

РОЛЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ В ФОРМИРОВАНИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ НА ЭТАПЕ НЕОАДЪЮВАНТНОГО ЛЕЧЕНИЯ

Е. Ю. Златник¹✉, Г. А. Неродо², А. Ю. Арджа², О. Н. Селютина¹, Е. С. Бондаренко¹

¹ Лаборатория иммунофенотипирования опухолей,
Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону

² Отделение онкогинекологии,
Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону

Изучение роли иммунологической памяти, опосредованной Т-лимфоцитами, при злокачественных опухолях и их лечении — актуальная научная задача. Целью исследования была оценка роли Т-клеток иммунологической памяти в формировании противоопухолевого иммунитета у больных раком яичников на этапе неoadъювантного лечения, включающего химиоиммунотерапию с применением рекомбинантного интерферона-гамма (рИФНγ). Методы: проточная цитометрия для определения центральных (Т_{см}) и эффекторных (Т_{ем}) Т-клеток памяти (Т_м) и наивных Т-лимфоцитов (Т_{h0}). Результаты: в крови больных по сравнению с донорами обнаружено высокое (Т_м) и низкое (Т_{h0}) содержание Т-клеток среди CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляций. В асцитической жидкости происходило накопление Т_м, превышающих количество Т_{h0} в 7,7 раза в субпопуляции CD4⁺ и в 6,5 раза в субпопуляции CD8⁺, в которой Т_{ем} преобладали над Т_{см}. После химиотерапии с препаратом рИФНγ в крови больных выявлено снижение уровня Т_{h0}, в крови и в асцитической жидкости — преобладание Т_{см} среди CD8⁺ Т_м, а у больных, получавших химиотерапию без иммунотерапии, преобладали Т_{ем}. Данные различия были расценены как благоприятные, поскольку сопровождалась положительной клинической динамикой: меньшей частотой рецидивирования (46,7 против 80 % в контроле) и более длительным безрецидивным периодом (17,5 ± 1,6 против 11,3 ± 1,5 мес. в контроле). Таким образом, химиоиммунотерапия вызывает перераспределение субпопуляций Т-клеток в крови и в асцитической жидкости при раке яичников в сторону преобладания Т_{см} над Т_{ем}, что может быть одним из механизмов действия препарата «Ингарон» (рИФНγ).

Ключевые слова: рак яичников, асцитическая жидкость, кровь, проточная цитометрия, лимфоциты, Т-клетки памяти, Т_{см}, Т_{ем}, наивные Т-лимфоциты, интерферон-γ

✉ Для корреспонденции: Златник Елена Юрьевна
ул. 14-я линия, д. 63, г. Ростов-на-Дону, 344037; elena-zlatnik@mail.ru

Статья получена: 22.09.2017 Статья принята к печати: 30.09.2017

THE ROLE OF IMMUNOLOGICAL MEMORY IN ESTABLISHING ANTITUMOR IMMUNITY IN PATIENTS WITH OVARIAN CANCER UNDERGOING NEOADJUVANT THERAPY

Zlatnik EYu¹✉, Nerodo GA², Ardzha AYu², Seliutina ON¹, Bondarenko ES¹

¹ Laboratory for Immunophenotyping of Tumors,
Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

