе TGF- β 1 оказывает ингибирующее действие, в частности подавляет гемопоэз, синтез провоспалительных цитокинов, ответ лимфоцитов на IL-2, IL-4 и IL-7, дифференцировку цитотоксических NK- и Т-клеток. Показано, что выключение гена TGF- β 1 приводит к развитию генерализованной воспалительной патологии, в основе которой лежат аутоиммунные процессы. Таким образом, TGF- β 1 является элементом обратной регуляции иммунного ответа [165]. В то же время данный цитокин усиливает синтез белков межклеточного матрикса, влияет на репродуктивную способность клетки, ее рост и регенерацию [46]. В организме TGF- β 1 секретируется в инактивированной форме, после активации FATGF- β 1 (Free active transforming growth factor β 1, FATGF- β 1) реализует свои функции при взаимодействии с рецептором, который объединяет в себе две рецепторных цепи TGF- β R2 и две цепи TGF- β R1. Рецептор обладает серин-тиониновокиназной активностью. Цитокин связывается с рецептором, который рекрутирует и фосфорилирует домены рецепторных цепей. Их взаимодействие способно запускать различные сигнальные пути (Smad, MAPK, PI3K, JNK и другие), которые опосредуют апоптоз во многих типах клеток, блокируя G1-фазу клеточного цикла [3, 4, 53]. Детально это осуществляется путем фосфорилирования остатков серина в белках

Smads. Это приводит к изменениям в хвостовой части белка, благодаря которым белки Smads перемещаются в ядро и осуществляют регулирование экспрессии генов, отвечающих за пролиферацию различных клеток. Разнообразие белков Smads опосредует мультифункциональность цитокинов семейства TGF- β . Именно возможность принимать участие в нескольких сигнальных путях определяет двойную роль TGF- β 1 в канцерогенезе. Белок TGF- β 1 может выступать как опухолевый супрессор, но на поздних стадиях способствует росту, инвазии и метастазированию злокачественных клеток путём подавления Т-клеточного иммунного ответа [59]. Сигналы TGF- β 1 меняются во время прогрессирования злокачественного новообразования. Также важную роль вносят генетические мутации в сигнальных молекулах TGF- β или Smads. Однако при изучении некоторых локализаций (меланома, рак молочной железы, глиома) мутаций в генетическом аппарате выявлено не было [30]. Изменение функций TGF- β 1 обусловлено характером злокачественных клеток. Высокая экспрессия TGF- β 1 способствует эпителиально-мезенхимальному переходу злокачественных клеток. Суть этого перехода заключается в потере клетками полярности и повышении подвижности, что влечет миграцию последних в другие органы и ткани [30]. В клинических испытаниях А. Calon изучена активность TGF- β 1 в отношении опухолюассоциированных фибробластов. Последние способны продуцировать большое количество протеаз, участвующих в ремоделировании окружающих тканей, и создают благоприятную среду для опухоли. Полученные данные показывают, что опухолю-ассоциированные фибробласты отвечают на сигналы TGF- β 1, что приводит к активности фибробластов [71, 140]. Данные исследований уровня TGF- β 1 у пациентов с раком предстательной железы позволяют предположить, что TGF- β 1 стимулирует экспрессию CD44 и способствует росту рака предстательной железы на поздних стадиях заболевания. Известно, что дифференцировочный антиген CD44 отвечает за межклеточные взаимодействия, процессы адгезии и миграции клеток. К тому же высокая экспрессия CD44 обнаружена на стволовых клетках опухоли. Вынесено предположение, что именно взаимосвязь с CD44 способствует вовлечению TGF- β 1 в канцерогенез на

поздних стадиях заболевания [144]. В то же время, в исследовании Zivancevic-Simonovic (2016) показано, что у пациентов с раком щитовидной железы концентрация TGF- β 1 в ткани опухоли была ниже, чем в контрольной группе [158]. Такие противоречивые данные требуют дальнейшего изучения роли TGF- β 1 в канцерогенезе при различных локализациях. Благодаря своей роли в прогрессировании рака, TGF- β 1 рассматривается как привлекательная иммунотерапевтическая мишень. Однако передовой препарат – галунисертиб – демонстрирует высокую сердечную токсичность при применении на мышинных моделях. В настоящее время исследования продолжаются [137].

Таким образом, белок TGF- β 1 представляет собой мультифункциональный цитокин, который продуцируется различными клетками. Учитывая клеточное разнообразие опухолевого микроокружения, участие TGF- β 1 в канцерогенезе неизбежно. Однако это участие имеет многогранный характер. Основная роль заключается во влиянии на пролиферацию и миграцию опухолевых клеток. Современная иммунотерапия рассматривает различные подходы, в том числе комбинации с моноклональными антителами к ИКТ, нацеленные на блокирование TGF- β 1 и увеличение времени общей выживаемости пациентов.

Субъединица альфа рецептора интерлейкина-2 (IL-2R α , CD25)

Субъединица α -рецептора интерлейкина-2 (IL-2R α , CD25) и его растворимая форма (sCD25, sIL-2R α) является белком из группы дифференцировочных антигенов лейкоцитов [5]. Помимо α -субъединицы (CD25) существует β и γ -субъединицы (CD122, CD132). Вместе они формируют рецептор к интерлейкину-2 (IL-2R α) [118]. Особенность заключается в том, что β и γ -субъединицы уже присутствуют в клетке, α -субъединица экспрессируется при активации клетки мишени антигеном. Следовательно, наибольшее количество IL-2R и IL-2R α в его составе отмечается на активированных Т-лимфоцитах. Связывание интерлейкина-2 со своим рецептором на поверхности Т-лимфоцитов служит сигналом к их активации. Другая особенность заключается в том, что растворимая форма рецептора (IL-2R) представлена только α -субъединицей, связанной с мембраной

клетки (IL-2Ra, CD25) [5]. Поэтому сывороточный уровень sCD25 служит маркером активации Т-лимфоцитов [132]. В ряде исследований последних лет установлено повышение уровня растворимой формы sCD25 в сыворотке крови при различных локализациях рака [119]. Многие исследователи считают, что sCD25 может быть использован как биологический маркер для диагностики и определения прогноза течения онкозаболевания [5]. В частности, увеличение сывороточного уровня sCD25 служит диагностическим признаком гиперпролиферации лимфоцитов при гемобластозах и является показателем неблагоприятного прогноза течения опухолевого процесса [69]. Активация иммунной системы в ответ на появление в организме злокачественных клеток провоцирует повышенную экспрессию рецептора интерлейкина-2 на иммунных клетках, что в свою очередь приводит к увеличению концентрации растворимой формы sCD25 в кровотоке [2]. Обнаружено, что при различных типах лейкозов и лимфом высвобождение sCD25 происходит непосредственно из клеток опухолевой ткани, что демонстрирует степень роста и развития новообразования [52]. В настоящее время патогенетическая и прогностическая роль sCD25 при колоректальном раке (КРР) не определена. В литературе имеются лишь единичные работы в этом направлении. Так, в исследованиях автора Bhat (2022) было установлено, что sCD25 может быть использован в качестве биологического маркера для определения прогноза течения заболевания у пациентов с метастатической формой колоректального рака [52].

Развитие области иммунотерапии злокачественных новообразований сместило фокус с лечения первичного очага на изучение специфических биологических характеристик опухоли и их взаимодействие с иммунной системой человека. Изучение патогенетических механизмов, основанных на модулировании опухоли нормальных иммунных клеток и структур позволит выявить индивидуальные рычаги воздействия при разных локализациях. В частности, чтобы успешно и эффективно воздействовать на злокачественные новообразования с высоким уровнем распространения и смертности (рак прямой

кишки, рак легкого и молочной железы), требуется последовательное и глубокое изучение опухолевого микроокружения этих локализаций.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования и характеристика обследуемых групп

Под наблюдением находилось 94 человека из них 69 с новообразованиями толстой кишки, проходивших лечение в ГУЗ «Забайкальский краевой онкологический диспансер» и 25 больных контрольной группы, находившихся на лечении в ГУЗ «Краевая клиническая больница» г. Читы в период с 2019 по 2022 гг. Основная группа включала 44 больных с колоректальным раком. Количество мужчин в группе – 13 (29,6%), женщин – 31 (70,4%). Средний возраст 68,6 [65,2; 73,1] лет. Все больные были обследованы в соответствии с клиническими рекомендациями общероссийского национального союза «Ассоциация онкологов России» для пациентов со злокачественными новообразованиями ободочной кишки и ректосигмоидного отдела. При гистологическом исследовании микропрепаратов в 39 случаях (88,6%) ткань опухоли была представлена умеренно дифференцированной аденокарциномой (G2). В 3 случаях (6,8%) – высокодифференцированной аденокарциномой (G1). В 2 случаях (4,6%) – низкодифференцированной аденокарциномой (G3). В основной группе у 8 пациентов диагностирована I стадия процесса, у 22 – II стадия, у 7 – III стадия и у 7 – IV стадия рака.

Группа клинического сравнения сформирована из 25 пациентов с доброкачественными новообразованиями толстой кишки, которым было выполнено эндоскопическое удаление аденомы толстой кишки или гиперпластического полипа. Количество мужчин составило 12 (48%), женщин – 13 (52%). Средний возраст больных - 59,4 [57,4; 62,4] лет. При гистологическом исследовании микропрепаратов в 15 случаях ткань опухоли была представлена тубуловорсинчатой аденомой и в 10 случаях – гиперпластическим полипом.

Группу контроля составили 25 больных, поступивших в хирургическое отделение ГУЗ «Краевая клиническая больница» для планового или экстренного оперативного вмешательства (пластика колостомы, сформированной ранее по

поводу травмы толстой кишки, экстренное оперативное пособие по поводу травмы толстой кишки). Девяти больным (36%), являющимся носителями колостомы, была выполнена реконструктивно-восстановительная операция. Восемью пациентам (32%) выполнено плановое оперативное вмешательство по поводу врожденной аномалии толстой кишки. Экстренное оперативное пособие по поводу травмы толстой кишки выполнили восьми больным (32%). Количество мужчин составило 13 (52%), женщин – 12 (48%). Средний возраст 47,2 [44,8; 52,4] лет. Биопсию выполняли во время оперативного пособия. Дизайн исследования представлен на схеме (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Дизайн исследования

Исследование выполнено согласно требованиям комиссии по этике ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, а также в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013 г.). Исследование одобрено локальным этическим

комитетом при ФГБОУ ВО ЧГМА (протокол № 98 от 27.11.2019 г). В каждом случае больной был ознакомлен с информационным листом. В информационной форме приводится описание исследования, цель проведения исследования, способы забора биологического материала, рекомендации, если больной будет включен в исследование, права и обязанности пациента, использование персональной информации и её врачебная тайна. В исследование были включены пациенты, которые согласились на участие, и их согласие было зафиксировано в информированном согласии. Согласие также было рассмотрено и одобрено этическим комитетом при ФГБОУ ВО ЧГМА.

Критерии включения в исследование: согласие пациента, наличие опухоли толстого кишечника, первичный статус заболевания. Критерии исключения из исследования: больные, проходившие курс химиотерапевтического или лучевого лечения перед оперативным пособием; пациенты с положительным ВИЧ-статусом; аутоиммунными заболеваниями; вирусными и бактериальными инфекциями; хроническими воспалительными заболеваниями кишечника.

2.2. Инструментальные методы исследования

Эндоскопическое исследование толстой кишки для выявления опухолевого образования выполняли аппаратом Pentax Medical ЕРК-і7010. Подготовку пациента к исследованию осуществляли в соответствии с Бостонской шкалой (Boston bowel preparation scale, BBPS). Эндоскоп проводили до купола слепой кишки с осмотром баугиниевой заслонки. Визуализировали слизистый слой толстой кишки, оценивали его сосудистый рисунок. При выявлении опухолевого образования, производили биопсию при помощи эндоскопических щипцов. Биоптаты помещали в 10% раствор формалина, далее их отправляли в патологоанатомическую лабораторию для проведения последующего гистологического исследования.

В соответствии с клиническими рекомендациями обследования пациентов с опухолевым поражением толстого кишечника проводили компьютерную томографию органов брюшной полости и забрюшинного пространства при

помощи компьютерного томографа GE Optima CT660 с внутривенным введением контрастного вещества «Ультравист 370» в объеме до 80 мл. Исследование выполняли для определения объема поражения регионарной лимфатической системы, отдаленных метастатических очагов и исключения множественного опухолевого поражения органов брюшной полости.

2.2. Гистологический метод исследования

Полученный препарат (участок кишки с опухолью, биоптаты, полученные при эндоскопической биопсии) рассекали серийными разрезами по короткой оси. Размеры опухоли измеряли линейкой и сопоставляли с данными инструментального исследования. Также определяли тип роста опухоли (эндофитный или экзофитный). Лимфатические узлы регионарной клетчатки выделяли отдельно. После получения биоптатов опухоли, материал помещали в гистологический процессор SAKURA Tissue-Tek VIP 6AI в заливочную среду формалин-спирт-ксилол. Далее подготовленные биоптаты транспортировали в заливочную станцию SAKURA Tissue-Tek TEC, где ткань была заключена в парафиновый блок. Для получения исследуемых срезов полученные блоки обрабатывали ротационным микротомом криостат SAKURA Tissue-Tek Cryo 3 Plus. Готовые срезы окрашивали в красочной станции по методу Ван Гизона (пикриновая кислота и фуксин) с применением реактива Шиффа, методом Маллори (гематоксилин и фосфорно-вольфрамовая кислота). Готовые стекла и блоки исследованы при помощи светового микроскопа Nikon ECLIPSEE 200. Определяли гистологический тип рака толстой кишки, инвазию сосудов и нервов. При исследовании лимфатических сосудов определяли гистологический тип, органную принадлежность метастазов, прорастание капсулы лимфатических сосудов и формирование конгломератов. Гистологическую степень злокачественности рака толстой кишки (G1-G3) определяли с помощью гистологической классификации в соответствии с международной классификацией опухолей (2010 г.). Далее, учитывая результат гистологического

исследования, пациента включали в основную группу исследования или группу клинического сравнения.

2.4. Лабораторные методы исследования

2.4.1. Исследование уровня иммунных контрольных точек, трансформирующего фактора роста- β 1, субъединицы альфа рецептора интерлейкина-2 (sCD25)

Уровень растворимых форм ко-ингибирующих молекул и их лигандов (CTLA-4, B7-2, PD-1, PD-L1, TIM-3, Galectin-9, LAG-3), ко-стимулирующей молекулы (4-1BB), дифференцировочного антигена CD25 и белка FATGF- β 1 определяли в сыворотке крови и супернатанте гомогената ткани опухоли. Забор крови выполняли утром, за два часа до оперативного пособия. Полученный материал в системе для взятия венозной крови с гранулами активации свертывания (силикат) доставляли в течении 30 минут в лабораторию в термоконтейнере. Биоптаты ткани опухоли массой до 1 грамма, полученные после выполнения оперативного пособия или эндоскопической биопсии, помещали в пластиковую пробирку объемом 20 мл, заливали физиологическим раствором и доставляли в лабораторию. Накануне перед забором биологического материала пациенты получали стандартную лекарственную предоперационную подготовку, которая включала в себя инфузионную терапию (Solution Natrii Chloridi 0,9% 500,0 ml, Solution Dextrosi 5% 500,0 ml), антибактериальную (Sol. Amoxicillini+Clavulaniciacidi 500+100 mg), препарат для предупреждения тромбоемболических осложнений (Sol. Nadroparini calcii 0,3 – 2850 ME анти-Xa). Биоптаты гомогенизировали при помощи гомогенизатора Ultra-Turrah T 10 basic (IKA, Германия) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), далее центрифугировали при 5000 обр./мин в течение 10 минут и отбирали супернатант. Концентрацию исследуемых молекул в сыворотке крови и супернатанте гомогената тканей определяли с помощью метода проточной цитофлуометрии на анализаторе CytoFlex LX (Beckman Coulter, США), используя набор для мультиплексного анализа LEGENDplex™ HU (Immune Checkpoint, США). Панель иммунных

контрольных точек LEGENDplex™ HU представляет собой набор, позволяющий одновременно определять 10 ключевых биомаркеров.

2.4.2. Определение количественного состава популяций Т-лимфоцитов

Количественный состав Т-лимфоцитов, определяли в крови, полученной за 30 минут до оперативного пособия. Материал доставляли в течение 30 минут в лабораторию в термоконтейнере. Для выявления исследуемых популяций Т-лимфоцитов применяли панель антител Dura Clone IM T-Cell (CD45RA-FITC, CD197-PE, CD28-ECD, CD279-PC5.5, CD27-PC7, CD4-APC, CD8-Alexa-Fluor 700, CD3-APC-Alexa-Fluor 750, CD57-Pacific Blue, CD45-Krome Orange, Beckman Coulter, India). Количественный состав субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов определяли с помощью метода проточной цитофлуометрии на анализаторе CytoFlex LX (Beckman Coulter, США). Для иммунофенотипирования 100 мкл цельной крови добавляли в пробирку с моноклональными антителами, перемешивали и инкубировали в течение 15 минут. Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США) в течение 10 минут.

2.5. Статистические методы обработки данных

При проведении статистического анализа руководствовались принципами Международного комитета редакторов медицинских журналов (ICMJE) и рекомендациями «Статистический анализ и методы публикуемой литературе» (SAMPL). Номинальные данные описывали с указанием абсолютных и относительных значений. Сравнение номинальных данных исследования проводили при помощи критерия χ^2 Пирсона, позволяющего оценить значимость различий между фактическим количеством исходов или качественных характеристик выборки, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы. При минимальном значении ожидаемого явления менее 10,0 использовали χ^2 Йейтса на непрерывность. Нормальность распределения

количественных признаков при численности исследуемых групп менее 50 человек оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Учитывая распределение признаков, отличное от нормального во всех исследуемых группах, полученные данные представляли в виде медианы, первого и третьего квартилей: Me [Q₁; Q₃]. Ранговый анализ вариаций по Краскелу-Уоллису (H) выполняли для сравнения трех независимых групп по одному количественному признаку. Затем, при наличии статистически значимых различий, проводили попарное сравнение с помощью критерия Манна-Уитни с учетом поправки Бонферрони (U). Для определения корреляционных связей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент Спирмена. Учитывая дихотомичность целевой переменной, диагностическая модель была построена путем бинарной логистической регрессии. Для установления ценности указанной модели использовался ROC-анализ, что позволило оценить чувствительность, специфичность и точность последней. Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0 (International Business Machines Corporation, США).

ГЛАВА 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ОПУХОЛЕВОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ

3.1. Уровень иммунных контрольных точек и их лигандов в сыворотке крови и ткани опухоли

3.1.1. Цитотоксический Т-лимфоцитарно-ассоциированный белок-4 (CTLA-4) и его лиганд (B7-2)

Цитотоксический Т-лимфоцитарно-ассоциированный белок-4 – это ко-ингибирующая иммунная контрольная точка, которая принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов, также является гомологом CD28 (мембранный белок, необходим для активации Т-клеток). CTLA-4 отвечает за негативное регулирование иммунного ответа и предупреждение развития аутоиммунных реакций. Экспрессируется на поверхности Т-клеток, АПК, опухолевых клеток. Лигандами к CTLA-4 является B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86), которые экспрессируются преимущественно на АПК, дендритных клетках, макрофагах и активированных В-лимфоцитах.

Уровень CTLA-4 в ткани новообразования у пациентов с КРР был выше аналогичного показателя группы контроля в 2,3 [1,6; 4,5] раза ($U=334,0$, $p=0,007$). По отношению к группе больных с доброкачественной опухолью толстого кишечника данный показатель у пациентов с КРР был выше в 1,5 [1,2; 3,1] раза ($U=371,0$, $p=0,002$). Стоит отметить, что уровень CTLA-4 у пациентов с доброкачественной опухолью толстой кишки больше показателя группы контроля в 1,5 [1,1; 1,9] раза ($U=192,5$, $p=0,02$), но полученные данные не имеют статистической значимости. К тому же, полученные результаты позволяют отметить, что увеличение концентрации CTLA-4 связано с характером роста опухоли. Однако наличие этих данных не представляет диагностического интереса, так как для определения характера новообразования можно выполнить гистологическое исследование полученного материала (Таблица 1).