² Department of Gynecologic Oncology,
Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Understanding the role of immunological memory mediated by T-lymphocytes in patients with malignant tumors is a pressing issue. This study aimed to assess the contribution of memory T-cells to antitumor immunity in patients with ovarian cancer undergoing neoadjuvant chemoimmunotherapy with recombinant interferon-gamma (rIFNγ). Quantification of central (T_{cm}) and effector (T_{em}) memory T-cells (T_m), as well as naive T-lymphocytes (Th₀), was done using flow cytometry. Compared to healthy females, untreated cancer patients were found to have more T_m and less Th₀ cells in their blood CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulations. In cancer patients, T_m cells accumulated in the ascitic fluid, exceeding 7.7 times the number of CD4⁺ Th₀ cells and 6.5 times the number of CD8⁺ Th₀ cells, with T_{em} prevailing over T_{cm}. After chemotherapy with rIFNγ, blood Th₀ decreased in cancer patients, while T_{cm} dominated the CD8⁺ T_m subpopulation both in the blood and ascitic fluid. T_{em} cells were a prevalent cell type in patients who received chemotherapy without interferon-gamma. Decreased Th₀ and T_{cm} prevalence were a positive sign accompanied by a good response to treatment, including lower relapse rates (46.7 % vs. 80 % in controls) and a longer relapse-free period (17.5 ± 1.6 vs. 11.3 ± 1.5 months in controls). Therefore, we conclude that chemoimmunotherapy alters proportions of T-cell subpopulations in the blood and ascitic fluid of patients with ovarian cancer, with T_{cm} cells prevailing over T_{em}, which may be one of the mechanisms of rIFNγ (Ingaron) action.

Keywords: ovarian cancer, ascitic fluid, blood, flow cytometry, lymphocytes, memory T-cells, T_{cm}, T_{em}, Th₀, interferon-gamma

✉ Correspondence should be addressed: Elena Zlatnik
14-ya liniya, d. 63, Rostov-on-Don, Russia, 344037; elena-zlatnik@mail.ru

Received: 22.09.2017 Accepted: 30.09.2017

Бурное развитие клеточных технологий, перспективных для противоопухолевого лечения, предлагает применение адоптивной иммунотерапии активированными *ex vivo* лимфоцитами периферической крови и опухолевого микроокружения (LAK- и TIL-клеток), CIK-лимфоцитов, ДК-вакцинации и пр. [1]. В работах последних лет высокую активность при ряде опухолей показала CAR-терапия [2].

Тем не менее эффект применения адоптивной иммунотерапии у онкологических больных не оправдывает ожиданий, что приводит к разочарованию клиницистов в таких подходах, альтернативных химиотерапии или использующихся в сочетании с ней [1]. Подобные противораковые стратегии нередко терпят поражение из-за иммуносупрессивных механизмов организма опухоленосителя, проявляющихся в дисбалансе и дисфункциях различных субпопуляций лимфоцитов, среди которых важную роль играют лимфоциты, обеспечивающие иммунологическую память. Феномен иммунологической памяти известен давно и присущ системе адаптивного иммунитета, включающего Т- и В-клеточные звенья. Роль лимфоцитов памяти представляется важной при любой хронической патологии, а для опухолевых заболеваний особенно актуальна иммунологическая память, опосредуемая Т-лимфоцитами. Особое значение при этом придается CD8⁺-клеткам, так как частота встречаемости специфических цитотоксических Т-лимфоцитов против опухолевых антигенов намного выше среди CD8⁺-клеток памяти, чем среди наивных [3]. У онкологических больных, как продемонстрировано на примере тетрамера меланомы мелан-А, отмечена различная способность наивных Т-лимфоцитов (Th0) и Т-клеток памяти (Тм) отвечать на стимуляцию опухолевым антигеном *ex vivo*, отсутствующая у клеток CD45RA⁺CCR7⁺ и присутствующая у CD45RO⁺CCR7⁻ [4, 5]. Некоторыми авторами уровень CD8⁺-клеток памяти в опухоли при колоректальном раке и других солидных опухолях рассматривается как ключевой фактор общей выживаемости больных [6].

Как стало известно в конце XX в. после введения в широкий научно-лабораторный обиход методов иммунофенотипирования лимфоцитов, субпопуляция Тм-лимфоцитов гетерогенна и подразделяется в зависимости от экспрессии адгезионных, хемокиновых, костимулирующих рецепторов, от способности к продукции цитокинов и к ответу на них, возможности проникать через эндотелий и от других характеристик. На основании этих особенностей были определены основные субпопуляции Тм: центральные (Тсм) и эффекторные (Тем). Фенотип этих клеток характеризуется экспрессией CD45RO при отсутствии экспрессии CD45RA, а также наличием на Тсм рецепторов CCR7, CD62L, CD27 и CD28, тогда как на Тем-клетках экспрессия CCR7, CD62L и CD28 отсутствует, а CD27 сохраняется [7]. Th0 обладают высокой экспрессией CCR7, CD62L, CD27, CD28 и CD45RA при отсутствии CD45RO. Таким образом, иммунофенотипирование минимальной панелью моноклональных антител CD62L, CD45RA и CD45RO позволяет отнести Т-лимфоцит к субпопуляции Th0, Тсм или Тем.

Хроническая антигенная стимуляция вызывает изменение Th0, в ходе которых происходит не только указанное выше изменение их иммунофенотипа, но и снижение пролиферативной активности и выживаемости, а также ответа на гомеостатические цитокины (IL-7, IL-15) и способности к продукции IL-2; при этом нарастают эффекторные функции, в частности цитотоксичность. Рецепторы CD62L и CCR7, экспрессируемые Th0 и Тсм, способны удерживать их экстравазации через высокий эндотелий венул и миграции

в Т-зависимые зоны периферических лимфоузлов, тогда как Тем населяют периферические ткани (печень, легкие), а также область воспалительного или опухолевого очага [8, 9]. Благодаря таким свойствам Тем выполняют «сторожевую» функцию, а Тсм обеспечивают защиту на системном уровне и быстрый ответ на последующие введения антигена [10, 11].

В отношении преимущественной противоопухолевой активности эффекторных или центральных Тм высказываются различные мнения, хотя чаще приоритет отдают Тсм [7, 9]. Есть данные о том, что вклад обоих видов клеток в противоопухолевую защиту хотя и разный по механизмам, но комплементарный, и для ее оптимального осуществления необходимы обе субпопуляции Тм [12]. В литературе приводятся сведения, что при адоптивной иммунотерапии наличие среди Тм CD4⁺-лимфоцитов предотвращает истощение CD8⁺-лимфоцитов [13], а, следовательно, необходимо использовать их гетерогенную смесь [12, 13].

Некоторые авторы, кроме основных субпопуляций Тм, выделяют еще одну резидентную (Ттм), которая формируется из циркулирующих CD8⁺ Тм, экспрессируя в патологическом очаге дополнительные рецепторы CD103 [14]. Есть сообщения о различных фенотипических характеристиках CD8⁺ Тм в разных органах. Например, перитонеальная полость в нормальном состоянии содержит только эффекторные CD4⁺- и CD8⁺-лимфоциты, а при воспалении, кроме того, CD4⁺ и CD8⁺ Тм [14]. Сигналом к задержке Тм в очаге с последующей их трансформацией в Ттм-клетки может быть поступление антигена [15] или «цитокиновый взрыв», наблюдаемый при воспалении. Ттм-клетки описаны при воспалительных процессах [16, 17], но не при опухолевом росте.

Иммунологическим исследованиям при раке яичников посвящен ряд современных работ, планирующих разработку новых методов иммунотерапии [1, 18]. В ходе таких исследований авторами делаются неожиданные находки, касающиеся клеток иммунологической памяти, в частности, описана минорная субпопуляция Тм, экспрессирующая В-клеточный рецептор CD20⁺ вместе с IFN γ ⁺ и CD8⁺ [19], которая рассматривается как подавляющая опухолевый рост.

В норме в крови человека Тсм преобладают среди лимфоцитов субпопуляции CD4⁺, а Тем в субпопуляции CD8⁺ [11], при этом установлено различное содержание этих клеток в лимфоидных и нелимфоидных органах, а также некоторые различия их фенотипических и функциональных характеристик в зависимости от микроокружения [14].

Иммунная защита организма от опухоли осуществляется как на системном, так и на локальном уровне с участием различных клеточных факторов, а также их растворимых продуктов [18]. Однако роль присутствующих в микроокружении опухоли иммунокомпетентных клеток и цитокинов расценивается двояко, т. е. они рассматриваются как факторы не только способствующие ее регрессии, но и могущие стимулировать ее рост, тем более при распространенных стадиях [20–23].