Таблица 1 – Уровень СТЛА-4 у больных с новообразованиями толстой кишки

Концентрация СТЛА-4 (пг/мл)	Группы исследуемых пациентов			Уровень значимости различий, p
	Контрольная группа n=25	Доброка- чественная опухоль n=25	Колоректальный рак n=44	
Ткань опухоли	6,0 [6,0; 8,4]	9,4 [8,8; 11,3]	14,1 [13,7; 27,2]	p ₁ =0,007 p ₂ =0,02 p ₃ =0,002
Сыворотка крови	4,8 [4,3; 6,2]	10,4 [10,3; 14,5]	13,5 [13,0; 20,8]	p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ =0,14

Примечание: p₁ – уровень значимости различий показателей больных с раком и группой контроля; p₂ – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группой контроля; p₃ – уровень значимости различий показателей больных с раком и доброкачественной опухолью.

Подобная динамика наблюдалась при исследовании концентрации СТЛА-4 в сыворотке крови. Установлено, что у пациентов с раком толстой кишки уровень СТЛА-4 в сыворотке крови увеличивается в 2,8 [2,1; 4,7] раза в сравнении с группой контроля (U=119,0, p<0,001). Достоверных различий уровня СТЛА-4 в сыворотке крови у больных со злокачественными и доброкачественными новообразованиями толстой кишки не обнаружено (U=431,5, p=0,14). У пациентов с доброкачественной опухолью толстой кишки уровень СТЛА-4 больше показателей группы контроля в 2,1 [1,7; 3,3] раза (U=71,0, p<0,001) (табл.1). Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение концентрации СТЛА-4 в сыворотке крови может являться маркером наличия новообразования толстого кишечника, но не позволяет определить характер новообразования.

Концентрация лиганда В7-2 в ткани опухоли у пациентов с КРР превышала таковую в группе контроля в 1,6 [1,3; 2,3] раза (U=319,0, p=0,004). Уровень В7-2 у больных с раком толстой кишки был выше, чем у пациентов с доброкачественной опухолью толстой кишки в 1,5 [1,2; 1,8] раза (U=387,0, p=0,018). Установлено, что концентрация В7-2 в ткани опухоли у пациентов с доброкачественным

новообразованием толстой кишки и контрольной группой не имеет статистически значимых различий ($U=248,0$, $p=0,21$). Полученные нами данные не позволяют дифференцировать доброкачественные и злокачественные новообразования толстой кишки (Таблица 2).

Таблица 2 – Уровень В7-2 у пациентов с новообразованиями толстой кишки

Концентрация В7-2 (пг/мл)	Группы исследуемых пациентов			Уровень значимости различий, p
	Контрольная группа n=25	Доброкачественная опухоль n=25	Колоректальный рак n=44	
Ткань опухоли	37,0 [34,1; 44,3]	40,4 [43,3; 48,9]	62,3 [61,7; 79,9]	$p_1=0,004$ $p_2=0,21$ $p_3=0,018$
Сыворотка крови	33,0 [30,0; 40,1]	79,0 [78,6; 97,4]	82,9 [76,7; 113,2]	$p_1=0,002$ $p_2<0,001$ $p_3>0,05$

Примечание: p_1 – уровень значимости различий показателей больных с раком и группой контроля; p_2 – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группой контроля; p_3 – уровень значимости различий показателей больных с раком и доброкачественной опухолью.

Аналогичная динамика увеличения показателей отмечена в сыворотке крови. Концентрация лиганда В7-2 в сыворотке крови у пациентов с КРР превышала данный показатель контрольной группы в 2,5 [1,9; 3,7] раза ($U=302,5$, $p=0,002$). Также установлено, что уровень В7-2 в сыворотке крови у больных раком толстой кишки и пациентов с доброкачественными новообразованиями не имеет статистически значимых различий ($U=392,0$, $p>0,05$). К тому же концентрация лиганда В7-2 у пациентов с доброкачественной опухолью толстой кишки превышала показатель группы контроля в 2,4 [1,9; 3,2] раза ($U=56,5$, $p<0,001$).

У пациентов с КРР определяли концентрацию CTLA-4 и В7-2 в ткани регионарных лимфатических узлов. Так, уровень CTLA-4 в ткани лимфатических

узлов у пациентов с КРР составил 132,2 [117,3; 174,4] пг/мл; концентрация В7-2 – 537,3 [466,7; 650,8] пг/мл.

При анализе полученных данных обращает на себя внимание то, что уровень CTLA-4 в сыворотке крови имеет среднюю прямую корреляционную связь с уровнем CTLA-4 в ткани и уровнем В7-2 в сыворотке (Таблица 3).

Таблица 3 – Корреляционная связь между уровнем CTLA-4 сыворотки крови и другими исследуемыми параметрами

Параметры	Коэффициент корреляции Спирмана, ρ	Сила и направление связи	Статистическая значимость
CTLA-4 в ткани опухоли	0,37	Средняя, прямая	$p < 0,001$
В7-2 в сыворотке крови	0,57	Средняя, прямая	$p < 0,001$

Уровень В7-2 в сыворотке крови не имеет корреляционной связи с его уровнем в ткани опухоли ($\rho=0,008$, $p=0,94$). Между тем отмечается средняя прямая корреляционная связь между уровнем белка CTLA-4 и лигандом В7-2 в сыворотке крови ($\rho=0,57$, $p < 0,001$). В то же время в ткани между вышеуказанными мембранными молекулами имеется слабая прямая корреляционная связь ($\rho=0,28$, $p=0,004$), что подтверждает роль В7-2 в качестве лиганда для CTLA-4, а не в качестве отдельного биомаркера.

У пациентов с КРР определяли концентрацию CTLA-4 и В7-2 в ткани регионарных лимфатических узлов. Так, уровень CTLA-4 в ткани лимфатических узлов у пациентов с КРР составил 132,2 [117,3; 174,4] пг/мл; концентрация В7-2 – 537,3 [466,7; 650,8] пг/мл.

Таким образом, полученные данные демонстрируют увеличение уровня CTLA-4 и его лиганда В7-2 в ткани опухоли и сыворотке крови у пациентов с опухолью толстой кишки, что носит неспецифический характер и не зависит от вида опухоли. Учитывая высокую концентрацию исследуемых молекул в ткани

опухоли и сыворотке крови у пациентов с опухолью, мы полагаем что они вносят вклад в развитие механизмов опухолевой иммуносупрессии в патогенезе рака толстой кишки.

При анализе данных определены параметры, которые могут иметь значимость в структуре диагностической модели для определения вероятности наличия онкологической патологии (Таблица 4).

Таблица 4 – Значимость параметров CTLA-4 и B7-2 в структуре диагностической модели

Параметр	B	Среднеквадратичная ошибка	Вальд	Степень свободы, df	Значимость, p	Exp (B)	95% DI для Exp B
CTLA-4 сыворотки крови	0,42	0,132	9,98	1	0,002	1,52	1,17-1,96
B7-2 сыворотки крови	0,03	0,013	3,78	1	0,05	1,03	1,01-1,05
Константа	-3,25	0,968	11,28	1	0,001	0,04	

На основании этих параметров получено уравнение вида:

$$K = \frac{1}{1 + e^{3,25 - 0,42 * CTLA4_{сыв} - 0,03 * B7-2_{сыв}}}$$

где CTLA-4_{сыв} – уровень белка CTLA-4 в сыворотке крови; B7-2_{сыв} – уровень B7.2 в сыворотке крови; 3,25 – константа уровня логистической регрессии; 0,42 и 0,03 – нестандартизированные коэффициенты b, e-экспонента ~ 2,72. При значении коэффициента $K \geq 0,59$ диагностируется развитие онкологической патологии толстого кишечника. Для группы контроля данный показатель (K) составляет 0,40 [0,36; 0,50], для пациентов с онкологической патологией – 0,86 [0,82; 0,87]. В группе контроля $K \geq 0,59$ встречался в 20%

случаев (5/25), у больных с онкологической патологией – в 94,2% (65/69) случаев ($\chi^2 = 53,14, df = 1, p < 0,001$). Чувствительность данного заключения составляет 0,94, специфичность - 0,80, точность – 0,90 (AUC= 0,88 [95% CI 0,79-0,97], $p < 0,001$) (Рисунок 2).

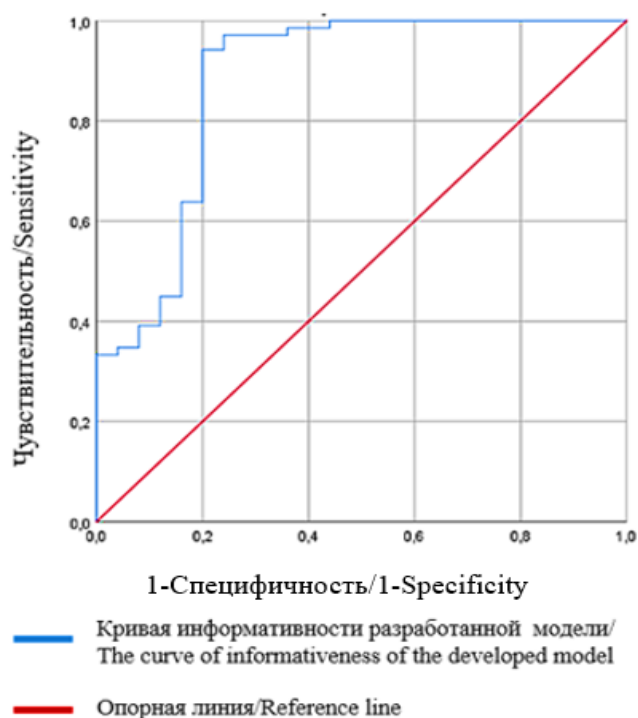


Рисунок 2 – Оценка информативности разработанной модели путем ROC-анализа

Описанный способ можно использовать у пациентов в амбулаторных условиях или хирургическом стационаре для определения вероятности наличия онкологической патологии толстого кишечника. Для упрощения способа при использовании в клинической практике разработана компьютерная программа, в которой вводится значение концентрации рецептора CTLA-4 и его лиганда В7-2 в сыворотке крови. На основании этих данных определяется предрасположенность пациента к развитию онкологической патологии толстой кишки или наличие новообразования толстой кишки, что может являться скрининговым методом диагностики. Набор действий создается в специальном режиме работы

пользовательского окна, в котором пользователь получает доступ к вводу данных о содержании в сыворотке крови рецептора CTLA-4 и его лиганда В7-2 (Рисунок 3).

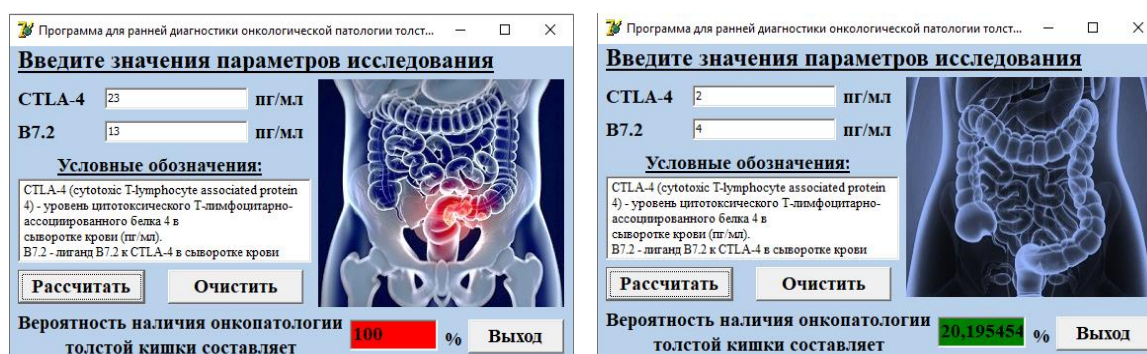


Рисунок 3 – Вид пользовательского окна программы для определения предрасположенности или наличия онкологической патологии толстого кишечника на основании значений рецептора CTLA-4 и его лиганда В7-2 в сыворотке крови

Вывод результата также осуществляется в проекции пользовательского окна, включает определение статуса наличия или отсутствия онкологической патологии толстой кишки: при наличии онкологической патологии толстой кишки загорается красное окно, при отсутствии онкологической патологии толстой кишки – зеленое окно. Программа носит прикладной характер, обеспечивает возможность ранней диагностики онкологической патологии толстого кишечника, что позволяет выделить группу риска и оптимизировать тактику обследования и лечения [6].

3.1.2. Белок-3, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и домен муцина (TIM-3) и его лиганд Galectin-9

Белок TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain-3) это мембранная молекула и ко-ингибирующая иммунная контрольная точка. Строение TIM-3 представлено внутриклеточной и внеклеточной частью. Внеклеточный домен V-типа, в котором содержится 6 цистеиновых мотивов, обуславливает высокую

вариативность TIM-3, которая заключается в способности взаимодействия с четырьмя лигандами: Galectin-9, который активно экспрессируется на опухолевых клетках, Phosphatidylserine (PtdSer), HMGB1 (High mobility group protein B1) и Ceacam-1 (Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1). Функция TIM-3 заключается в снижении иммунного ответа путем истощения Т-клеток, в особенности пула CD8⁺Т-лимфоцитов.

Концентрация TIM-3 в опухоли у пациентов с колоректальным раком была выше в 43,6 [35,8; 52,4] раза по сравнению с группой контроля ($U=0,0$, $p<0,001$) и в 11,4 [7,6; 13,1] раза по отношению к группе больных с доброкачественными новообразованиями толстого кишечника ($U=12,0$, $p<0,001$). Также уровень TIM-3 у больных с доброкачественной опухолью больше значений контрольной группы в 3,8 [3,5; 5,4] раза ($U=0,0$, $p<0,001$) (Таблица 5).

Таблица 5 – Уровень TIM-3 у больных с новообразованиями толстой кишки

Концентрация TIM-3 (пг/мл)	Группы исследуемых пациентов			Уровень значимости различий, p
	Контрольная группа n=25	Доброкачественная опухоль n=25	Колоректальный рак n=44	
Ткань опухоли	89,0 [85,1; 97,9]	340,9 [340,2; 457,0]	3884,4 [3510,7; 4460,8]	$p_1<0,001$ $p_2<0,001$ $p_3<0,001$
Сыворотка крови	58,0 [55,8; 72,8]	95,6 [88,3; 164,2]	677,1 [663,8; 854,1]	$p_1<0,001$ $p_2=0,01$ $p_3<0,001$

Примечание: p_1 – уровень значимости различий показателей больных с раком и группой контроля; p_2 – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группой контроля; p_3 – уровень значимости различий показателей больных с раком и доброкачественной опухолью.

Аналогичная динамика наблюдалась при исследовании данного белка в сыворотке крови. Так, у больных с раком толстой кишки в сыворотке крови уровень TIM-3 увеличивается в 11,7 [9,1; 15,3] раза в сравнении с группой

контроля ($U=23,0$, $p<0,001$). Более того, было показано, что концентрация TIM-3 в сыворотке крови больных с колоректальным раком превышала данный показатель у больных с доброкачественными опухолями в 7,1 [4,0; 9,6] раза ($U=59,0$, $p<0,001$). Стоит отметить, что уровень TIM-3 у пациентов с доброкачественным новообразованием толстой кишки превышал значения группы контроля в 1,6 [1,2; 2,9] раза ($U=180,0$, $p=0,01$). Полученные данные демонстрируют зависимость уровня TIM-3 в сыворотке крови от характера новообразования.

Уровень Galectin-9 в ткани опухоли у пациентов с колоректальным раком был выше по сравнению с контрольной группой в 56,7 [48,3; 70,2] раза ($U=0,0$, $p<0,001$). Концентрация Galectin-9 у пациентов с КРР превышала данный показатель в группе больных с доброкачественной опухолью толстого кишечника в 3,4 [2,7; 4,3] раза ($U=53,0$, $p<0,001$). Также стоит отметить увеличение уровня Galectin-9 у пациентов с доброкачественным новообразованием толстой кишки в сравнении с контрольной группой в 15,4 [13,8; 19,6] раза ($U=0,0$, $p<0,001$). Концентрация Galectin-9 в сыворотке крови у пациентов с КРР превышала данный показатель группы контроля в 33,3 [26,6; 38,2] раза ($U=0,0$, $p<0,001$) (Таблица 6).

Таблица 6 – Уровень Galectin-9 у пациентов с новообразованиями толстой кишки

Концентрация Galectin-9, пг/мл	Группы исследуемых пациентов			Уровень значимости различий, p
	Контрольная группа n=25	Доброкачественная опухоль n=25	Колоректальный рак n=44	
Ткань опухоли	70,7 [67,1; 77,9]	1193,2 [1074,0; 1317,2]	4006,9 [3609,2; 4711,8]	$p_1<0,001$ $p_2<0,001$ $p_3<0,001$
Сыворотка крови	1789,1 [1742,6; 2091,9]	13527,1 [12988,3; 14902,9]	59528,6 [55839,2; 66722,0]	$p_1<0,001$ $p_2<0,001$ $p_3<0,001$

Примечание: p_1 – уровень значимости различий показателей больных с раком и группой контроля; p_2 – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группой контроля; p_3 – уровень значимости различий показателей больных с раком и доброкачественной опухолью.

Между тем, установлено, что уровень Galectin-9 в сыворотке крови у больных с КРР был выше в 4,4 [3,7; 5,1] раза в сравнении с группой больных с доброкачественной опухолью толстого кишечника ($U=46,0$, $p<0,001$). Нами установлено, что уровень Galectin-9 у пациентов с доброкачественным новообразованием толстой кишки был больше чем в контрольной группе в 7,6 [6,2; 8,6] раза ($U=0,0$, $p<0,001$).

У пациентов с КРР определяли концентрацию TIM-3 и Galectin-9 в ткани регионарных лимфатических узлов. Так, уровень TIM-3 в ткани лимфатических узлов у пациентов с КРР составил 8447,5 [8091,1; 11081,2] пг/мл; концентрация Galectin-9 – 9289,7 [9070,0; 2215,8] пг/мл.

Уровень белка TIM-3 сыворотки крови коррелирует не только с его концентрацией в ткани опухоли толстой кишки, но и с уровнем его лиганда - Galectin-9 как в сыворотке крови, так и в ткани новообразования (Таблица 7).

Таблица 7 – Корреляционная связь между уровнем TIM-3 сыворотки крови и другими исследуемыми параметрами

Параметры	Коэффициент корреляции Спирмана, ρ	Сила и направление связи	Статистическая значимость
TIM-3 в ткани опухоли	0,75	Сильная, прямая	$p<0,001$
Galectin-9 в сыворотке крови	0,68	Средняя, прямая	$p<0,001$
Galectin-9 в ткани опухоли	0,69	Средняя, прямая	$p<0,001$

Между уровнем TIM-3 и Galectin-9 в ткани злокачественного новообразования, определяется средняя прямая корреляционная связь ($\rho=0,39$, $p=0,009$), что в очередной раз подтверждает их патофизиологическую связь

«рецептор – лиганд». Также определяется средняя прямая корреляционная связь между уровнем Galectin-9 в сыворотке крови и ткани опухоли.

Таким образом, результаты наших исследований показывают увеличение уровня TIM-3 и его лиганда Galectin-9 в сыворотке крови и ткани опухоли у больных с новообразованием толстого кишечника в сравнении с контрольной группой. Среди всех исследуемых иммунных контрольных точек наибольший рост в сыворотке и ткани опухоли отмечается у белка TIM-3 и его лиганда Galectin-9. Мы считаем, что ключевую роль в развитии опухолевой иммуносупрессии играет TIM-3 и его лиганд Galectin-9.

При анализе данных выявлено, что порогом для определения онкологической патологии является показатель Galectina-9 в сыворотке крови равный 6184 пг/мл и более. Порогом для определения онкологической патологии также является показатель TIM-3 в сыворотке крови, равный 92,1 пг/мл и более (Таблица 8).

Таблица 8 – Значимость параметров TIM-3 и Galectin-9 в структуре диагностической модели

Параметр	Порог	Se	Sp	Ac	AUC	Тестовая статистика	Сила связи	OR
TIM-3	$\geq 92,1$	0,84	0,88	0,85	0,88 (95% ДИ 0,82- 0,95)	$\chi^2 = 39,33$ df=1, p<0,001	V=0,67, p<0,001	39,33 (95% ДИ 10,02- 154,37)
Galectin-9	≥ 6184	0,99	1,0	0,99	0,99 (95% ДИ 0,96- 1,00)	$\chi^2 = 85,15$ df=1, p<0,001	V=0,97, p<0,001	70,00 (95% ДИ 10,00- 490,01)

Примечания: Se – чувствительность, Sp – специфичность, Ac – точность, AUC - площадь под ROC-кривой, OR – отношение шансов

Чувствительность данного заключения составляет 0,84, а специфичность 0,88 (AUC=0,88 [95% ДИ 0,82-0,95], $p < 0,001$) (Рисунок 4).

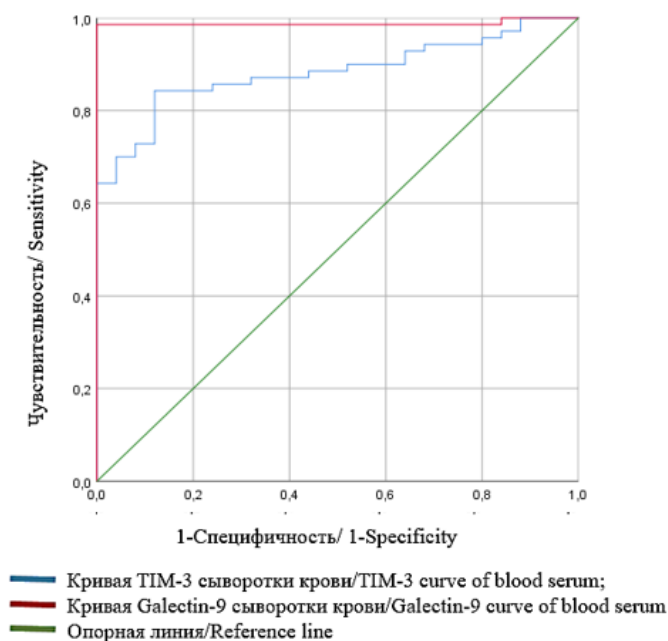


Рисунок 4 – Оценка информативности разработанной модели путем ROC-анализа

На основании полученных данных, определен порог уровня белка TIM-3 и его лиганда Galectin-9 в сыворотке крови для определения онкологической патологии толстого кишечника. Выявление уровня этих биологических маркеров в сыворотке крови возможно применять для скрининговой диагностики в условиях поликлинических подразделений.

3.1.3. Белок запрограммированной клеточной гибели (PD-1) и его лиганд PD-L1

Белок запрограммированной клеточной гибели (Programmed cell death-1, PD-1, CD279) это поверхностный мембранный белок, который является ко-ингибирующей иммунной контрольной точкой. Структура белка PD-1 представлена внеклеточным иммуноглобулиноподобным доменом V-типа,

трансмембранным и внутриклеточным. Экспрессия PD-1 отмечается на Т- и В-клетках, моноцитах, естественных киллерах, дендритных клетках. Роль PD-1 заключается в регулировании Т-клеточного ответа путем угнетения эффекторных функций Т-лимфоцитов и их пролиферации. Для реализации своих функций PD-1 взаимодействует со своими лигандами PD-L1 и PD-L2. Экспрессия PD-L1 отмечается на поверхности лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток. Лиганд PD-L2 обнаружен только на макрофагах и дендритных клетках.

Установлено, что уровень белка PD-1 в ткани опухоли у пациентов с колоректальным раком превышает показатели группы контроля, однако статистической значимости полученные данные не имеют ($p > 0,05$). Также отмечается увеличение PD-1 в сыворотке крови у больных раком толстой кишки в сравнении с группой контроля, что также не имеет статистической значимости (Таблица 9).

Таблица 9 – Уровень PD-1 у больных с новообразованиями толстой кишки

Концентрация PD-1, (пг/мл)	Группы исследуемых пациентов			Уровень значимости различий, p
	Контрольная группа n=25	Доброкачественная опухоль n=25	Колоректальный рак n=44	
Ткань опухоли	13,7 [12,2; 14,5]	16,3 [15,1; 20,3]	27,8 [17,5; 63,1]	$p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
Сыворотка крови	10,9 [10,6; 13,0]	18,0 [17,6; 23,5]	20,5 [18,6; 27,4]	$p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$

Примечание: p_1 – уровень значимости различий показателей больных с раком и группой контроля; p_2 – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группой контроля; p_3 – уровень значимости различий показателей больных с раком и доброкачественной опухолью.

Обращает на себя внимание тот факт, что концентрация лиганда PD-L1 в ткани опухоли и сыворотке крови в исследуемых группах также статистически не отличались (Таблица 10).

Таблица 10 – Уровень PD-L1 у больных с новообразованиями толстой кишки

Концентрация PD-L1, (пг/мл)	Группы исследуемых пациентов			Уровень значимости различий, p
	Контрольная группа n=25	Доброкачественная опухоль n=25	Колоректальный рак n=44	
Ткань опухоли	36,7 [35,2; 40,9]	43,8 [43,0; 55,1]	47,3 [40,1; 48,2]	$p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
Сыворотка крови	23,2 [22,1; 27,5]	25,9 [24,1; 33,7]	27,9 [27,5; 40,1]	$p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$

Примечание: p_1 – уровень значимости различий показателей больных с раком и группой контроля; p_2 – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группой контроля; p_3 – уровень значимости различий показателей больных с раком и доброкачественной опухолью.

У пациентов с КРР определяли концентрацию белка PD-1 и его лиганда PD-L1 в ткани регионарных лимфатических узлов. Так, уровень PD-1 в ткани лимфатических узлов у пациентов с КРР составил 400,0 [323,9; 528,7] пг/мл; концентрация PD-L1 – 940,0 [804,7; 1899,8] пг/мл.

Таким образом, установлено что изменение уровня белка PD-1 и его лиганда PD-L1 не имеет статистической значимости. В свою очередь это указывает на то, что PD-1 и его лиганд не играет значительной роли в механизмах развития опухолевой иммуносупрессии у пациентов с опухолью толстой кишки.

3.1.4. Ген активации лимфоцитов-3 (LAG-3)

Ген активации лимфоцитов-3 (Lymphocyte-activation gene 3, LAG-3, CD223) – это мембранный белок, который является ко-ингибирующей иммунной контрольной точкой. Молекулярная структура LAG-3 представлена внеклеточной частью, трансмембранным доменом и цитоплазматическим хвостом. Экспрессия LAG-3 отмечается на поверхности Т-лимфоцитов, регуляторных Т-клетках (Tregs), NK-клетках и дендритных клетках. Роль LAG-3 заключается в

подавлении активности Т-лимфоцитов и снижении секреции цитокинов. Функции LAG-3 осуществляются, когда происходит взаимодействие LAG-3 с МНС-II на поверхности АПК или опухолевой клетки, что исключает взаимодействие Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR) с МНС-II и приводит к подавлению активации Т-клеток.

Нами установлено, что уровень LAG-3 в ткани опухоли у пациентов с раком толстой кишки был выше в 5,1 [4,0; 7,1] раза по сравнению с группой контроля ($U=23,0$, $p<0,001$). Концентрация LAG-3 в ткани новообразования у больных с КРР была выше в 1,8 [1,4; 2,5] по отношению к группе больных с доброкачественной опухолью толстой кишки ($p=0,008$) (Таблица 11).

Таблица 11 – Уровень LAG-3 у больных с новообразованиями толстой кишки

Концентрация LAG-3, (пг/мл)	Группы исследуемых пациентов			Уровень значимости различий, p
	Контрольная группа n=25	Доброкачественная опухоль n=25	Колоректальный рак n=44	
Ткань опухоли	16,8 [16,5; 20,1]	46,4 [45,6; 57,5]	86,6 [82,3; 117,7]	$p_1<0,001$ $p_2<0,001$ $p_3=0,008$
Сыворотка крови	15,0 [14,5; 20,8]	15,2 [15,1; 23,4]	36,3 [35,1; 49,7]	$p_1=0,017$ $p_2=0,78$ $p_3=0,01$

Примечание: p_1 – уровень значимости различий показателей больных с раком и группой контроля; p_2 – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группой контроля; p_3 – уровень значимости различий показателей больных с раком и доброкачественной опухолью.

Также стоит отметить, что уровень LAG-3 больше у пациентов с доброкачественным новообразованием толстой кишки, чем в контрольной группе в 2,8 [2,3; 3,5] раза ($U=7,0$, $p<0,001$).

Аналогичная динамика наблюдалась при исследовании данной молекулы в сыворотке крови. Уровень LAG-3 в сыворотке крови у пациентов с раком толстой

кишки превышал данный показатель группы контроля в 2,42 [1,69; 3,44] раза ($U=273,5$, $p=0,017$). Концентрация LAG-3 в сыворотке крови у больных с КРР выше в 2,39 [1,5; 3,29] раза по отношению к группе пациентов с доброкачественной опухолью толстого кишечника ($U=266,0$, $p=0,01$). Следует отметить, что уровень данной молекулы у пациентов контрольной группы и больных с доброкачественной опухолью толстой кишки не имел статистически значимых различий ($U=189,0$, $p=0,78$). Полученные данные указывают на увеличение концентрации LAG-3 в сыворотке крови у больных со злокачественной опухолью толстой кишки. У пациентов с КРР определяли концентрацию LAG-3 в ткани регионарных лимфатических узлов, уровень которой составил 835,2 [708,5; 1082,2] пг/мл.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что LAG-3 наряду с белком TIM-3 вносит вклад в развитие опухолевой иммуносупрессии при раке толстой кишки.

3.1.7. Белок-9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (4-1BB)

Белок 4-1BB (CD137) – это ко-стимулирующая иммунная контрольная точка, также является сигнальной молекулой и относится к семейству рецепторов фактора некроза опухолей (TNF). Белок 4-1BB усиливает активность Т-клеток, предотвращает их гибель, а также способствует выработке цитокинов, стимулирующих развитие иммунного ответа. Данный гликопротеин играет важную роль в поддержании противоопухолевого иммунитета и формировании иммунологической памяти. Профиль экспрессии 4-1BB, а также его уникальная способность усиливать эффекторные ответы в нескольких субпопуляциях лимфоцитов, имеющих отношение к опухолевому иммунитету, делает 4-1BB уникальной и привлекательной мишенью для иммунотерапии.

Установлено, что уровень 4-1BB в ткани опухоли в группе пациентов с КРР был выше в 2 [1,7; 2,9] раза по сравнению с группой контроля ($U=120,0$, $p<0,001$). Концентрация 4-1BB в ткани опухоли у больных с доброкачественными

новообразованиями толстой кишки превышала данный показатель контрольной группы в 1,4 [1,0; 1,7] раза ($U=125,0$, $p=0,017$). Установлено статистически значимое различие уровня 4-1BB в опухолевой ткани при доброкачественном и злокачественном процессе. Так, концентрация 4-1BB у больных с раком толстой кишки превышала данный показатель в группе пациентов с доброкачественной опухолью в 1,4 [1,2; 2,1] раза ($U=272,0$, $p=0,017$) (Таблица 12).

Таблица 12 – Уровень 4-1BB у больных с новообразованиями толстой кишки

Концентрация 4-1BB, (пг/мл)	Группы исследуемых пациентов			Уровень значимости различий, p
	Контрольная группа n=25	Доброкачественная опухоль n=25	Колоректальный рак n=44	
Ткань опухоли	11,1 [10,6; 13,3]	16,0 [14,5; 18,4]	22,9 [22,8; 31,7]	$p_1<0,001$ $p_2=0,017$ $p_3=0,017$
Сыворотка крови	20,3 [19,8; 25,2]	37,7 [34,1; 42,2]	38,2 [37,9; 51,1]	$p_1=0,004$ $p_2<0,001$ $p_3=0,34$

Примечание: p_1 – уровень значимости различий показателей больных с раком и группой контроля; p_2 – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группой контроля; p_3 – уровень значимости различий показателей больных с раком и доброкачественной опухолью.

Концентрация растворимой формы 4-1BB в сыворотке крови в группе пациентов с раком толстой кишки увеличивалась в 1,8 [1,5; 2,5] раза относительно контрольной группы ($U=295,0$, $p=0,004$). Уровень молекулы 4-1BB в группе больных с доброкачественными новообразованиями толстой кишки превышал данный показатель группы контроля в 1,8 [1,3; 2,1] раза ($U=65,0$, $p<0,001$). Концентрация растворимой формы 4-1BB в сыворотке крови у больных со злокачественными и доброкачественными новообразованиями статистически не различалась ($U=374,0$, $p=0,34$). У пациентов с КРР определяли концентрацию гликопротеина 4-1BB в ткани регионарных лимфатических узлов. Установлено, что уровень 4-1BB в ткани лимфатических узлов у пациентов с КРР составил 254,3 [228,7; 311,9] пг/мл.

Таким образом, при колоректальном раке в опухолевой ткани возрастает концентрация ко-стимулирующей молекулы как в сравнении с контрольной группой, так и по отношению к доброкачественным опухолям. Значения концентрации молекулы 4-1BB в сыворотке крови при доброкачественных и злокачественных новообразованиях толстого кишечника не зависят от вида опухоли и статистически значимых отличий не имеют.

3.2. Уровень субъединицы альфа рецептора интерлейкина-2 (CD25) в сыворотке крови и ткани опухоли

Субъединица α -рецептора интерлейкина-2 (IL-2Ra, CD25) и его растворимая форма (sCD25, sIL-2Ra) является белком из группы дифференцировочных антигенов лейкоцитов. Участвует в формировании рецептора к интерлейкину-2 (IL-2Ra). Молекула IL-2Ra экспрессируется при активации Т-клетки антигеном. Следовательно, наибольшее количество IL-2R и IL-2Ra отмечается на активированных Т-лимфоцитах. Связывание интерлейкина-2 со своим рецептором на поверхности Т-лимфоцитов служит сигналом к их активации.

Концентрация sCD25 в опухолевой ткани в группе больных с колоректальным раком была выше в 6,7 [5,7; 8,7] раза в сравнении с группой контроля ($U=1,0$, $p<0,001$) и в 2 [1,6; 2,5] раза по отношению к группе больных с доброкачественной опухолью толстого кишечника ($U=213,0$, $p=0,001$). Также концентрация sCD25 у пациентов с доброкачественным новообразованием толстой кишки превышала показатели группы контроля в 3,3 [2,8; 4,4] раза ($U=0,0$, $p<0,001$). Установлено, что у больных раком толстой кишки в сыворотке крови уровень sCD25 увеличивается в 6,9 [5,2; 8,7] раза в сравнении с группой контроля ($U=7,0$, $p<0,001$). Концентрация sCD25 в сыворотке крови пациентов с КРР превышала данный показатель у больных с доброкачественными опухолями в 1,5 [1,3; 2,3] раза ($U=234,0$, $p=0,003$). Стоит также отметить, что уровень sCD25 у пациентов с доброкачественным новообразованием был больше, чем в группе контроля в 4,4 [2,8; 5,0] раза ($U=41,0$, $p<0,001$) (Таблица 13).

Таблица 13 – Уровень sCD25 у пациентов с новообразованиями толстой кишки

Концентрация sCD25, пг/мл	Группы исследуемых пациентов			Уровень значимости различий, p
	Контрольная группа n=25	Доброкачественная опухоль n=25	Колоректальный рак n=44	
Ткань опухоли	59,7 [52,3; 64,4]	195,8 [181,1; 231,1]	402,7 [368,7; 456,6]	p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ =0,001
Сыворотка крови	25,9 [25,8; 33,8]	113,0 [95,6; 129,6]	179,5 [176,1; 225,4]	p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ =0,003

Примечание: p₁ – уровень значимости различий показателей больных с раком и группой контроля; p₂ – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группой контроля; p₃ – уровень значимости различий показателей больных с раком и доброкачественной опухолью.

У пациентов с колоректальным раком определяли концентрацию sCD25 в ткани регионарных лимфатических узлов. Уровень sCD25 в ткани лимфатических узлов составил 1828,6 [1777,0; 3121,8] пг/мл.

При анализе собственных данных был установлен порог концентрации sCD25 в сыворотке крови, который позволяет заподозрить наличие онкологической патологии и оптимизировать тактику обследования и ведения пациентов. При уровне sCD25 в сыворотке крови выше 85,9 пг/мл имеется высокая вероятность наличия онкологической патологии толстого кишечника (Таблица 14).

Таблица 14 – Уровень sCD25 в сыворотке крови для определения вероятности наличия онкологической патологии толстой кишки

Параметр	Порог	Se	Sp	Ac	AUC	Тестовая статистика	Сила связи Крамера	OR
sCD25 в сыворотке крови	≥85,9	0,91	0,73	0,81	0,86 (95% ДИ 0,70- 0,94)	$\chi^2 = 32,96$ df=1, p<0,001	V=0,63, p<0,001	23,33 (95% ДИ 6,82- 79,85)

Примечания: Se – чувствительность, Sp – специфичность, Ac – точность, AUC – площадь под ROC-кривой, OR – отношение шансов

Таким образом, результаты проведенных исследований демонстрируют высокий уровень sCD25 как в сыворотке крови, так и в опухолевой ткани у больных с колоректальным раком в сравнении с пациентами, имеющими доброкачественную опухоль толстой кишки, и группой контроля. Поскольку происходит увеличение концентрации sCD25 у пациентов с опухолью толстой кишки, мы полагаем, что данная молекула вносит определенный вклад в развитие опухолевой иммуносупрессии при новообразованиях толстой кишки.

3.3. Уровень трансформирующего фактора роста- β 1 (TGF- β 1) в сыворотке крови и ткани опухоли

Исследования последних лет демонстрируют, что значимую роль в росте и развитии злокачественного новообразования играют не только контрольные иммунные точки, способствующие «ускользанию» опухоли от иммунного ответа, но и ряд белковых соединений, контролирующих процессы клеточного деления, дифференцировки клеток и апоптоза. К таким соединениям относится трансформирующий фактор роста- β 1 (Transforming growth factor β 1, TGF- β 1), который является основной изоформой TGF- β . Трансформирующий фактор роста- β 1 (Transforming growth factor β 1, TGF- β 1) – это полипептид, который является членом семейства трансформирующих ростовых факторов. Белок продуцируется активированными Т-лимфоцитами, макрофагами и тромбоцитами. Белок TGF- β 1 оказывает ингибирующее действие на иммунную систему. Также данный цитокин усиливает синтез белков межклеточного матрикса, влияет на репродуктивную способность клетки, ее рост и регенерацию. В организме TGF- β 1 секретируется в неактивной форме, после активации реализует свои функции при взаимодействии с рецептором, который объединяет в себе две рецепторных цепи TGF- β R2 и две цепи TGF- β R1.

Концентрация TGF- β 1 в опухолевой ткани у пациентов с раком толстой кишки выше в 5,9 [3,8; 7,8] раза по отношению к группе контроля (U=99,5, p<0,001). При сравнении значений уровня TGF- β 1 в ткани между пациентами с

раком толстой кишки и больными с доброкачественными новообразованиями толстого кишечника, статистически значимых различий выявлено не было ($U=336,5$, $p=0,13$). Стоит отметить, что концентрация TGF- β 1 у больных с доброкачественной опухолью толстой кишки выше группы контроля в 2,7 [1,8; 3,9] раза ($U=46,0$, $p<0,001$). Уровень TGF- β 1 в сыворотке крови у пациентов с раком толстой кишки был меньше в 1,3 [1,3; 1,5] раза по сравнению с группой контроля ($U=237,0$, $p=0,003$). Концентрация TGF- β 1 в сыворотке крови у больных с раком толстой кишки ниже по отношению к группе пациентов с доброкачественными новообразованиями толстого кишечника в 1,5 [1,2; 2,0] раза ($U=192,5$, $p<0,001$). Достоверных различий уровня TGF- β 1 в сыворотке крови у больных с доброкачественной опухолью толстой кишки и контрольной группой не обнаружено ($U=177,0$, $p=0,55$). Результаты наших исследований показывают увеличение уровня TGF- β 1 в ткани опухоли у больных с новообразованиями толстого кишечника в сравнении с контрольной группой (Таблица 15).