Лечение рака яичников (РЯ) остается одной из сложных проблем в онкологии [24]. Согласно имеющимся в литературе данным, РЯ среди всех злокачественных опухолей находится на пятом месте по числу случаев, и, несмотря на постоянное совершенствование методов диагностики и лечения, занимает лидирующее место по показателю смертности. Хотя РЯ чувствителен к химиотерапии, он редко поддается полному излечению и склонен к частому

и раннему рецидивированию. Стандартом лечения РЯ III–IV стадий в настоящее время является хирургическое лечение в сочетании с химиотерапией, однако технические трудности, обусловленные распространенностью опухолевого процесса, не позволяют выполнить циторедуктивную операцию в оптимальном объеме. В том случае, когда провести операцию не представляется возможным, первым этапом лечения проводят неoadъювантную химиотерапию, а после операции выполняется адъювантная химиотерапия; наиболее часто для проведения химиотерапии используется комбинация «Паклитаксела» и «Карбоплатина» с интервалом в три недели [25].

Рекомбинантный интерферон-гамма (рИФН γ) «Ингарон», разработанный российскими учеными в виде формы для инъекций и направленный на стимуляцию клеточного иммунитета, обладает противовирусным, антипролиферативным и иммуномодулирующим действием [26]. Его противоопухолевое действие связано со способностью активировать естественные киллеры (NK-клетки), цитотоксические Т-лимфоциты и макрофаги. При применении в комбинации с цитостатиками он помогает преодолевать резистентность опухолевых клеток к химиотерапии, существенно повышая эффективность лечения [27]. Данный препарат исследовался и применялся при раке шейки матки, раке молочной железы, легкого, меланоме, колоректальном раке, продемонстрировав эффективность даже в далеко зашедших стадиях [28].

Целью работы было оценить роль Т-клеток иммунологической памяти в формировании противоопухолевого иммунитета у больных раком яичников на этапе неoadъювантного лечения, включающего химиоиммунохимиотерапию с применением рекомбинантного интерферона-гамма.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на базе отделения онкогинекологии отдела органов репродуктивной системы и лаборатории иммунофенотипирования опухолей Ростовского научно-исследовательского онкологического института в период с 2013 по 2017 г. Обследованы 30 больных РЯ в возрасте от 34 до 77 лет; средний возраст — $54,9 \pm 1,3$ года. Все больные были первично выявленными; средняя продолжительность анамнеза составляла 7 мес. Все больные дали письменное добровольное информированное согласие на проведение лечения, все исследования выполнены в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2013). Исследование утверждено протоколом этического комитета РНИОИ № 24 от 23.11.2012.

Критериями включения больных в исследование были: возраст старше 18 лет; верифицированный цитологически или морфологически рак яичников III–IV стадии, асцитная форма; отсутствие предыдущего специального лечения.

Критерии исключения: выраженная сопутствующая патология (перенесенный инфаркт миокарда, декомпенсированный порок сердца, сахарный диабет); прохождение химиотерапии, лучевой терапии, хирургического вмешательства, иммунохимиотерапии до начала исследуемого лечения; метастатическое поражение центральной нервной системы; беременность и лактация; любые причины, препятствующие регулярному лечению и наблюдению за пациентом.

Были сформированы две группы по 15 больных: основная, получающая химиотерапию с иммунохимиотерапией рИФН γ (ХИТ), и контрольная, получающая химиотерапию (ХТ).

Сравнительный анализ двух групп больных, подвергшихся неoadъювантной химиотерапии с применением рИФН γ и без него, выявил, что в основной группе и в группе контроля с III стадией было по 11 (73,3 %) больных, с IV стадией — по 4 (26,7 %) больных; различия статистически незначимы ($p > 0,05$). В обеих группах наибольшее количество больных было в возрастной группе 50–59 лет: в основной группе — 5 (33,3 %) пациенток, в контрольной — 6 (40,0 %); статистически достоверной разницы не отмечено. Общее состояние больных оценивали по шкале ECOG–WHO, по которой у наибольшего числа больных было 2 балла: у 8 (53,3 %) и 9 (60,0 %) пациенток в основной и контрольной группах соответственно; различия статистически незначимы. Таким образом, на основании представленных данных следует, что больные сравниваемых групп в исходном состоянии были идентичны по возрасту, стадиям заболевания и общему состоянию, что дает право проводить сравнительный анализ.