Таблица 15 – Уровень TGF- β 1 у больных с новообразованиями толстой кишки

Концентрация TGF- β 1, (пг/мл)	Группы исследуемых пациентов			Уровень значимости различий, p
	Контрольная группа n=25	Доброкачественная опухоль n=25	Колоректальный рак n=44	
Ткань опухоли	5,7 [5,7; 8,0]	15,3 [14,5; 22,2]	25,7 [20,9; 44,5]	$p_1<0,001$ $p_2<0,001$ $p_3=0,013$
Сыворотка крови	6,9 [6,8; 9,8]	7,9 [7,7; 10,1]	5,7 [5,7; 8,0]	$p_1=0,003$ $p_2=0,55$ $p_3<0,001$

Примечание: p_1 – уровень значимости различий показателей больных с раком и группой контроля; p_2 – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группой контроля; p_3 – уровень значимости различий показателей больных с раком и доброкачественной опухолью.

У пациентов с колоректальным раком дополнительно определяли концентрацию TGF- β 1 в ткани регионарных лимфатических узлов, которая составила 157,8 [153,3; 236,9] пг/мл.

ГЛАВА 4. ИЗМЕНЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА СУБПОПУЛЯЦИЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ОПУХОЛЬЮ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Выделяют основные популяции Т-лимфоцитов ($CD3^+$): Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$) и Т-киллеры или цитотоксические Т-лимфоциты ($CD3^+CD8^+$). Именно цитотоксические Т-лимфоциты вносят основной вклад в адаптивный клеточный иммунитет при наличии злокачественного новообразования. Основные субпопуляции $CD3^+CD8^+$ включают: наивные клетки (Naive, $CD8^+CD45RA^+CD62L^+$), центральной памяти (CM, $CD8^+CD45RA^-CD62L^+$), эффекторной памяти (EM, $CD8^+CD45RA^-CD62L^-$) и терминально-дифференцированные клетки памяти (TEMRA, $CD8^+CD45RA^+CD62L^-$). Также существуют цитотоксические Т-лимфоциты с дифференцировочным антигеном $CD57^+$ (углеводный эпитоп HNK1). Наличие $CD57^+$ позволяет характеризовать эффекторные свойства клетки. Клетки, имеющие $CD57$ на поверхности, обладают способностью выделять перфорин и играют ключевую роль в «киллинге» злокачественных клеток.

Установлено, что количество Т-клеток ($CD3^+$) в крови у больных с колоректальным раком снижается в 1,4 раза по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$) и в 1,4 раза – по отношению к пациентам с доброкачественной опухолью толстой кишки ($p < 0,002$). При сравнении показателей контрольной группы и больных с доброкачественной опухолью статистически значимых различий выявлено не было ($U=293,5$, $p=0,71$). Количество Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) у пациентов с раком толстой кишки было ниже значений группы контроля в 1,4 [1,0; 1,6] раза ($U=318,5$, $p=0,004$). При сравнении полученных значений больных, имеющих доброкачественную опухоль, с данными группы контроля ($U=237,0$, $p=0,14$) и данными пациентов с КРР ($U=437,0$, $p=0,16$) статистически значимых различий выявлено не было. Количество цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$) в крови у больных с колоректальным

раком меньше в 1,8 [1,2; 1,8] раза ($U=215,0$, $p<0,001$), чем в группе контроля, и в 1,7 [1,0; 1,8] раза ($U=313,0$, $p=0,003$) в отношении пациентов с доброкачественной опухолью. Показатели группы контроля и больных с доброкачественной опухолью статистически значимых различий не имеют ($U=257,5$, $p=0,29$) (Таблица 16).

Таблица 16 – Основные популяции Т-лимфоцитов в крови у больных с новообразованиями толстой кишки

Популяции Т-клеток, (клетки / μ L крови)	Группы исследуемых пациентов			Уровень значимости различий, p
	Контрольная группа n=25	Доброкачественная опухоль n=25	Колоректальный рак n=44	
CD3 ⁺	1846,0 [1760,0; 2039,1]	1771,0 [1648,4; 1985,3]	1262,0 [1254,6; 1670,7]	$p_1<0,001$ $p_2=0,71$ $p_3<0,002$
CD3 ⁺ CD4 ⁺	1139,0 [1021,8; 1250,0]	939,0 [866,7; 1069,0]	766,0 [765,7; 1008,4]	$p_1=0,004$ $p_2=0,14$ $p_3=0,16$
CD3 ⁺ CD8 ⁺	837,0 [737,2; 843,0]	778,0 [666,9; 838,0]	451,5 [450,0; 611,0]	$p_1<0,001$ $p_2=0,29$ $p_3=0,003$

Примечание: p_1 – уровень значимости различий показателей больных с раком и группой контроля; p_2 – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группой контроля; p_3 – уровень значимости различий показателей больных с раком и доброкачественной опухолью.

Количество цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) в крови у пациентов с колоректальным раком имеет сильную обратную корреляционную связь с концентрацией белка TIM-3, LAG-3 и среднюю обратную связь с уровнем белка CTLA-4 в ткани опухоли у больных со злокачественным новообразованием толстой кишки (Таблица 17).

Таблица 17 – Корреляционная связь количества популяций Т-лимфоцитов в крови и уровнем иммунных контрольных точек, sCD25 и TGF-β1 в ткани опухоли у пациентов с колоректальным раком

Исследуемая молекула в ткани	Популяции Т-лимфоцитов		
	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	
TIM-3	0,203 p=0,18	-0,842 p<0,001	
LAG-3	0,031 p=0,84	-0,804 p<0,001	
CTLA-4	0,175 p=0,255	-0,531 p<0,001	
CD25	-0,12 p=0,439	0,128 p=0,408	
TGF-β1	-0,208 p=0,175	-0,258 p=0,091	
Сила связи, ρ	Сильная связь	Средняя связь	Слабая связь
	от 1 до 0,7	от 0,69 до 0,3	от 0,29 до 0

Стоит отметить, что пул Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) в крови у пациентов с КРР не имеет корреляционных связей с вышеуказанными ИКТ в ткани опухоли. Поэтому нами было принято решение исследовать количество основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов в крови.

Установлено, что у пациентов с раком толстой кишки происходит снижение количества основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с контрольной группой: количество CD8⁺Naive клеток – в 2,4 раза (U=258,5, p<0,001), CD8⁺EM лимфоцитов – в 2 раза (U=267,0, p<0,001), CD8⁺CM – в 1,70 раза (U=282,5, p=0,001), CD8⁺TEMRA лимфоцитов – в 1,5 раза (U=310,0, p=0,003), CD8⁺CD57⁺ - в 1,8 раза (U=221,5, p<0,001) (Таблица 18).

Таблица 18 – Основные субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов в крови у больных с новообразованиями толстой кишки

Субпопуляции Т-лимфоцитов, (клетки/ μ L крови)	Группы исследуемых пациентов			Уровень значимости различий, p
	Контрольная группа n=25	Доброкачественная опухоль n=25	Колоректальный рак n=44	
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (Naive)	70,0 [59,8; 76,7]	54,0 [54,0; 72,2]	29,0 [29,0; 47,0]	p ₁ <0,001 p ₂ >0,05 p ₃ <0,001
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁺ (CM)	101,0 [87,6; 105,5]	101,0 [81,9; 106,1]	59,5 [55,7; 70,6]	p ₁ <0,001 p ₂ >0,05 p ₃ =0,006
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁻ (EM)	402,0 [378,0; 470,0]	455,0 [391,2; 487,9]	200,0 [200,0; 230,5]	p ₁ <0,001 p ₂ >0,05 p ₃ <0,001
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁻ (TEMRA)	212,0 [198,1; 244,1]	214,0 [182,8; 234,8]	139,5 [136,6; 177,1]	p ₁ =0,003 p ₂ >0,05 p ₃ =0,27
CD8 ⁺ CD57 ⁺	153,0 [131,9; 156,8]	129,0 [127,5; 159,2]	84,0 [81,8; 106,6]	p ₁ <0,001 p ₂ >0,05 p ₃ <0,001

Примечание: p₁ – уровень значимости различий показателей больных с раком и группой контроля; p₂ – уровень значимости различий показателей больных с доброкачественной опухолью и группой контроля; p₃ – уровень значимости различий показателей больных с раком и доброкачественной опухолью.

Кроме того, отмечается уменьшение количества субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов у больных с колоректальным раком по сравнению с больными доброкачественной опухолью: CD8⁺Naive клеток – в 1,8 раза (U=278,5, p<0,001), CD8⁺EM – в 2,2 раза (U=270,0, p<0,001), CD8⁺CM – в 1,71 раза (U=329,0, p=0,006), CD8⁺CD57⁺ лимфоцитов – в 1,5 раза (U=268,0, p<0,001). В отношении CD8⁺TEMRA статистически значимых данных не выявлено (U=373,0, p=0,27). При сравнении количественного состава, исследуемых субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов в крови у больных

доброкачественной опухоли с группой контроля статистически значимых различий выявлено не было ($p>0,05$). Для наглядной оценки полученные данные отражены на рисунках (Рисунок 5, Рисунок 6).

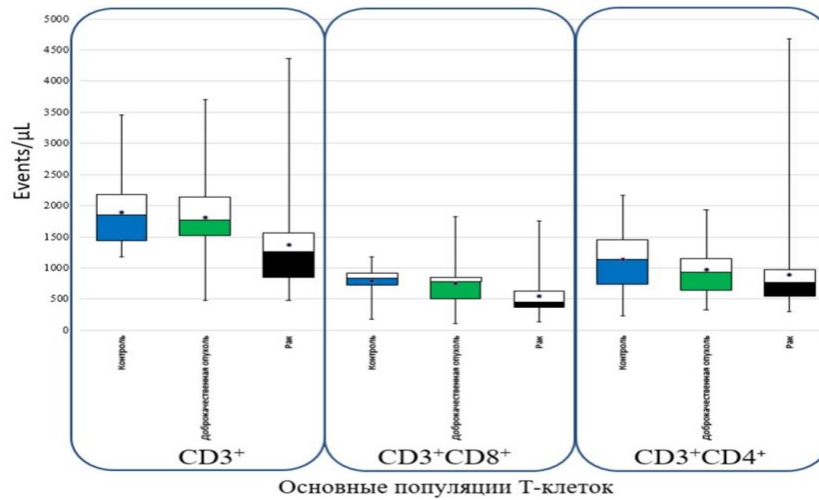


Рисунок 5 – Основные популяции Т-клеток в крови у пациентов с новообразованиями толстой кишки

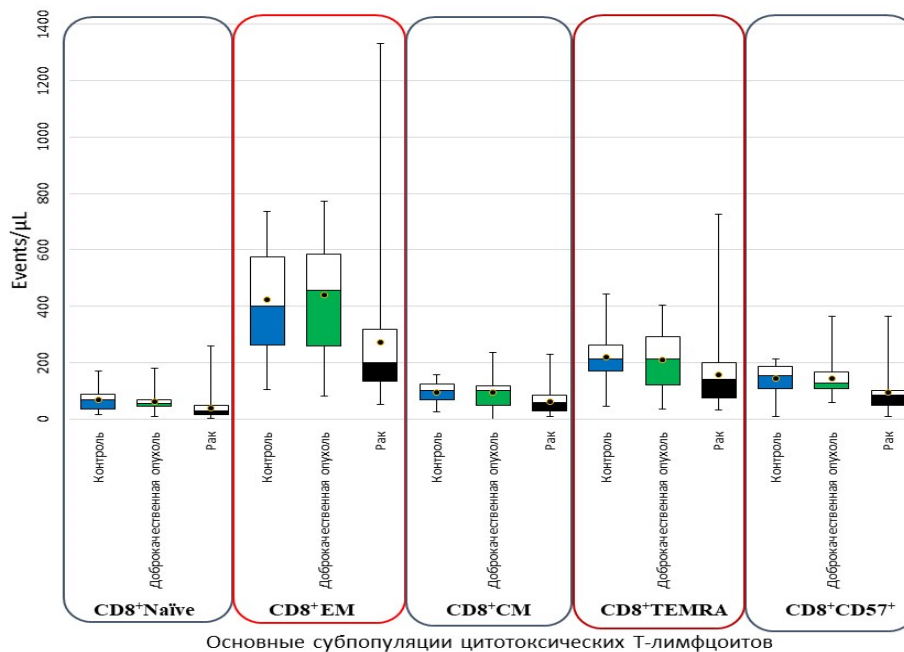


Рисунок 6 – Основные субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов в крови у пациентов с новообразованиями толстой кишки

Количество субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+CD57^+$ и $CD8^+CD45RA^-CD45R0^+CD62L^+$) в крови у пациентов с

колоректальным раком имеет сильную обратную корреляционную связь с концентрацией молекул TIM-3 и LAG-3 в ткани опухоли у больных со злокачественным новообразованием толстой кишки. Субпопуляция цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+CD45RA^+CD62L^+$, Naïve) имеет среднюю обратную корреляционную связь с уровнем белка LAG-3 в ткани злокачественной опухоли (Таблица 19).

Таблица 19 – Корреляционная связь количества субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов и уровня иммунных контрольных точек, sCD25 и TGF- β 1 в ткани опухоли у пациентов с колоректальным раком

Исследуемая молекула в ткани	Основные субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов			
	$CD8^+CD45RA^+CD62L^+$ (Naive)	$CD8^+CD45RA^-CD62L^-$ (EM)	$CD8^+CD45RA^-CD62L^+$ (CM)	$CD8^+CD57^+$
TIM-3	0,186 p=0,227	0,091 p=0,561	-0,801 p<0,001	-0,781 p<0,001
LAG-3	0,536 p<0,001	0,219 p=0,153	-0,757 p<0,001	-0,776 p<0,001
CD25	0,114 p=0,46	0,181 p=0,24	0,086 p=0,58	0,013 p=0,93
TGF- β 1	-0,209 p=0,17	-0,169 p=0,27	-0,289 p=0,057	0,094 p=0,543
Сила связи, ρ	Сильная связь	Средняя связь		Слабая связь
	от 1 до 0,7	от 0,69 до 0,3		от 0,29 до 0

Высокая концентрации иммунных контрольных точек (TIM-3 и LAG-3) в опухолевой ткани у больных с раком толстой кишки приводит к угнетению адаптивного иммунитета, выражающееся в уменьшении количества цитотоксических Т-лимфоцитов в крови. Основным патогенетическим механизмом действия молекул TIM-3 и LAG-3 при колоректальном раке является снижение количества субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+CD57^+$), продуцирующих цитолитические молекулы – гранзимы и

перфорины, благодаря которым происходит уничтожение опухолевых клеток путем контактного цитолиза; а также цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+CD45RA^-CD45RO^+CD62L^+CCR7^+$), экспрессирующих адгезионную молекулу CD62L и хемокиновый рецептор CCR7, которые определяют миграционную способность Т-клеток в лимфоидные органы.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Колоректальный рак является одной из ведущих причин смертности у онкологических больных во всем мире и ежегодно приводит к смерти более 700 000 пациентов [111]. Современные методы лечения рака толстой кишки включают оперативное пособие, лучевую терапию, лекарственную терапию. Несмотря на комплексный подход в лечении злокачественных новообразований толстой кишки, прогноз для жизни пациентов остается неблагоприятным, а средняя продолжительность жизни таких больных составляет от 3 до 5 лет [70]. Для улучшения показателей выживаемости ведется разработка новых видов лечения [14]. В этом плане наиболее перспективным направлением является таргетная терапия [9, 140]. Основным направлением иммунотерапии при раке является блокирование определенных молекул, отвечающих за регулирование иммунного ответа, которые получили название иммунные контрольные точки [164]. Иммунные контрольные точки – это обобщающее понятие регуляторной системы иммунитета, включающее в себя ко-ингибирующие и ко-стимулирующие молекулы [11]. Эта система предназначена для предотвращения развития гиперреактивности иммунного ответа и исключения повреждения собственных тканей [99]. Однако злокачественные клетки используют ИКТ для «ускользания» от иммунного надзора и снижения активности адаптивного иммунитета, что способствует росту и развитию рака [40]. Открытие и изучение новых белков, которые играют роль в «ускользании» рака от иммунного надзора ознаменовало поиск способов влияния на эти молекулы. В 1996 году получены первые результаты клинических испытаний моноклональных антител, блокирующих CTLA-4 на мышинных моделях [16]. Полученные данные инициировали крупные исследования (CheckMate) применения этих препаратов у пациентов с меланомой и раком молочной железы, что также привело к получению значимых клинических результатов [14, 16]. Был разработан препарат – ипилимумаб, который блокирует взаимодействие CTLA-4 со своим лигандом

(B7-2) [16]. В 2011 году препарат был одобрен управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств на территории США (U.S., Food and Drug Administration, FDA). Исследования последних лет показывают выполнение программ, изучающих применение моноклональных антител к другим ИКТ (PD-1, TIM-3, LAG-3) при различных локализациях злокачественного процесса [11, 14]. Препарат пембролизумаб (антитела к PD-1) был включен в стандарт лечения пациентов с КРР, которые имеют неоперабельный процесс или запущенные формы заболевания, но к значимым терапевтическим эффектам это не привело [86]. В настоящее время ведется исследование микроокружения опухоли и поиск различных сигнальных путей при раке толстой кишки, которые играют более значимую роль в патогенезе колоректального рака.

Как было сказано выше, микроокружение опухоли при колоректальном раке является важным звеном для изучения и понимания особенностей патогенеза опухолевого роста. В исследовании Salman M. Toor (2019) изучены образцы сыворотки крови и ткани опухоли у пациентов с КРР [81]. Цель исследования заключалась в детальном изучении CD4⁺T-клеток и CD4⁺CD25⁺T-регуляторных клеток, а также экспрессии CTLA-4 на их поверхности. Было выявлено значительное увеличение количества CD4⁺T-клеток в образцах опухолевой ткани по сравнению с группой контроля. При детальном изучении также отмечалась значительная экспрессия CD4⁺CD25⁺T-регуляторных клеток с экспрессией белка CTLA-4 [81]. Интересно то, что циркулировавшая популяция CD4⁺T-клеток в крови состояла из наивных T-клеток, а в ткани определялась популяция, состоявшая из клеток памяти. Мы установили, что количество CD3⁺CD4⁺-клеток уменьшается у пациентов с КРР по сравнению с больными доброкачественной опухолью и группой контроля [12]. Мы полагаем, что уменьшение количества T-хелперов способствует развитию опухолевой иммуносупрессии. Однако количество T-хелперов при раке толстой кишки не имело корреляционных связей с концентрацией ИКТ в ткани злокачественной опухоли [12]. В нескольких исследованиях изучали количество клеток популяций T-лимфоцитов (CD4⁺, CD8⁺) в ткани опухоли. У пациентов с запущенными формами КРР отмечалось,

что количество $CD8^+$ Т-клеток было ниже, чем у группы контроля [61]. Нами получены схожие данные, в дополнении мы установили корреляционную связь между низким количеством популяций Т-лимфоцитов и концентрацией ИКТ в ткани злокачественной опухоли. Полученные данные указывают на роль ИКТ в снижении адаптивного иммунитета [2, 12]. К тому же, высокая концентрация $CD4^+CD25^+$ Т-регуляторных клеток с высокой экспрессией CTLA-4 на поверхности и низкая плотность пула $CD8^+$ Т-клеток коррелировали с плохим прогнозом у пациентов с КРР [61, 81]. Нами также получены данные, которые демонстрируют увеличение уровня белка CTLA-4 и его лиганда В7-2 в сыворотке крови и ткани опухоли у пациентов с колоректальным раком [16].

Известно, что белок CTLA-4 экспрессируется на $CD4^+CD25^+$ Treg и усиливает их функциональные возможности в снижении иммунитета [67]. Значительная концентрация $CD4^+CD25^+CTLA4^+$ Treg и низкий пул $CD8^+$ Т-клеток в ткани опухоли, а также корреляционная связь с запущенной формой заболевания указывают на то, что CTLA-4 может играть роль в канцерогенезе рака толстой кишки [61, 81]. Однако, особенности механизмов пролиферации и перемещения разных популяций Т-клеток в микроокружении опухоли еще предстоит выяснить. В нашем исследовании отмечена высокая концентрация sCD25 в ткани опухоли и сыворотке крови, что может свидетельствовать о высокой экспрессии этой молекулы на поверхности регуляторных Т-клеток, и подтверждает ее вклад в прогрессировании злокачественного процесса [5, 7, 15].

Регуляторные Т-клетки играют важную роль в патогенезе роста и развития злокачественного новообразования толстой кишки. Высокий пул Treg способствует снижению активности цитотоксических лимфоцитов, которые путем контактного цитолиза уничтожат клетки опухоли [120]. В исследовании Н.Fujimoto изучался уровень $CD8^+$ Т-лимфоцитов в опухолевой ткани у пациентов с КРР, а также экспрессия PD-1 на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов [54]. Было выдвинуто предположение, что белок PD-1 выступает в качестве отрицательного иммунного регулятора для цитотоксических Т-лимфоцитов при раке толстой кишки [14, 54]. Результаты исследования показали увеличение

количества CD8⁺T-клеток с высокой экспрессией белка PD-1 в сравнении с нормальной тканью толстой кишки. К тому же у CD8⁺PD-1⁺T-клеток отмечалось нарушение синтеза IFN- γ (интерферон гамма) в сравнении с цитотоксическими T-лимфоцитами без экспрессии PD-1 [54]. Вышеописанные данные могут указывать на роль PD-1 в отрицательной регуляции адаптивного иммунитета против опухолевых клеток. Кроме этого, было изучено взаимодействие между пулами регуляторных и эффекторных клеток в ткани опухоли. Была культивирована меченая клеточная культура цитотоксических T-лимфоцитов из ткани нормальной толстой кишки вместе с культурой Treg из ткани злокачественной опухоли. При изучении клеточного состава было отмечено снижение пролиферации меченых CD8⁺T-лимфоцитов в присутствии Treg из злокачественной опухоли при сравнении с пулом цитотоксических лимфоцитов без присутствия регуляторных T-клеток. К тому же было обнаружено снижение продуцирования CD8⁺T-клетками таких цитокинов, как IFN- γ , IL-2 и TNF- α [54]. В совокупности эти результаты демонстрируют, что популяция Treg в микроокружении злокачественной опухоли и высокая экспрессия PD-1 на поверхности цитотоксических T-лимфоцитов ингибируют активность клеток адаптивного иммунного ответа и способствуют росту и развитию злокачественной опухоли. Нами установлено, что уровень белка PD-1 и его лиганда PD-L1 в сыворотке крови и ткани опухоли отличался в исследуемых группах. Однако, полученные данные не имели статистически значимых различий. В обзоре литературы автора Zhang X., были описаны результаты применения моноклональных антител к PD-1 у пациентов с КРР [43]. Полученные данные свидетельствуют о незначительных успехах этого вида таргетной терапии у пациентов с раком толстой кишки [43]. Это отражает, что белок PD-1 и его лиганд не имеют ведущего значения в канцерогенезе при колоректальном раке, что также перекликается с нашими данными [11, 14, 43]. Интерес также вызывают данные Vandarus S (2022), которые показывают увеличение количества Treg в зависимости от морфологического варианта опухоли [138]. В исследовании были рассмотрены ткани злокачественной опухоли толстой кишки, доброкачественной опухоли и

нормальной ткани. Полученные результаты продемонстрировали, что плотность регуляторных Т-клеток в злокачественной ткани выше, чем в доброкачественной опухоли. В свою очередь в ткани аденомы показатели выше, чем в контрольной группе [138]. Эти результаты могут свидетельствовать, что Treg способствуют злокачественной трансформации клетки. Учитывая результаты наших исследований, мы полагаем, что увеличение количества Treg и высокая концентрация ИКТ опосредуют процессы ускорения злокачественной трансформации путем формирования опухолевой иммуносупрессии [11, 14, 18].

Регулирование иммунного ответа осуществляется несколькими ко-ингибирующими ИКТ, одной из них является TIM-3 [13]. Роль белка TIM-3 в патогенезе рака толстой кишки была не изучена, что послужило началом многих исследований в последние годы [14]. Существуют результаты исследований, которые указывают, что высокая экспрессия белка TIM-3 на поверхности CD4⁺Т-клеток играет роль в росте злокачественной опухоли при КРР путем угнетения активности этих клеток [27, 49, 135]. Данные исследования показывают, что количество Т-хелперов с высокой экспрессией TIM-3 имеет корреляционную связь с поздней стадией заболевания [27, 49]. Полученные данные указывают на роль TIM-3 в прогрессировании заболевания. Нами были получены данные, которые указывают на отсутствие корреляционных связей концентрации TIM-3 в ткани и количеством Т-хелперов в крови [12]. Однако в исследованиях автора R. Saleh была установлена корреляционная связь между высоким уровнем белка TIM-3 в ткани опухоли и количеством Treg. На фоне высокого количества Treg снижалась продукция цитокинов [63]. Высокая экспрессия TIM-3 была выявлена на поздних стадиях процесса, что также свидетельствует в пользу роли TIM-3 в прогрессировании заболевания [63]. Результаты наших исследований показывают значительное увеличение уровня TIM-3 и его лиганда Galectin-9 в сыворотке крови и ткани опухоли при сравнении с другими ИКТ. Также в нашем исследовании получены данные о сильной обратной корреляционной связи между цитотоксическими Т-лимфоцитами и концентрацией TIM-3 в ткани злокачественной опухоли. Это свидетельствует о том, что точкой воздействия

ТІМ-3 является популяция цитотоксических Т-лимфоцитов, которые играют ключевую роль в адаптивном клеточном иммунитете. В дополнении к вышесказанному, отмечается уменьшение количества $CD8^+CD57^+$ Т-лимфоцитов, которые отвечают за продукцию гранзимов и перфоринов, играющих основную роль в уничтожении клеток рака. Учитывая выявленную сильную обратную корреляционную связь с белками ТІМ-3 и LAG-3, нашей целью в дальнейшем является изучение экспрессии этих молекул на $CD8^+CD57^+$ Т-лимфоцитах. Стоит отметить полученные данные, указывающие на порог уровня белка ТІМ-3 и его лиганда Galectin-9 в сыворотке крови для возможности ранней диагностики онкологической патологии толстого кишечника.

Изучение микроокружения опухоли позволило получить данные о количестве ТІЛs в ткани, а также их связи с клиническими и морфологическими особенностями. В исследованиях Shirin (2022) был изучен ряд популяций ТІЛs и экспрессия белка LAG-3 на их поверхности в ткани опухоли пациентов с КРР. Основные исследуемые популяции были представлены $CD3^+$, $CD8^+$, $CD45^+$ Т-клетками [149]. В ткани отмечался высокий уровень $CD8^+$ и $CD45^+$ Т-клеток, а также их корреляционная связь с более длительной выживаемостью пациентов. Такая связь предсказуема, ведь CD45 обычно является маркером клеток памяти и способствует быстрому иммунному ответу на уже известные антигены. Пул $CD8^+$ Т-клеток предназначен для деструкции клеток опухоли путем контактного цитолиза. Стоит отметить, что популяции этих клеток не показали высокого уровня LAG-3 на своей поверхности [149]. При сравнении полученных данных автором Shirin и результатов нашего исследования стоит отметить, что высокий уровень LAG-3 в ткани злокачественной опухоли коррелирует с низким количеством цитотоксических Т-лимфоцитов центральной памяти [12]. В дополнение стоит отметить, что низкое количество цитотоксических Т-лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD8^+CD57^+$ также имеет связь с высоким уровнем ИКТ в ткани, что указывает на роль ИКТ в развитии опухолевой иммуносупрессии при КРР и дополняет данные автора Shirin. В исследовании автора Slevin M. выявлен высокий уровень белка LAG-3 на поверхности Т-

лимфоцитов в ткани толстой кишки у пациентов с язвенным колитом [100]. Изученные Т-клетки активно продуцировали IFN γ и IL-17, что указывает на эффекторные функции этих популяций [100]. Полученные данные свидетельствуют, что высокое количество Т-клеток с экспрессией LAG-3 в случае рака толстой кишки является отличной точкой воздействия. Угнетение активности различных субпопуляций Т-лимфоцитов, которые могут отвечать за миграцию и сигнализирование о злокачественном процессе также способствует прогрессированию опухоли. Другое исследование, демонстрирует, что высокий уровень LAG-3 на поверхности TILs имеет связь с размерами опухоли и более глубокой инвазией слоев стенки толстой кишки [149]. Полученные нами результаты показывают увеличение уровня LAG-3 в сыворотке крови и ткани опухоли у больных с КРР в сравнении с контрольной группой. Белок LAG-3 влияет на локальный рост и развитие опухоли, что подтверждается данными о его корреляционной связи с глубокой инвазией опухоли и размерами новообразования [149]. Уменьшение количества цитотоксических Т-лимфоцитов в крови у пациентов с КРР имеет сильную обратную корреляционную связь с LAG-3 в ткани злокачественной опухоли, что подтверждено полученными данными в этом исследовании. Мы полагаем, что LAG-3 вносит вклад в прогрессировании рака толстой кишки путем формирования опухолевой иммуносупрессии [18].

Однако кроме иммунных контрольных точек существует ряд молекул, которые также способствуют росту и развитию злокачественного новообразования [124]. Ряд исследований свидетельствует о том, что белок TGF- β 1 играет двойную роль в канцерогенезе, и это часто зависит от стадии заболевания [73, 113]. В нормальных физиологических условиях цитокин TGF- β 1 выступает как опухолевый супрессор, который предупреждает рост эпителиальных клеток через активацию апоптоза и снижение экспрессии белка VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), а также не дает опухолевым клеткам формировать новые сосудистые сети [58]. Эти данные были подтверждены в исследовании Zhao при изучении уровня белка TGF- β 1 в ткани опухоли у

пациентов с ранними стадиями (I, II) рака толстой кишки [58]. Данные других клинических испытаний показывают, что высокий уровень TGF- β 1 способствует прогрессированию злокачественного процесса [28]. Получены данные, в которых была изучена концентрация TGF- β 1 у пациентов с раком толстой кишки с запущенной стадией заболевания [157]. Установлено, что высокий уровень TGF- β 1 влияет на снижение количества молекул микро-РНК (miR-130b), а это в свою очередь приводит к высокому уровню интегрин альфа-5 и миграции злокачественных клеток за пределы первичного очага [36, 156]. В 2022 году группа ученых во главе с Wodzinski провела клиническое исследование, целью которого было выявление уровня TGF- β 1 у пациентов с КРР [25]. Также основной задачей стало определение корреляционных связей с клинико-патологическими особенностями исследуемых. Образцы ткани опухоли больных с КРР показали высокий уровень TGF- β 1. У пациентов, которые имели запущенные формы заболевания, содержание TGF- β 1 было наибольшим, в особенности у пациентов с метастатическим поражением печени. Эти данные подтверждают роль белка TGF- β 1 в отдаленном метастазировании [25]. Помимо интегрин альфа-5 стимулирование миграции злокачественных клеток связано с такими факторами транскрипции как SNAI1 и SNAI2 (Snail family transcription repressor 1/2), HMGA1 (High mobility group protein), ZEB1 и ZEB2 (Zink finger E-box-binding homeobox 1) и TWIST1 (Twist basic helix-loop-helix transcription factor 1) [95]. Повышенная экспрессия вышеперечисленных факторов транскрипции обусловлена высоким содержанием белка TGF- β 1. В результате чего белки адгезии клетки – E-кадгерин и γ -катенин – теряют свои функции, такие изменения приводят к возникновению разрыва связей между клетками и возникновению у них большой подвижности [25, 143]. Более того, высокая экспрессия TGF- β 1 у пациентов с прогрессирующим колоректальным раком имела корреляционную связь с низким количеством Т-клеток в микроокружении опухоли. Отмечается снижение пула Т-хелперов, которые продуцируют IFN γ , IL-2, TNF- α [141]. Результаты наших исследований показали увеличение уровня TGF- β 1 в ткани опухоли у больных с новообразованиями толстого кишечника в

сравнении с контрольной группой [17]. Мы полагаем, что полученные нами данные и выявленное уменьшение количества основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов в крови у пациентов с КРР свидетельствуют о том, что белок TGF- β 1 и ко-ингибирующие ИКТ могут совместно снижать активность Т-лимфоцитов и играть роль в формировании опухолевой иммуносупрессии [8,17].

Высокая плотность TILs в микроокружении опухоли является благоприятным прогностическим фактором для пациентов с некоторыми локализациями злокачественного процесса [32]. Однако клетки опухоли способны модулировать иммунную среду и «ускользнуть» от иммунного ответа. Регуляторные Т-клетки (Tregs) играют важную роль в подавлении иммунного ответа, который направлен против злокачественной опухоли [5, 107]. Регуляторные Т-клетки с фенотипом CD4⁺CD25⁺ считались популяцией с выраженной иммуносупрессивной функцией, но позже было установлено, что фактор транскрипции FOXP3 играет решающую роль в развитии способности Tregs ингибировать иммунный ответ [7, 125]. В настоящее время белок FOXP3 является основным маркером для идентификации регуляторных Т-клеток [162]. Также установлено, что экспрессия CD25⁺ на поверхности регуляторных Т-клеток с экспрессией FOXP3⁺ является определяющим фактором в иммуносупрессивной активности [37]. Было установлено, что уровень экспрессии CD25 в Tregs с фенотипом CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ является ключевым для понимания характера воздействия на иммунный ответ [28]. Анализ данных исследования показал, что CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Tregs с высоким уровнем экспрессии CD25 оказывают прямое негативное воздействие на окружающие клетки иммунной системы в микроокружении опухоли. Негативный эффект проявляется лишением эффекторных клеток IL-2, что приводит к снижению выработки цитокинов и истощению эффекторных Т-лимфоцитов [28]. Основываясь на вышеописанных данных, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ регуляторные Т-клетки с высоким уровнем экспрессии CD25 являются потенциальной иммунотерапевтической мишенью [5,15]. В настоящее время ведутся доклинические исследования, изучающие

избирательное истощение Tregs с высокой экспрессией CD25 [160]. Стоит обратить внимание на интересные данные, которые показали парадоксальную корреляционную связь между Treg и длительностью выживаемости у пациентов с КРР и раком пищевода [23]. Высокий уровень Tregs в ткани опухоли у пациентов с КРР имел прямую корреляционную связь с более длительным периодом выживаемости. Авторы предположили, что экспрессия разных дифференцировочных антигенов на поверхности Tregs значительно меняет их функции [23]. Также активация клеточного иммунного ответа сопровождается повышенной экспрессией рецептора интерлейкина-2 на клетках иммунитета, что в свою очередь также приводит к увеличению концентрации растворимой формы sCD25 в кровотоке [119]. Поэтому sCD25 может быть использован как самостоятельный биологический маркер для ранней диагностики злокачественных новообразований [5]. Результаты наших исследований показывают увеличение уровня sCD25 в сыворотке крови и ткани опухоли у больных с новообразованием толстого кишечника в сравнении с контрольной группой [15]. Наиболее высокие значения уровня sCD25 отмечаются у пациентов с колоректальным раком. Уменьшение количества основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов в крови у пациентов с КРР указывает на то, что CD25 вносит вклад в угнетение Т-клеточного иммунного ответа [7, 12]. Мы полагаем, что снижение клеток с фенотипом $CD3^+CD8^+$ опосредовано не только воздействием CD25. Высокая экспрессия CD25 на регуляторных Т-клетках способствует их взаимодействию с IL-2 и истощению эффекторных Т-клеток (цитотоксические Т-лимфоциты) [7, 8]. В дальнейшем мы планируем изучить количественный состав регуляторных Т-клеток в ткани опухоли и сыворотке крови, а также их корреляционную связь с $CD8^+CD57^+$ Т-клетками, что является перспективным направлением в изучении механизмов развития опухолевой иммуносупрессии в патогенезе рака толстой кишки.

Роль ко-ингибирующих иммунных контрольных точек в канцерогенезе рака толстой кишки, подтверждена многими клиническими исследованиями и данными нашего исследования [13, 14, 18]. Однако помимо ко-ингибирующих

иммунных точек, которые активно используются опухолевыми клетками для «ускользания» от иммунного надзора, существуют и ко-стимулирующие ИКТ [10]. Воздействие на эти ИКТ позволяет активировать Т-лимфоциты. Гликопротеин 4-1BB, а также его уникальная способность усиливать эффекторные свойства Т-лимфоцитов, делает белок 4-1BB уникальной и привлекательной мишенью для иммунотерапии [10, 20]. Лекарственная терапия антителами к 4-1BB способствует стимуляции пролиферации цитотоксических Т-лимфоцитов и увеличению их потенциала за счет увеличения выработки гамма-интерферона. Воздействие на 4-1BB стимулирует Т-лимфоциты на уничтожение клеток рака [10]. Стимуляция 4-1BB на поверхности дендритных клеток индуцирует созревание последних и усиливает способность презентации антигена [163]. Кроме того, стимулированные дендритные клетки начинают экспрессировать IL-12 и IL-27, а также фермент IDO для активации Т-клеток [167].

Адаптивная Т-клеточная терапия, основанная на агонистических моноклональных антителах к 4-1BB, приводит к высокой противоопухолевой активности у пациентов с лимфомой и лейкозом [19, 20]. Однако, такой вид иммунотерапии способствует активации Т-лимфоцитов и NK-клеток за пределами опухолевого поражения. Длительное применение препарата приводит к развитию системной токсичности. Стоит также отметить, что в исследованиях автора Hinner, продемонстрирована эффективность локальной доставки в опухолевую ткань специфичных антител к гликопротеину 4-1BB, что значительно снижает развитие системной токсичности (нарушение целостности тканевых барьеров, развитие тиреоидитов, гепатитов, миастении) [159]. Разработан белок PRS-343, способный активировать 4-1BB, а также HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2). После локальной доставки белка PRS-343 в ткань опухоли отмечается увеличение содержания IL-2 и рост пула CD8⁺Т-клеток на фоне отсутствия признаков системной токсичности [159]. Исследование в настоящий момент вступило в фазу клинических испытаний, результаты не опубликованы.

Нами установлено увеличение концентрации 4-1BB в сыворотке и ткани опухоли у пациентов с новообразованием толстой кишки. Также нами выявлено снижение количества основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов в крови у пациентов с КРР [10, 12]. Мы полагаем, что высокий уровень экспрессии 4-1BB обусловлен активацией адаптивного иммунного ответа. Однако, концентрации 4-1BB не достаточно для прекращения развития опухолевой иммуносупрессии на фоне высокого уровня нескольких ко-ингибирующих иммунных контрольных точек (TIM-3, LAG-3, CTLA-4) [11, 14].

Комплекс противоопухолевых механизмов защиты от злокачественных клеток (онкорезистентность) включает в себя антиканцерогенные, антимутационные и антицеллюлярные механизмы [45]. Внимание заслуживают антицеллюлярные механизмы, в особенности специфические механизмы (иммунные). Активным компонентом иммунитета против злокачественной опухоли является адаптивный клеточный иммунный ответ, который реализуется цитотоксическими Т-лимфоцитами. В особенности CD8⁺CD57⁺Т-лимфоциты, продуцирующие молекулы гранзим и перфорин, благодаря которым происходит уничтожение опухолевых клеток путем контактного цитолиза. Исследования последних лет показывают, что важную роль в росте, развитии и малигнизации опухоли играет собственная иммунная система [68].

При повреждении или изменении активности гена, ответственного за деление клеток, происходит процесс трансформации нормальной клетки эпителия толстой кишки в злокачественную, что приводит к активации врожденного и адаптивного иммунного ответа [60]. Стимуляция иммунитета сопровождается увеличением выработки ИКТ (LAG-3 и TIM-3) на поверхности Т-лимфоцитов, АПК, дендритных клеток и НК-клеток. В свою очередь на опухолевых клетках экспрессируется Galectin-9, который является лигандом TIM-3. Взаимодействие белка TIM-3 на поверхности Т-клеток и лиганда Galectin-9 приводит к угнетению Т-клеточного иммунного ответа и снижению количества цитотоксических Т-лимфоцитов [41, 42]. Основным патогенетическим механизмом действия молекул TIM-3 и LAG-3 при колоректальном раке является снижение количества

субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов с фенотипом CD8⁺CD57⁺, продуцирующих гранзимы и перфорины, которые уничтожают опухолевые клетки путем контактного цитолиза. Кроме того, высокий уровень белков TIM-3 и LAG-3 в опухолевой ткани и сыворотке крови приводит к уменьшению количества цитотоксических Т-лимфоцитов центральной памяти, экспрессирующих адгезионную молекулу CD62L и хемокиновый рецептор CCR7, которые определяют миграционную способность Т-клеток в лимфоидные органы. Вышеописанные патогенетические механизмы приводят к развитию опухолевой иммуносупрессии и прогрессированию опухоли (Рисунок 7).