Группу сравнения составили 20 практически здоровых женщин аналогичного возраста, у которых брали пробы крови.

Больных обследовали в динамике лечения: до и через 3 нед. после проведения ХТ (15 больных) и ХИТ (15 больных); такой промежуток между обследованиями был выбран в соответствии с интервалом между курсами лечения. Больные получили по 2–3 курса полихимиотерапии по схеме: «Карбоплатин» (AUC-6) внутривенно капельно, «Паклитаксел» 175 мг/м² внутривенно капельно, интервал между курсами 21 день. ХИТ выполняли следующим образом: рИФН γ («Ингарон» производства «Фармаклон», Россия) вводили внутримышечно в 1-й день 500 тыс. МЕ, во 2, 3, 5-й дни по 1 млн МЕ, в 4-й день проводили курс полихимиотерапии по той же схеме («Паклитаксел» + «Карбоплатин»). Обе группы больных были идентичны по возрасту, стадиям заболевания и общему состоянию.

В дальнейшем все больные подвергались хирургическому лечению, которое заключалось в экстирпации матки с придатками, экстирпации или резекции большого сальника или удалении придатков матки, в зависимости от эффективности проведенного лечения. В послеоперационном периоде больным основной группы выполнялась адъювантная ХИТ: на 9-й день после операции начинали вводить «Ингарон» внутримышечно по той же схеме. Проводили 2 курса лечения, включающего «Ингарон», затем 4 курса химиотерапии; всего больные получали 6 курсов адъювантного лечения. Больным контрольной группы выполняли 6 курсов ХТ.

Эффект неoadъювантного этапа лечения оценивали по наличию полной, частичной регрессии, общего эффекта, складывающегося из полной и частичной регрессии; стабилизации или прогрессирования опухоли согласно критериям ВОЗ для оценки эффективности лечения при солидных опухолях.

После окончания адъювантного лечения больных наблюдали в течение 3 лет, отмечали время наступления рецидива.

Кровь и асцитическую жидкость (АЖ) брали до начала и на этапах лечения. Общее количество исследованных образцов крови составило 98, АЖ — 47.

Проточная цитофлуориметрия лимфоцитов крови и АЖ. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США), оснащенном двумя лазерами с длинами волн возбуждения флуорофоров 488 нм и 633 нм с возможностью использовать до 6 моноклональных антител в одной пробирке