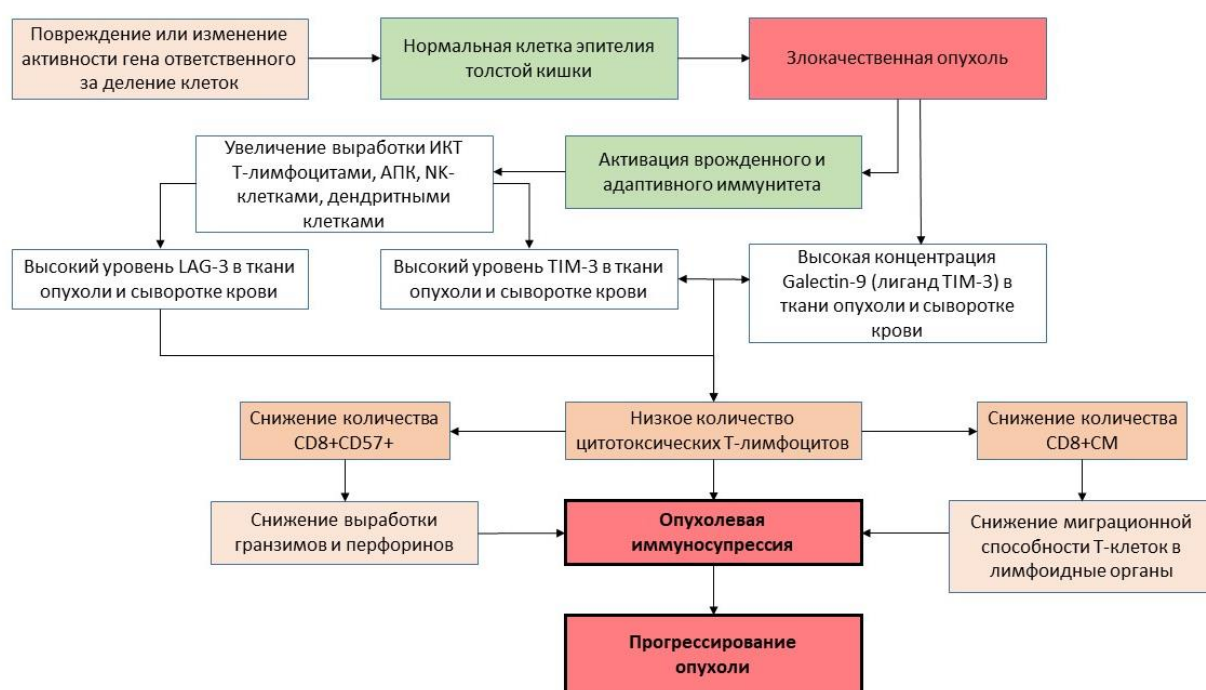


Рисунок 7 – Роль иммунных контрольных точек в развития опухолевой иммуносупрессии при раке толстой кишки.

Также мы полагаем, что развитию опухолевой иммуносупрессии в микроокружении опухоли способствуют регуляторные Т-клетки с высокой экспрессией дифференцировочного антигена CD25, который влияет на истощение эффекторных Т-клеток [23]. Стоит отметить и роль белка TGF- β 1, который активно способствует канцерогенезу при раке толстой кишки на поздних стадиях заболевания. Белок TGF- β 1 оказывает влияние на факторы транскрипции, это приводит к повреждению белков адгезии, что способствует началу раннего

метастазирования [143, 165]. Для обобщения и структурирования полученных данных мы предлагаем схему, которая отражает роль иммунных контрольных точек в патогенезе опухолевой иммуносупрессии при раке толстой кишки.

В результате диссертационного исследования выявлено центральное звено патогенеза развития опухолевой иммуносупрессии при раке толстой кишки. Показано, что высокая концентрация молекул TIM-3, Galectin-9 и LAG-3 в ткани опухоли и сыворотке крови приводит к угнетению адаптивного иммунитета, что проявляется уменьшением количества Т-клеток ($CD3^+$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$) в крови у пациентов с колоректальным раком. Установлено, что основной механизм патогенеза развития опухолевой иммуносупрессии при раке толстой кишки заключается в снижении количества субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+CD57^+$), что является следствием действия белков TIM-3 и LAG-3. В свою очередь это приводит к уменьшению продукции цитолитических молекул – гранзимов и перфоринов, которые путем контактного цитолиза уничтожают злокачественные клетки. Также происходит снижение количества субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов центральной памяти ($CD3^+CD8^+CD45RA^-CD45RO^+CD62L^+CCR7^+$), продуцирующих адгезионную молекулу CD62L и хемокиновый рецептор CCR7, которые определяют миграционную способность Т-клеток в лимфоидные органы.

ВЫВОДЫ

1. В ткани опухоли у больных раком толстой кишки увеличивается концентрация ко-ингибирующих молекул (CTLA-4, TIM-3, LAG-3) и их лигандов (B7-2, Galectin-9). Наибольший вклад в формирование опухолевой иммуносупрессии при колоректальном раке вносит белок TIM-3 и его лиганд Galectin-9. У больных колоректальным раком в сравнении с доброкачественными новообразованиями в опухолевой ткани возрастает уровень TIM-3 в 11,4 раза, Galectin-9 – в 3,4 раза, B7-2 – в 1,5 и LAG-3 – в 1,8 раза. Увеличение концентрации CTLA-4 в ткани опухоли при доброкачественных и злокачественных новообразованиях толстого кишечника носит неспецифический характер и не зависит от вида опухоли. При колоректальном раке в опухолевой ткани возрастает концентрация ко-стимулирующей молекулы 4-1BB в 2,1 раза в сравнении с контролем и в 1,4 раза – по отношению к доброкачественным опухолям.

2. Уровень растворимой формы ко-ингибирующих молекул (CTLA-4, TIM-3, LAG-3) и их лигандов (B7-2, Galectin-9), ко-стимулирующей молекулы (4-1BB) в сыворотке крови у пациентов с опухолями толстой кишки превышает значения контрольной группы, за исключением LAG-3 у пациентов с доброкачественной опухолью толстой кишки. У больных с колоректальным раком по отношению к доброкачественным новообразованиям в сыворотке крови возрастает уровень растворимых форм TIM-3 в 7,3 раза, Galectin-9 – в 4,4 и LAG-3 – в 2,4 раза. Увеличение концентрации CTLA-4 и его лиганда B7-2, а также ко-стимулирующей молекулы 4-1BB в сыворотке крови при доброкачественных и злокачественных новообразованиях толстого кишечника не зависит от характера роста опухоли. Уровень растворимой формы CTLA-4 в сыворотке крови имеет прямую среднюю корреляционную связь с концентрацией данного белка в опухолевой ткани. Концентрация TIM-3 в сыворотке крови имеет прямую сильную корреляционную связь с уровнем данной молекулы в ткани новообразования.

3. Концентрация растворимой формы субъединицы α -рецептора интерлейкина-2 (CD25) в ткани опухоли у больных с колоректальным раком превышает показатели группы контроля в 6,7 раза, больных с доброкачественной опухолью толстой кишки – в 2,1 раза. Выявлена высокая концентрация трансформирующего фактора роста- β 1 (TGF- β 1) в ткани опухоли как при злокачественных, так и при доброкачественных новообразованиях.

4. В крови у больных раком толстой кишки уменьшается количество Т-клеток (CD3⁺) в 1,4 раза в сравнении с группой контроля, Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) – в 1,4 раза, цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) – в 1,85 раза. Выявлена сильная обратная корреляционная связь количества цитотоксических Т-лимфоцитов в крови с концентрацией TIM-3 и LAG-3 в ткани опухоли у больных с колоректальным раком.

5. У больных раком толстой кишки снижается количество субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с контролем: CD8⁺Naive – в 2,4 раза, CD8⁺EM – в 2 раза, CD8⁺CM – в 1,7 раза, CD8⁺CD57⁺ клеток – в 1,8 раза. Установлена сильная обратная корреляционная связь между высоким уровнем коингибирующих иммунных контрольных точек (TIM-3 и LAG-3) в опухолевой ткани и низким количеством субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺CD57⁺), продуцирующих гранзимы и перфорины; а также сильная обратная связь с количеством цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺CM), экспрессирующих адгезивную молекулу CD62L и хемокиновый рецептор CCR7, которые определяют миграционную способность иммунных клеток.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для ранней диагностики онкологической патологии толстой кишки показано исследование концентрации белка CTLA-4 и его лиганда В7-2 в сыворотке крови с применением полученных значений в уравнении следующего вида: $K = \frac{1}{1 + e^{3,25 - 0,42 * CTLA4_{сыв} - 0,03 * B7-2_{сыв}}}$, где CTLA-4_{сыв} – уровень белка CTLA-4 в сыворотке крови; В7-2_{сыв} – уровень В7.2 в сыворотке крови; 3,25 – константа уровня логистической регрессии; 0,42 и 0,03 – нестандартизированные коэффициенты, е-экспонента ~ 2,72. Применение уравнения позволяет получить значение коэффициента К. При уровне коэффициента $K \geq 0,59$ определяется высокая вероятность онкологической патологии толстого кишечника.

На основании полученных данных разработана компьютерная программа для определения вероятности онкологической патологии толстого кишечника, рекомендуемая для использования в клинической практике (Свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ № 2022613721).

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Требуется проведение дополнительных исследований ко-ингибирующих контрольных точек на поверхности различных популяций Т-лимфоцитов в ткани опухоли у пациентов с колоректальным раком. Полученные данные позволят выявить особенности механизма возникновения, формирования и дифференцировки Т-лимфоцитов в условиях опухолевой иммуносупрессии при колоректальном раке, что позволит раскрыть тонкие механизмы патогенеза опухолевого роста в целях терапевтического воздействия для прекращения или предупреждения развития заболевания.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ИКТ – иммунные контрольные точки
- АПК – антигенпрезентирующая клетка
- KPP – колоректальный рак
- CTLA-4 – цитотоксический Т- лимфоцитарно-ассоциированный белок-4
- TILs – инфильтрирующие опухоль лимфоциты
- PD-1 – белок запрограммированной клеточной гибели
- NK – естественные киллеры
- DC – дендритные клетки
- PD-L1 – лиганд к PD-1
- SHP – протеинтирозинфосфатаза
- PI3K – фермент фосфоинозитид-3-киназа
- Akt – альфа серин треонин протеинкиназа
- TIM-3 – белок-3, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и домен муцина
- Galectin-9 – лиганд к TIM-3
- Bat3 – рекомбинантный белок человека
- TCR – Т-клеточный рецептор
- LAG-3 – ген активации лимфоцитов -3
- MHC-II – главный комплекс гистосовместимости класс II
- 4-1BB – белок 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей
- CD25 – субъединица альфа рецептора интерлейкина-2
- IFN- γ – интерферон- γ
- TNF- α – фактор некроза опухолей- α
- TGF- β 1 – трансформирующий фактор роста- β 1
- FOXP3 – белок регулятор развития и функционирования регуляторных Т-клеток
- Treg – регуляторные Т-клетки
- SNAI – транскрипционные мастер-регуляторы эпителиально-мезенхимального перехода

HMGA – семейство негистоновых белков

ZEB – белок семейства цинкового пальца

TWIST – фактор транскрипции

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашрафян Л.А. Локальный уровень белков контрольных точек иммунного цикла у больных раком шейки матки / Л.А. Ашрафян, Т.Е. Белокриницкая, Е.В. Каюкова, Л.Ф. Шолохов, В.А. Мудров, П.П. Терешков. – DOI 10.52485/19986173_2021_4_11 // Забайкальский медицинский вестник. – 2021. – № 4. – С. 11-20.
2. Баторов Е.В. Экспрессия рецепторов цитокинов с общей Υ -цепью как маркеров функциональных фенотипов PD-1- и TIM-3-позитивных Т-клеток при множественной миеломе / Т.А. Аристова, Г.Ю. Ушакова, Е.Я. Шевела, Е.Р. Черных [и др.] – DOI 10.21294/1814-4861-2023-22-1-43-54 // Сибирский онкологический журнал. – 2023. – Т. 22, № 1. – С. 43-54.
3. Бойчук С.В. Ингибитор АКТ-сигнального пути потенцирует цитотоксическую активность доксорубина в отношении клеток остеосарком *in vitro* / С.В. Бойчук, А.Р. Галембикова. DOI 10.32000/2078-1466-2022-3-8-20 // Поволжский онкологический вестник. - 2022. – Т. 13, № 3. – С. 8-20.
4. Бойчук С.В. Ингибирование АКТ-сигнального пути в саркомах мягких тканей – новый подход к их сенситизации к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа / С.В. Бойчук, П.Д. Дунаев, А.Р. Галембикова // Клиническая патофизиология. – 2021. – Т. 27, № 3. – С. 75-87.
5. Парилова Н.К. Диагностическая значимость растворимого рецептора интерлейкина-2 у больных с лимфопролиферативными заболеваниями / Н.К. Парилова, Н.С. Сергеева, Н.В. Маршутина, Н.Г. Тюрина, А.М. Червонцева. – DOI 10.17116/onkolog20165626-30 // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2016. – Т. 5, № 6. – С. 26-30.
6. Свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ № 2022613721 Российская Федерация. Программа для определения вероятности онкологической патологии толстого кишечника / Четверяков А.В., Цепелев В.Л., Крюкова В.В., Мудров В.А.; Федеральное государственное бюджетное

образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2022612663; дата поступления 25 февраля 2022 г.; дата государственной регистрации в реестре программ для ЭВМ 15.03.2022. – 1 с.

7. Симбирцев А.С. Интерлейкин-2 и рецепторный комплекс интерлейкина-2 в регуляции иммунитета // Иммунология. – 1998. – № 6. – С. 3-8.

8. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека / А.С. Симбирцев. – Санкт-Петербург: Фолиант, 2018. – 512 с. – ISBN 978-5-93929-283-2.

9. Тыринова Т.В. Экспрессия ингибиторных молекул (аргиназы-1, IDO и PD-L1) супрессорными клетками миелоидного происхождения у пациентов с множественной миеломой в фазе ремиссии / Т.В. Тыринова, Е.В. Баторов, Т.А. Аристова, Е.Р. Черных [и др.] – DOI 10.47056/0365-9615-2022-174-7-84-88 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 174, № 7. – С. 84-88.

10. Четверяков А.В. Активность сигнального пути 4-1BB/4-1BBL у пациентов с опухолями толстой кишки / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.29296/24999490-2022-04-10 // Молекулярная медицина. – 2022. – Т. 20, № 4. – С. 60–63.

11. Четверяков А.В. Концентрация ко-ингибирующих иммунных контрольных точек и их лигандов в крови у пациентов с опухолью толстой кишки / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.25557/0031-2991.2023.01.56-62 // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2023. – Т. 67, № 1. – С. 56–62.

12. Количественный состав субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов у пациентов с опухолью толстой кишки / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев, П.П. Терешков, В.В. Крюкова. – DOI 10.17513/spno.32682 // Современные проблемы науки и образования : сетевое издание. – 2023. – № 4. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=32682> (дата обращения: 17.10.2023).

13. Четверяков А.В. Уровень белка TIM-3 и его лиганда Galectin-9 у больных колоректальным раком / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.25557/0031-2991.2022.02.52-58 // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2022. – Т. 66, № 2. – С. 52–58.
14. Четверяков А.В. Уровень коингибирующих иммунных контрольных точек в ткани опухоли у пациентов с новообразованиями толстой кишки / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.29296/24999490-2023-01-08 // Молекулярная медицина. – 2023. – Т. 21, № 1. – С. 56–60.
15. Четверяков А.В. Уровень растворимой формы CD25 у пациентов с колоректальным раком / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.25557/2310-0435.2022.02.64-69 // Патогенез. – 2022. – Т. 20, № 2. – С. 64–69.
16. Четверяков А.В. Прогностическое значение уровня белка CTLA-4 и его лиганда В7.2 у больных раком толстого кишечника / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.20538/1682-0363-2023-2-104-110 // Бюллетень сибирской медицины. – 2023. – Т. 22, № 2. – С. 104–110.
17. Четверяков А.В. Патогенетическое значение трансформирующего фактора роста- β 1 у больных колоректальным раком / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.23946/2500-0764-2022-7-3-17-22 // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2022. – Т. 7, № 3. – С. 17–22.
18. Четверяков А.В. Патогенетическая роль LAG-3 у пациентов с колоректальным раком / А.В. Четверяков, В.Л. Цепелев. – DOI 10.56871/RBR.2023.82.53.002 // Российские биомедицинские исследования. – 2023. – Т. 8, № 2. – С. 12–17.
19. A genome-scale gain-of-function CRISPR screen in CD8 T cells identifies proline metabolism as a means to enhance CAR-T therapy / L. Ye, J.J. Park, Q. Yang [et al.]. – DOI 10.1016/j.cmet.2022.02.009 // Cell Metabolism. – 2022. – Vol. 34 (4). – P. 595-614.
20. A humanized 4-1BB-targeting agonistic antibody exerts potent antitumor activity in colorectal cancer without systemic toxicity / L. Cheng, Y. Cheng, W.Liu [et

al.]. – DOI10.21203/rs.3.rs-1352893/v1// Journal of Translation Medicine. – 2022. – Vol. 1. – P. 1-21.

21. A Review of emerging biomarkers for immune checkpoint inhibitors in tumors of the gastrointestinal tract / X. Liao, G. Li, R. Cai, R.Chen. – DOI 10.12659/MSM.935348// Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research. – 2022. – Vol. 28. – e935348-1.

22. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors / E.A. Carswell, L.J. Old, R.L. Kassel [et al.]. – DOI 10.1073/pnas.72.9.3666 // Proc Natl Acad Sci USA. – 1975. – Vol. 72. – P. 3666-3670.

23. An innate IL-25–ILC2–MDSC axis creates a cancer-permissive microenvironment for Apc mutation-driven intestinal tumorigenesis / E. Jou, N. Rodriguez-Rodriguez, A.F. Ferreira [et al.]. – DOI 10.1126/sciimmunol.abn0175 // Science Immunology. – 2022. – Vol. 7, № 72. – P. eabn0175.

24. Analysis of prognostic alternative splicing reveals the landscape of immune microenvironment in thyroid cancer / J. Wu, Y. Sun, J. Li [et al.]. – DOI 10.3389/fonc.2021.763886 // Front Oncol. – 2021. – Vol. 18 (11). – P. 763886.

25. Assessment of the TGFB1 gene expression and methylation status of the promoter region in patients with colorectal cancer / D. Wodziński, A. Wosiak, J. Pietrzak [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-022-15599-4 // Scientific reports. – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 1-12.

26. Association of Galectin 9 expression with immune cell infiltration, programmed cell death ligand-1 expression and patient's clinical outcome in triple-negative breast cancer / M.H. Ju, K.D. Byun, E.H. Park [et al.]. – DOI 10.3390/biomedicines9101383 //Biomedicines. – 2021. – Vol. 9 (10). – P. 1383.

27. Associations of different immune checkpoints-expressing CD4+ Treg/T cell subsets with disease-free survival in colorectal cancer patients / M.A. Al-Mterin, K. Murshed, A. Alsalman [et al.]. – DOI 10.1186/s12885-022-09710-1 // BMC cancer. – 2022. – Vol. 22, № 1. – P. 1-13.

28. Bell P.D. Immune response in colorectal carcinoma: a review of its significance as a predictive and prognostic biomarker / P.D. Bell, R.K. Pai. – DOI

10.1111/his.14713 // Histopathology. – 2022. – URL: https://www.researchgate.net/publication/361563478_Immune_Response_in_Colorectal_Carcinoma_A_Review_of_Its_Significance_as_a_Predictive_and_Prognostic_Biomarker.

29. BET protein targeting suppresses the PD-1/PD-L1 pathway in triple-negative breast cancer and elicits anti-tumor immune response / G.P. Andrieu, J.S. Shafran, C.L. Smith [et al.]. – DOI 10.1016/j.canlet.2019.08.013 // Cancer letters. – 2019. – Vol. 465. – P. 45-58.

30. Bifunctional anti-PD-L1/TGF- β R2 agent SHR-1701 in advanced solid tumors: a dose-escalation, dose-expansion, and clinical-expansion phase 1 trial / D. Liu, J. Zhou, Y. Wang [et al.]. – DOI 10.1186/s12916-022-02605-9 // BMC medicine. – 2022. – Vol. 20, № 1. – P. 1-11.

31. Borrie A.E. lymphocyte-based cancer immunotherapeutics / A.E. Borrie, S. Maleki Vareki. – DOI 10.1016/bs.ircmb.2018.05.010 // Int. Rev. Cell. Mol. Biol. – 2018. – Vol. 341. – P. 201-276.

32. Bruni D. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy / D. Bruni, H.K. Angell, J. Galon. – DOI 10.1038/s41568-020-0285-7 // Nature Reviews Cancer. – 2020. – Vol. 20, № 11. – P. 662-680.

33. Burnet M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications / M. Burnet. – DOI 10.1136/bmj.1.5023.841 // Br Med J. – 1957. – Vol. 1. – P. 841-847.

34. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead / S.J. Oiseth, M.S. Aziz. – DOI 10.20517/2394-4722.2017.41 // Journal of cancer metastasis and treatment. – 2017. – Vol. 3. – P. 250-261.

35. Cancer immunotherapy: historical perspective of a clinical revolution and emerging preclinical animal models / W.K. Decker, R.F. da Silva, M.H. Sanabria [et al.] // Frontiers in immunology. – 2017. – Vol. 8. – P. 829.

36. Cancer-cell-secreted extracellular vesicles suppress insulin secretion through miR-122 to impair systemic glucose homeostasis and contribute to tumour

growth / M. Cao, R. Isaac, W. Yan [et al.]. – DOI 10.1038/s41556-022-00919-7 // *Nature Cell Biology*. – 2022. – Vol. 24 (6). – P. 954-967.

37. CCR8-targeted specific depletion of clonally expanded Treg cells in tumor tissues evokes potent tumor immunity with long-lasting memory / Y. Kidani, W. Nogami, Y. Yasumizu [et al.]. – DOI 10.1073/pnas.2114282119 // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2022. – Vol. 119, № 7. – P. e2114282119.

38. CD137 agonists targeting CD137-mediated negative regulation show enhanced antitumor efficacy in lung cancer / L. Yi, X. Jin, J. Wang [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2022.771809 // *Front Immunol*. – 2022. – Vol. 7 (13). – P. 771809.

39. Checkpoint proteins in patients with precancer and cervical cancer / E.V. Kayukova, L.F. Sholokhov, T.E. Belokrinitskaya, P.P. Tereshkov. – DOI 10.1101/2021.02.09.430409 // *BioRxiv*. – 2021. – Vol. 02.09.430409. – URL:https://www.researchgate.net/publication/349187339_Checkpoint_proteins_in_patients_with_precancer_and_cervical_cancer.

40. Chen F. Immunohistochemistry analyses of LAG-3 expression across different tumor types and co-expression with PD-1 / F. Chen. – DOI 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e15086 // *J Clin Oncol*. – 2020. – Vol. 38 (15). – P. e15086-e15086.

41. Cheung E.C. The role of ROS in tumour development and progression / E.C. Cheung, K.H. Vousden. – DOI 10.1038/s41568-021-00435-0 // *Nature Reviews Cancer*. – 2022. – Vol. 22, № 5. – P. 280-297.

42. Chow M.T. Inflammation and immune surveillance in cancer / M.T. Chow, A. Möller, M.J. Smyth. – DOI 10.1016/j.semcancer.2011.12.004 // *Seminars in cancer biology*. – 2012. – Vol. 22, № 1. – P. 23-32.

43. Clinical benefits of PD-1/PD-L1 inhibitors in patients with metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis / X. Zhang, Z. Yang, Y. An [et al.]. – DOI 10.1186/s12957-022-02549-7 // *World Journal of Surgical Oncology*. – 2022. – Vol. 20 (1). – P. 1-13.

44. Clinical insights into novel immune checkpoint inhibitors / J.B. Lee, S.J. Ha, H.R. Kim. – DOI 10.3389/fphar.2021.681320// Pharmacol. – 2021. – Vol. 12. – P. 681320.
45. Clinical Performance of the Consensus Immunoscore in Colon Cancer in the Asian Population from the Multicenter International SITC Study / B. Mlecnik, T. Torigoe, G. Bindea [et al.]. – DOI 10.3390/cancers14184346 // Cancers. – 2022. – Vol. 14, № 18. – P. 4346.
46. Clinically Translatable Approaches of Inhibiting TGF- β to Target Cancer Stem Cells in TNBC / A. Sulaiman, S. McGarry, S.C. Chilumula [et al.]. – DOI 10.3390/biomedicines9101386 // Biomedicines. – 2021. – Vol. 9 (10). – P. 1386.
47. Colorectal cancer statistics, 2020 / R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Goding Sauer [et al.]. – DOI 10.3322/caac.21601 // CA: a cancer journal for clinicians. – 2020. – Vol. 70 (3). – P. 145-164.
48. Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions / M. Yi, X. Zheng, M. Niu [et al.]. – DOI 10.1186/s12943-021-01489-2 // Molecular cancer. – 2022. – Vol. 21, № 1. – P. 1-27.
49. Correlations between circulating and tumor-infiltrating CD4⁺ Treg subsets with immune checkpoints in colorectal cancer patients with early and advanced stages / M.A. Al-Mterin, K. Murshed, E. Elkord. – DOI 10.3390/vaccines10091471 // Vaccines. – 2022. – Vol. 10, № 9. – P. 1471.
50. CTLA-4 silencing in dendritic cells loaded with colorectal cancer cell lysate improves autologous T cell responses in vitro / F. Ghorbaninezhad, J. Masoumi, M. Bakhshivand [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2022.931316 // Front Immunol. – 2022. – Vol. 13. – P. 931316.
51. CTLA-4 Synergizes with PD1/PD-L1 in the Inhibitory Tumor Microenvironment of Intrahepatic Cholangiocarcinoma / X.J. Guo, J.C. Lu, H.Y. Zeng [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2021.705378 // Front Immunol. – 2021. – Vol. 12. – P. 705378.
52. Cytokine- and chemokine-induced inflammatory colorectal tumor microenvironment: Emerging avenue for targeted therapy / A.A. Bhat, S. Nisar, M.

Singh [et al.]. – DOI 10.1002/cac2.12295 // Cancer Commun (Lond). – 2022. – Vol. 42 (8). – P. 689-715.

53. Deficiency in osteoblasts promotes myeloma resistance to bortezomib by increasing tsp-1 -dependent TGF- β 1 activation and suppressing immunity in bone marrow / C. Zhang, X. Xu, T.N. Trotter [et al.]. – DOI 10.1158/1535-7163.MCT-21-0310 // Mol Cancer Ther. – 2022. – Vol. 21 (2). – P. 347-358.

54. Deregulated mucosal immune surveillance through gut-associated regulatory T cells and PD-1+ T cells in human colorectal cancer / H. Fujimoto, Y. Saito, K. Ohuchida [et al.]. – DOI 10.4049/jimmunol.1701222 // The Journal of Immunology. – 2018. – Vol. 200, № 9. – P. 3291-3303.

55. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor / H. Nishimura, M. Nose, H. Hiai [et al.]. – DOI 10.1016/S1074-7613 (00)80089-8 // Immunity. – 1999. – Vol. (2). – P. 141-151.

56. Discovery and optimization of a synthetic class of Nectin-4-targeted CD137 agonists for immuno-oncology / P. Upadhyaya, J. Kristensson, J. Lahdenranta [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jmedchem.2c00505 // Journal of medicinal chemistry. – 2022. – Vol. 65, № 14. – P. 9858-9872.

57. DNA methylation and repressive histones in the promoters of PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, PD-L1, and galectin-9 genes in human colorectal cancer / V. Sasidharan Nair, S.M. Toor, R.Z. Taha, H. Shaath. – DOI 10.1186/s13148-018-0539-3 // Clinical epigenetics. – 2018. – Vol. 10 (1). – P. 1-9.

58. Effect of TGF- β 1 on Apoptosis of Colon Cancer Cells Via the ERK Signaling Pathway / Y. Zhao, S. Xia, C. Cao, X. Du // Journal of BU ON : Official Journal of the Balkan Union of Oncology. – 2019. – Vol. 24, № 2. – P. 449-455.

59. Effects of laparoscopic radical surgery in the treatment of colorectal cancer and correlations of VEGF and TGF- β 1 with prognosis / C.P. Sun, Y. Bai, J.Q. Jiang, J.L. Wu // Am J Transl Res. – 2021. – Vol. 13 (11). – P. 12887-12896.

60. Efficient recovery of potent tumour-infiltrating lymphocytes through quantitative immunomagnetic cell sorting / Z. Wang, S. Ahmed, M. Labib [et al.]. –

DOI 10.1038/s41551-021-00820-y // Nature Biomedical Engineering. – 2022. – Vol. 6, № 2. – P. 108-117.

61. Emerging role for thymic stromal lymphopoietin–responsive regulatory T cells in colorectal cancer progression in humans and mice / K. Obata-Ninomiya, S. de Jesus Carrion, A. Hu, S.F. Ziegler. – DOI 10.1126/scitranslmed.abl6960r // Science Translational Medicine. – 2022. – Vol. 14 (645). – eabl6960.

62. Emerging targets of immunotherapy in gynecologic cancer / H. Cheng, L. Zong, Y. Kong [et al.]. – DOI 10.2147/OTT.S282530 // Onco Targets Ther. – 2020. – Vol. 13. – P. 11869-11882.

63. Expression of immune checkpoints and T cell exhaustion markers in early and advanced stages of colorectal cancer / R. Saleh, R.Z. Taha, S.M. Toor [et al.]. – DOI 10.1007/s00262-020-02593-w // Cancer Immunology, Immunotherapy. – 2020. – Vol.69 (10). – P. 1989-1999.

64. From benchtop to bedside: a review of oncolytic virotherapy / A.H. Choi, M.P. O'Leary, Y. Fong, N.G. Chen. – DOI 10.3390.40300018 // Biomedicines. – 2016. – Vol. 4. – E18.

65. Functional genomics analysis identifies T and NK cell activation as a driver of epigenetic clock progression / T.H. Jonkman, K.F. Dekkers, R.C. Slieker [et al.]. – DOI 10.1186/s13059-021-02585-8 // Genome biology. – 2022. – Vol. 23 (1). – P. 1-21.

66. Gardner T.A. Sipuleucel-T (Provenge) autologous vaccine approved for treatment of men with asymptomatic or minimally symptomatic castrate-resistant metastatic prostate cancer / T.A. Gardner, B.D. Elzey, N.M. Hahn. – DOI 10.4161/hv.19795 // Hum Vaccin Immunother. – 2012. – Vol. 8. – P. 534-539.

67. Gasdermin D-mediated release of IL-33 from senescent hepatic stellate cells promotes obesity-associated hepatocellular carcinoma / R. Yamagishi, F. Kamachi, M. Nakamura [et al.]. – DOI 10.1126/sciimmunol.abl7209 // Science immunology. – 2022. – Vol. 7, № 72. – P. eabl7209.

68. Genome-wide association study identifies tumor anatomical site-specific risk variants for colorectal cancer survival / J.D. Labadie, S. Savas, T.A. Harrison [et

al.]. – DOI 10.1038/s41598-021-03945-x // Scientific reports. – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 1-10.

69. German High Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). A novel lymphoma-associated macrophage interaction signature (LAMIS) provides robust risk prognostication in diffuse large B-cell lymphoma clinical trial cohorts of the DSHNHL / A.M. Staiger, M. Altenbuchinger, M.Ziepert [et al.]. – DOI 10.1038/s41375-019-0573-y// Leukemia. – 2020. – Vol. 34 (2). – P. 543-552.

70. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel [et al.]. – DOI 10.3322/caac.21660 // CA: a cancer journal for clinicians. – 2021. – Vol. 71, № 3. – P. 209-249.

71. Gough N.R. TGF- β signaling in liver, pancreas, and gastrointestinal diseases and cancer / N.R. Gough, X. Xiang, L. Mishra. – DOI 10.1053/j.gastro.2021.04.064 // Gastroenterology. – 2021. – Vol. 161 (2). – P. 434-452.

72. Groner B. Jak Stat signaling and cancer: opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition / B. Groner, V. von Manstein. – DOI 10.1016/j.mce.2017.05.033 // Mol Cell Endocrinol. – 2017. – Vol. 451. – P. 1-14.

73. Haque S. Transforming growth factor- β : A therapeutic target for cancer / S. Haque, J.C. Morris. – DOI 10.1080/21645515.2017.1327107 // Human vaccines & immunotherapeutics. – 2017. – Vol. 13, № 8. – P. 1741-1750.

74. Helios (+) and Helios (-) Treg subpopulations are phenotypically and functionally distinct and express dissimilar TCR repertoires / A.M. Thornton, J. Lu, P.E.Korty [et al.]. – DOI 10.1002/eji.201847935// Eur. J. Immunol. – 2019. – Vol. 49 (3). – P. 398-412.

75. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains / P. Dariavach, M.G. Mattéi, P. Golstein [et al.]. – DOI 10.1002/eji.1830181206 // European journal of immunology. – 1988. – Vol. 18, № 12. – P. 1901-1905.

76. Identification of an at-risk subpopulation with high immune infiltration based on the peroxisome pathway and TIM3 in colorectal cancer / J. Yin, H. Wang, Y.

Hong [et al.]. – DOI 10.1186/s12885-021-09085-9 // BMC Cancer. – 2022. – Vol. 22 (1). – P. 44.

77. Imakita T. Pulmonary Lymphangitis Carcinomatosa Mimicking Immunotherapy-Related Interstitial Pneumonitis: A Case Report / T. Imakita, K. Fujita, O. Kanai. – DOI 10.1159/000525800 // Case Reports in Oncology. – 2022. – Vol. 15 (2). – P. 732-737.

78. Immune checkpoint inhibitor-based therapy for advanced clear cell renal cell carcinoma: A narrative review / Y.F. Liu, Z.C. Zhang, S.Y. Wang [et al.]. – DOI 10.1016/j.intimp.2022.108900 // International immunopharmacology. – 2022. – Vol. 110. – P. 108900.

79. Immune checkpoint inhibitors and cellular treatment for lymphoma immunotherapy / F. Li, Y. Chen, M. Pang [et al.]. – DOI 10.1111/cei.13592 // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2021. – Vol. 205 (1). – P. 1-11.

80. Immune checkpoints and cancer development: Therapeutic implications and future directions / S. Mehdizadeh, H. Bayatipoor, S. Pashangzadeh [et al.]. – DOI 10.1016/j.prp.2021.153485 // Pathol Res Pract. – 2021. – Vol. 223. – P. 153485.

81. Immune checkpoints in circulating and tumor-infiltrating CD4+ T cell subsets in colorectal cancer patients / S.M. Toor, K. Murshed, M. Al-Dhaheri [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2019.02936 // Frontiers in immunology. – 2019. – Vol. 10. – P. 2936.

82. Immune modeling analysis reveals immunologic signatures associated with improved outcomes in high grade serous ovarian cancer / N.E. James, K. Miller, N. LaFranzo [et al.]. – DOI 10.3389/fonc.2021.622182 // Frontiers in oncology. – 2021. – Vol. 11. – P. 622182.

83. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents / L. Galluzzi, A. Buque, O. Kepp [et al.]. – DOI 10.1016/j.ccell.2015.10.012 // Cancer cell. – 2015. – Vol. 28 (6). – P. 690-714.

84. Immunotherapy in endometrial cancer: rationale, practice and perspectives / W. Cao, X. Ma, J.V. Fischer [et al.]. – DOI 10.1186/s40364-021-00301-z // Biomark Res. – 2021. – Vol. 9 (1). – P. 49.

85. Joller N. Tim-3, Lag-3, and TIGIT / N. Joller, K. Kuchroo. – DOI 10.1007/82.2017.62 // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2017. – Vol. 410. – P. 127-156.
86. KEYNOTE-164: Pembrolizumab for patients with advanced microsatellite instability high (MSI-H) colorectal cancer / D.T. Le, P. Kavan, T.W. Kim, M.E. Burge. – DOI 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.3514 // *Journal of Clinical Oncology.* – 2018. – Vol. 36, 15 suppl. – P. 3514-3514.
87. Korman A.J. The foundations of immune checkpoint blockade and the ipilimumab approval decennial / A.J. Korman, S.C. Garrett-Thomson, N. Lonberg. – DOI 10.1038/s41573-021-00345-8 // *Nature Reviews Drug Discovery.* – 2022. – Vol. 21, № 7. – P. 509-528.
88. Kraehenbuehl L. Enhancing immunotherapy in cancer by targeting emerging immunomodulatory pathways / L. Kraehenbuehl. – DOI 10.1038/s41571-021-00552-7 // *Nature Reviews Clinical Oncology.* – 2022. – Vol. 19, № 1. – P. 37-50.
89. Krummel M.F. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation / M.F. Krummel, J.P. Allison. – DOI 10.1084/jem.182.2.459 // *J. Exp. Med.* – 1995. – Vol. 182 (2). – P. 459-465.
90. LAG3 associates with TCR–CD3 complexes and suppresses signaling by driving co-receptor-Lck dissociation / C. Guy, D.M. Mitrea, P.C. Chou [et al.]. – DOI 10.1038/s41590-022-01176-4 // *Nature Immunology.* – 2022. – Vol. 23 (5). – P. 757-767.
91. LAG-3 Expression Predicts Outcome in Stage II Colon Cancer / G. Rhyner Agocs, N. Assarzagdegan, R. Kirsch [et al.]. – DOI 10.3390/jpm11080749 // *Journal of personalized medicine.* – 2021. – Vol. 11, № 8. – P. 749.
92. Legut M. A genome-scale screen for synthetic drivers of T cell proliferation / M. Legut, Z. Gajic, M. Guarino. – DOI 10.1038/s41586-022-04494-7 // *Nature.* – 2022. – Vol. 603 (7902). – P. 728-735.
93. Lin H.J. Breast cancer tumor microenvironment and molecular aberrations hijack tumoricidal immunity / H.J. Lin, Y. Liu, D. Lofland. – DOI 10.3390/cancers14020285 // *Cancers.* – 2022. – Vol. 14 (2). – P. 285.

94. Liposomal Co-delivery of PD-L1 siRNA/Anemoside B4 for Enhanced Combinational Immunotherapeutic Effect / X. Li, X. Zhou, J. Liu [et al.]. – DOI 10.1021/acsami.2c01123 // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2022. – Vol. 14 (25). – P. 28439-28454.
95. Liu S. TGF- β signaling: A complex role in tumorigenesis / S. Liu, S. Chen, J. Zeng. – DOI 10.3892/mmr.2017.7970 // Molecular medicine reports. – 2018. – Vol. 17, № 1. – P. 699-704.
96. LncRNA DLEU2 is activated by STAT1 and induces gastric cancer development via targeting miR-23b-3p/NOTCH2 axis and Notch signaling pathway / G. Li, Z. Zhang, Z. Chen [et al.]. – DOI 10.1016/j.lfs.2021.119419 // Life Sci. – 2021. – Vol. 277. – P. 119419.
97. Long Non-Coding RNAs (lncRNAs) in Response and Resistance to Cancer Immunosurveillance and Immunotherapy / G.C. Eptaminitaki, N. Wolff, D. Stellas [et al.]. – DOI 10.3390/cells10123313 // Cells. – 2021. – Vol. 10 (12). – P. 3313.
98. Lopez S.H. The gut wall's potential as a partner for precision oncology in immune checkpoint treatment / S.H. Lopez, M. Jalving, S.N. Fehrmann. – DOI 10.1016/j.ctrv.2022.102406 // Cancer Treatment Reviews. – 2022. – Vol. 1. – P. 102406.
99. Lymph node colonization induces tumor-immune tolerance to promote distant metastasis / N.E. Reticker-Flynn, W. Zhang, J.A. Belk [et al.]. – DOI 10.1016/j.cell.2022.04.019 // Cell. – 2022. – Vol. 185, № 11. – P. 1924-1942.e23.
100. Lymphocyte activation gene (LAG)-3 is associated with mucosal inflammation and disease activity in ulcerative colitis / S.M. Slevin, L.C. Garner, C. Lahiff [et al.]. – DOI 10.1093/ecco-jcc/jjaa054 // Journal of Crohn's and Colitis. – 2020. – Vol. 14, № 10. – P. 1446-1461.
101. MAPK pathway activity plays a key role in PD-L1 expression of lung adenocarcinoma cells / T.S. Stutvoet, A. Kol, E.G. de Vries [et al.]. – DOI 10.1002/path.5280 // J Pathol. – 2019. – Vol. 249. – P. 52-64.
102. Mechanisms of immune activation and regulation: lessons from melanoma / S. Kalaora, A. Nagler, J.A. Wargo, Y. Samuels. – DOI 10.1038/s41568-022-00442-9 // Nature Reviews Cancer. – 2022. – Vol. 22 (4). – P. 195-207.

103. Meier S.L. Bystander T-cells in cancer immunology and therapy / S.L. Meier, A.T. Satpathy, D.K. Wells. – DOI10.1038/s43018-022-00335-8 // *Nature Cancer*. – 2022. – Vol. 3 (2). – P. 143-155.
104. Metabolic Implications of Immune Checkpoint Proteins in Cancer / E.R. Stirling, S.M. Bronson, J.D. Mackert [et al.]. – DOI 10.3390/cells11010179 // *Cells*. – 2022. – Vol. 11 (1). – P. 179.
105. MHC class II molecules on pancreatic cancer cells indicate a potential for neo-antigen-based immunotherapy / R.B. Baleeiro, C.J. Bouwens, P. Liu [et al.]. – DOI 10.1080/2162402x2022.2080329 // *OncoImmunology*. – 2022. – Vol. 11 (1). – P. 2080329.
106. Mitogen-activated protein kinase signaling pathway in oral cancer / Q. Peng, Z. Deng, H. Pan [et al.]. – DOI 10.3892/ol.2017.7491// *Oncol Lett*. – 2018. – Vol. 15. – P. 1379-1388.
107. Modulation of diverse oncogenic signaling pathways by oroxylin A: An important strategy for cancer prevention and treatment / A. Sajeev, M. Hegde, U.D. Daimary [et al.]. – DOI 10.1016/j.phymed.2022.154369 // *Phytomedicine*. – 2022. – Vol. 105. – P. 154369.
108. Morales A. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors / A. Morales, D. Eiding, A.W. Bruce. – DOI 10.1016/S0022-5347 // *J Urol*. – 1976. – Vol. 116. – P. 180-183.
109. Moschos S.J. Melanoma Brain Metastases: An Update on the Use of Immune Checkpoint Inhibitors and Molecularly Targeted Agents / S.J. Moschos. – DOI 10.1007/s40257-022-00678-z // *Am J Clin Dermatol*. – 2022. – Vol. 23 (4). – P. 523-545.
110. Neupane P. The expression of immune checkpoint receptors and ligands in the colorectal cancer tumor microenvironment / P. Neupane, K. Mimura. – DOI 10.21873/anticancer.15303// *Anticancer Research*. – 2021. – Vol. 41 (10). – P. 4895-4905.
111. Nitrate contamination in drinking water and colorectal cancer: Exposure assessment and estimated health burden in New Zealand / J. Richards, T. Chambers, S.

Hales [et al.]. – DOI 10.1016/j.envres.2021.112322 // Environmental Research. – 2022. – Vol. 204. – P. 112322.

112. Old L.J. Effect of Bacillus Calmette-Guerin infection on transplanted tumours in the mouse / L.J. Old, D.A. Clarke, B. Benacerraf. – DOI 10.1038/184291a0 // Nature. – 1959. – Vol. 184. – P. 291-292.

113. Pawlak J. TGF- β superfamily co-receptors in cancer / J. Pawlak, C. Blobe. – DOI 10.1002/dvdy.338 // Developmental Dynamics. – 2022. – Vol. 251 (1). – P. 137-163.

114. PD-1-cis IL-2R agonism yields better effectors from stem-like CD8⁺ T cells / L. Codarri Deak, V. Nicolini, M. Hashimoto [et al.]. – DOI 10.1038/s41586-022-05192-0 // Nature. – 2022. – Vol. 610 (7930). – P. 161–172.

115. Peripheral gene signatures reveal distinct cancer patient immunotypes with therapeutic implications for autologous DC-based vaccines / M. Hensler, J. Rakova, L. Kasikova [et al.]. – DOI 10.1080/2162402X.2022.2101596 // Oncoimmunology. – 2022. – Vol. 11, № 1. – P. 2101596.

116. Phase I/Ib Clinical Trial of Sabatolimab, an Anti-TIM-3 Antibody, Alone and in Combination with Spartalizumab, an Anti-PD-1 Antibody, in Advanced Solid Tumors / G. Curigliano, H. Gelderblom, N. Mach [et al.]. – DOI 10.1158/1078-0432.CCR-20-4746// Clin Cancer Res. – 2021. – Vol. 27 (13). – P. 3620-3629.

117. Philip M. CD8⁺ T cell differentiation and dysfunction in cancer / M. Philip, A. Schietinger. – DOI 10.1038/s41577-021-00574-3 // Nature Reviews Immunology. – 2022. – Vol. 22, № 4. – P. 209-223.

118. Prachar C. Soluble Interleukin 2 Receptor-Alpha (sIL-2R α) in the Peripheral Blood of Dogs-Comparison of Malignant Neoplasia with Other Diseases 2013 / C. Prachar, F.J. Kaup. – DOI 10.4236/ojvm.2013.32027 // Open Journal of Veterinary Medicine. – 2013. – Vol. 3. – P. 176-183.

119. Pre-diagnostic levels of sVEGFR2, sTNFR2, sIL-2R α and sIL-6R are associated with glioma risk: A nested case-control study of repeated samples / W.Y. Wu, F. Späth, C. Wibom [et al.]. – DOI 10.1002/cam4.4505// Cancer Med. – 2022. – Vol. 11 (4). – P. 1016-1025.

120. Predicting response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer: from biomarkers to tumor models / M. Li, Q. Xiao, N. Venkatachalam [et al.]. – DOI 10.1177/1758835922107797 // *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. – 2022. – Vol. 14. – P. 17588359221077972.
121. Presence of Tim3+ and PD-1+ CD8+ T cells identifies microsatellite stable colorectal carcinomas with immune exhaustion and distinct clinicopathological features / M. Klapholz, M.G. Drage, A. Srivastava, A.C. Anderson. – DOI 10.1002/path.5877// *The Journal of Pathology*. – 2022. – Vol. 257 (2). – P. 186-197.
122. Prognostic Implications of Immune Infiltrates in the Breast Cancer Microenvironment: The Role of Expressions of CTLA-4, PD-1, and LAG-3 / S. Bagbudar, H. Karanlik, N. Cabioglu [et al.]. – DOI 10.1097/PAI.0000000000000978 // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. – 2022. – Vol. 30 (2). – P. 99-107.
123. Prognostic Value of Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG3) in Cancer: A Meta-Analysis / R.R. Saleh, P. Peinado, J. Fuentes-Antrás [et al.]. – DOI 10.3389/fonc.2019.01040 // *Front Oncol*. – 2019. – Vol. 9. – P. 1040.
124. Protective effect of stromal Dickkopf-3 in prostate cancer: opposing roles for TGFBI and ECM-1 / Z. Al Shareef, H. Karadooni, V. Murillo-Garzón [et al.]. – DOI 10.1038/s41388-018-0294-0// *Oncogene*. – 2018. – Vol. 37 (39). – P. 5305-5324.
125. Regulatory T cells and immunoglobulin E: A new therapeutic link for autoimmunity? / O. Palomares, D. Elewaut, P.M. Irving [et al.]. – DOI 10.1111/all.15449 // *Allergy*. – 2022. – Vol. 77 (11). – P. 3293-3308.
126. Relatlimab and nivolumab versus nivolumab in untreated advanced melanoma / H.A. Tawbi, D. Schadendorf, E.J. Lipson [et al.]. – DOI 10.1056/NEJMoa2109970 // *New England Journal of Medicine*. – 2022. – Vol. 386, № 1. – C. 24-34
127. Reverse signaling via PD-L1 supports malignant cell growth and survival in classical Hodgkin lymphoma / S. Jalali, T. Price-Troska, C. Bothun [et al.]. – DOI 10.1038/s41408-019-0185-9// *Blood Cancer J*. – 2019. – Vol. 9. – P. 22.

128. Revisiting the PD-1 pathway / N. Patsoukis, Q. Wang, L. Strauss, V.A. Boussiotis. – DOI 10.1093/intimm/dxm057 // *Science Advances*. – 2020. – Vol. 6 (38). – eabd2712.
129. Rowshanravan B. CTLA-4: a moving target in immunotherapy / B. Rowshanravan, N. Halliday, D.M. Sansom. – DOI 10.1182/blood-2017-06-741033 // *Blood*. – 2018. – Vol. 131 (1). – P. 58-67.
130. Santoiemma, Phillip P. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer / P.P. Santoiemma, D.J. Powell Jr. – DOI 10.1080/15384047.2015.1040960 // *Cancer biology & therapy*. – 2015. – Vol. 16.6. – P. 807-820.
131. Sharma P. The future of immune checkpoint therapy / P. Sharma, J.P. Allison. – DOI 10.1126/science.aaa8172 // *Science*. – 2015. – Vol. 348 (6230). – P. 56-61.
132. Soluble IL-2R Levels at Baseline Predict the Development of Severe Respiratory Failure and Mortality in COVID-19 Patients / N.K. Gatselis, V. Lygoura, A. Lyberopoulou [et al.]. – DOI 10.3390/v14040787 // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14 (4). – P. 787.
133. Soluble LAG-3 acts as a potential prognostic marker of gastric cancer and its positive correlation with CD8+t cell frequency and secretion of IL-12 and INF- γ in peripheral blood / N. Li, B. Jilisihan, W. Wang [et al.]. – DOI 10.3233/CBM-181278 // *Cancer Biomark*. – 2018. – Vol. 23 (3). – P. 341-351.
134. Spatial analysis and CD25-expression identify regulatory T cells as predictors of a poor prognosis in colorectal cancer / C.H. Bergsland, M. Jeanmougin, S.H. Moosavi [et al.]. – DOI 10.1038/s41379-022-01086-8 // *Modern Pathology*. – 2022. – Vol. 35 (9). – P. 1236-1246.
135. Subclone-specific microenvironmental impact and drug response in refractory multiple myeloma revealed by single-cell transcriptomics / S.M. Tirier, J.P. Mallm, S. Steiger [et al.]. – DOI 10.1038/s41467-021-26951-z // *Nat Commun*. – 2021. – Vol. 12 (1). – P. 6960.

136. Tang R. Tim-3: A co-receptor with diverse roles in T cell exhaustion and tolerance / R. Tang, M. Rangachari, V.K. Kuchroo. – DOI 10.1016/j.smim.2019.101302 // In *Seminars in immunology*. – 2019. – Vol. 42. – P. 101302.

137. Targeting signaling pathways in prostate cancer: mechanisms and clinical trials / Y. He, W. Xu, Y.T. Xiao [et al.]. – DOI 10.1038/s41392-022-01042-7 // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2022. – Vol. 7 (10). – P. 1-31.

138. Targeting T regulatory cells: Their role in colorectal carcinoma progression and current clinical trials / S.S. Bandaru, R. Boyilla, N. Merchant [et al.]. – DOI 10.1016/j.phrs.2022.106197 // *Pharmacological Research*. – 2022. – Vol. 178. – P. 106197.

139. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity / S.L. Topalian, C.G. Drake, D.M. Pardoll [et al.]. – DOI 10.1016/j.coi.2011.12.009 // *Curr Opin Immunol*. – 2012. – Vol. 24 (2). – P. 207-212.

140. Tauriello D.V.F. Overcoming TGF β -mediated immune evasion in cancer / D.V.F. Tauriello, E. Sancho, E. Batlle. – DOI 10.1038/s41568-021-00413-6 // *Nature Reviews Cancer*. – 2022. – Vol. 22, № 1. – P. 25-44.

141. TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis / D.V.F. Tauriello, S. Palomo-Ponce, D. Stork [et al.]. – DOI 10.1038/nature25492 // *Nature*. – 2018. – Vol. 554, № 7693. – P. 538-543.

142. TGF- β regulates the stem-like state of PD-1+ TCF-1+ virus-specific CD8 T cells during chronic infection / Y. Hu, W.H. Hudson, H.T. Kissick [et al.]. – DOI 10.1084/jem.20211574 // *Journal of Experimental Medicine*. – 2022. – Vol. 219 (10). – P. e20211574.

143. TGF- β 1 induces HMGA1 expression: The role of HMGA1 in thyroid cancer proliferation and invasion / J. Zhong, C. Liu, Q.H. Zhang [et al.]. – DOI 10.3892/ijo.2017.3958 // *International journal of oncology*. – 2017. – Vol. 50, № 5. – P. 1567-1578.

144. TGF- β 1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and stemness of prostate cancer cells by inducing PCBP1 degradation and alternative splicing of CD44 /

Q. Chen, M. Gu, Zk. Cai [et al.]. – DOI 10.1007/s00018-020-03544-5 // Cell. Mol. Life Sci. – 2021. – Vol. 78. – P. 949962.

145. The Combination of TIM3 - Based Checkpoint Blockade and Oncolytic Virotherapy Regresses Established Solid Tumors / C.C. Gowan, M.Y. Bartee, E. Flores [et al.]. – DOI 10.1097/CJI.0000000000000444 // Journal of Immunotherapy. – 2023. – Vol. 46, № 1. – P. 1-4.

146. The JAK/STAT pathway is involved in the upregulation of PD-L1 expression in pancreatic cancer cell lines / T. Doi, T. Ishikawa, T. Okayama [et al.]. – DOI 10.3892/or.2017.5399 // Oncol Rep. – 2017. – Vol. 37. – P. 1545-1554.

147. The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy / L. Long, X. Zhang, F. Chen [et al.]. – DOI 10.18632/genesandcancer.180 // Genes Cancer. – 2018. – Vol. 9 (5-6). – P. 176-189.

148. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) / E.E.W. Cohen, R.B. Bell, C.B. Bifulco [et al.]. – DOI 10.1186/s40425-019-0662-5 // Journal for immunotherapy of cancer. – 2019. – Vol. 7, № 1. – P. 1-31.

149. The survey in the role of LAG3+ tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer prognosis / S. Tavana, M.H. Sanei, Z. Mokhtar [et al.]. – DOI 10.21203/rs.3.rs-1746250/v1 // Relationship with sidedness. – 2022. – PREPRINT (Version 1). – URL: <https://www.researchsquare.com/article/rs-1746250/v1> (date of the application: дд.мм.гггг).

150. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy / F. Garrido, N. Aptsiauri, E.M. Doorduijn [et al.]. – DOI 10.1016/j.coi.2015.12.007// Curr Opin Immunol. – 2016. – Vol. 39. – P. 44-51.

151. Therapeutic Targets and Emerging Treatments in Advanced Chondrosarcoma / S. Miwa, N. Yamamoto, K. Hayashi [et al.]. – DOI 10.3390/ijms23031096 // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 3. – P. 1096.

152. Thomas L. Discussion / L. Thomas // Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. – New York: Hober-Harper, 1959. – P. 529-532.

153. TIM-3 as a target for cancer immunotherapy and mechanisms of action / W. Du, M. Yang, A. Turner [et al.]. – DOI 10.3390/ijms18030645 // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Vol. 18 (3). – P. 645.
154. TIM-3 in Lung Cancers: a potential independent prognostic factor for patients with NSCLC / X. Zhang, X. Zhang, X. Xia [et al.]. – DOI 10.1309/AJCP9Q6OVLVSHTMY // *American Journal of Clinical Pathology.* – 2012. – Vol. 137 (6). – P. 978–985.
155. Tim-3 mediates T cell trogocytosis to limit antitumor immunity / O. Pagliano, R.M. Morrison, J.M. Chauvin [et al.]. – DOI 10.3390/biomedicines10112826 // *The Journal of clinical investigation.* – 2022. – Vol. 132 (9). – e152864.
156. Transforming growth factor (TGF) β 1 acted through miR-130b to increase integrin α 5 to promote migration of colorectal cancer cells / R. Yi, Y. Li, F. Wang [et al.]. – DOI 10.1007/s13277-016-4965-6 // *Tumor Biology.* – 2016. – Vol. 37, № 8. – P. 10763-10773.
157. Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) in thyroid cancer patients: a view from the peripheral blood / S. Zivancevic-Simonovic, O. Mihaljevic, D. Mihajlovic [et al.] // *Ann Clin Lab Sci.* – 2016. – Vol. 46 (4). – P. 401-406.
158. Tumor Immune Microenvironment during Epithelial–Mesenchymal Transition The Review of the Loop Between EMT and Immunosuppression / M. Taki, K. Abiko, M. Ukita [et al.]. – DOI 10.1158/1078-0432.CCR-20-4459 // *Clinical Cancer Research.* – 2021. – Vol. 27, № 17. – P. 4669-4679.
159. Tumor-localized costimulatory T-Cell engagement by the 4-1BB/HER2 bispecific antibody-anticalin fusion PRS-343 / M.J. Hinner, R.S.B. Aiba, T.J. Jaquin [et al.]. – DOI 10.1158/1078-0432.CCR-18-3654 // *Clin Cancer Res.* – 2019. – Vol. 125 (19). – P. 5878-5889.
160. Two FOXP3 (+) CD4 (+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers / T. Saito, H. Nishikawa, H. Wada [et al.]. – DOI 10.1038/nm.4086 // *Nat. Med.* – 2017. – Vol. 22 (6). – P. 679-684.

161. Updates on immunotherapy for colorectal cancer / A. Kalyan, S. Kircher, H. Shah [et al.]. – DOI 10.21037/jgo.2018.01.17 // Journal of gastrointestinal oncology. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 160-169.
162. Whangbo J.S. The role of regulatory T cells in graft-versus-host disease management / J.S. Whangbo, J.H. Antin, J. Koreth. – DOI 10.1080/17474086.2020.1709436 // Expert review of hematology. – 2020. – Vol. 13 (2). – P. 141-154.
163. Wu J. Role of TNFSF9 bidirectional signal transduction in antitumor immunotherapy / J. Wu, Y. Wang. – DOI 10.1016/j.ejphar.2022.175097 // European Journal of Pharmacology. – 2022. – Vol. 928. – P. 175097.
164. Xie Y.H. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer / Y.H. Xie, Y.X. Chen, J.Y. Fang. – DOI 10.1038/s41392-020-0116-z // Signal transduction and targeted therapy. – 2020. – Vol. 5, № 1. – P. 1-30.
165. Yadav M.L. Identification and characterization of genetic variants of TGFB1 in patients with congenital heart disease / M.L. Yadav. – DOI 10.1016/j.mgene.2021.100987 // Meta Gene. – 2022. – Vol. 31. – P. 100987.
166. Zeidan A.M. TIM-3 pathway dysregulation and targeting in cancer / A.M. Zeidan, R.S. Komrokji, A.M. Brunner. – DOI 10.1080/14737140.2021.1865814 // Expert Review of Anticancer Therapy. – 2021. – Vol. 21 (5). – P. 523-534.
167. Zizzari I.G. Circulating CD137+ T-cells correlate with improved response to Anti-PD1 immunotherapy in patients with / I.G. Zizzari, A.Di. Filippo, A. Botticelli. – DOI 10.1158/1078-0432.CCR-21-2918 // Clinical Cancer Research. – 2022. – Vol. 28 (5). – P. 1-11.