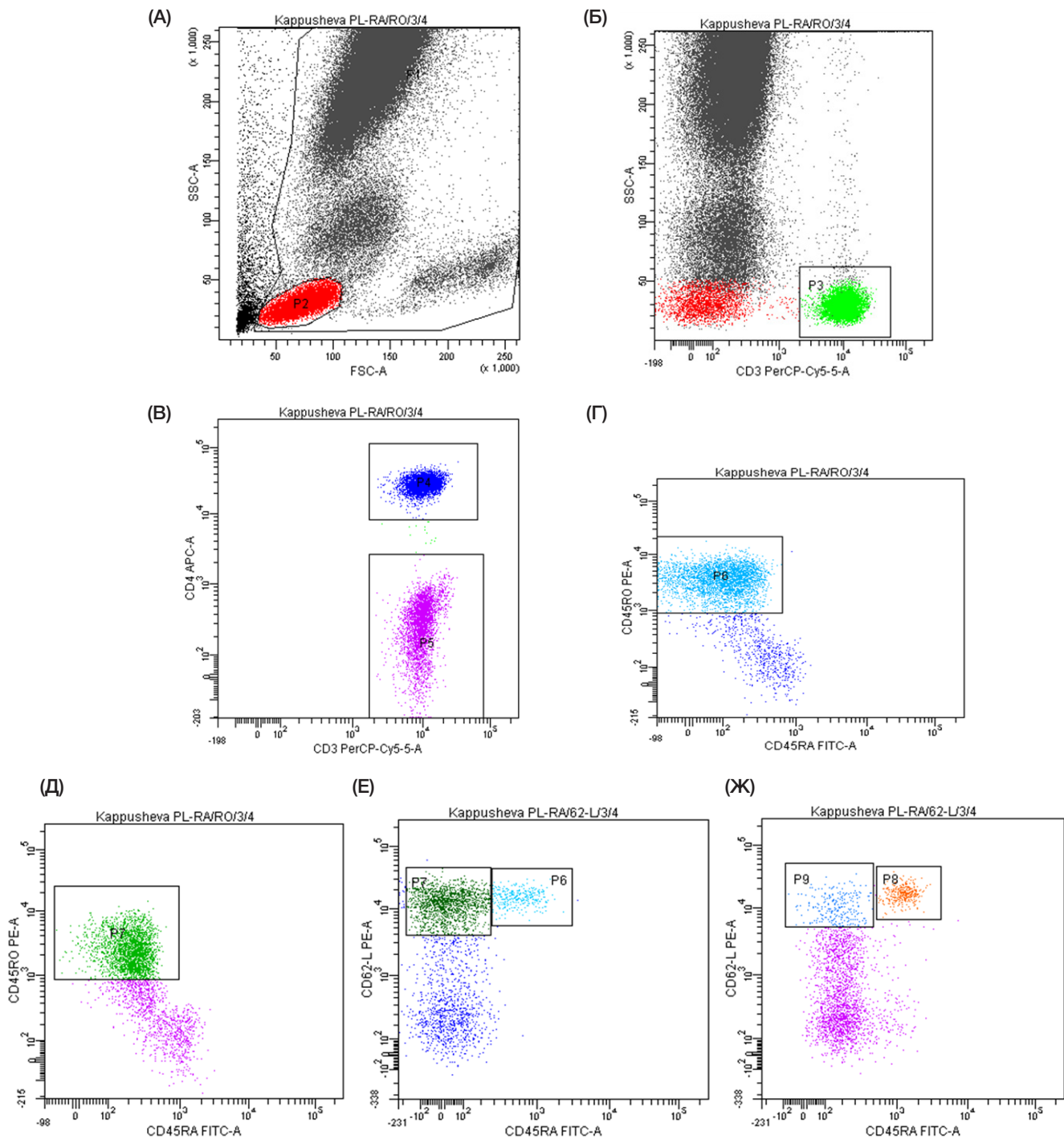


Рис. 1. Анализ Тm периферической крови методом проточной цитофлуориметрии: **(А)** — выделение региона лимфоцитов среди клеток крови; **(Б)** — определение популяции Т-лимфоцитов; **(В)** — распределение CD4 и CD8; **(Г)** — распределение CD45RA и CD45RO после логического ограничения по CD4; **(Д)** — распределение CD45RA и CD45RO после логического ограничения по CD8; **(Е)** — распределение CD45RA и CD62L после логического ограничения по CD4; **(Ж)** — распределение CD45RA и CD62L после логического ограничения по CD8

одновременно. Моноклональные антитела были конъюгированы со следующими флуорохромами: FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC, APC-Cy7. Инструментальные настройки прибора проводили с помощью стандартизированных флуоресцентных шариков BD FACS 7-color setup beads (BD Biosciences, США).

Процедура пробоподготовки и иммунофенотипическое окрашивание. Для оценки экспрессии рецепторов использовали иммунофенотипическое окрашивание. Окраску проводили с помощью флуоресцентно-меченых антител согласно протоколу производителя. На каждого обследо-

ванного приходилось 2 пробирки со следующими наборами моноклональных антител BD Multitest (Becton Dickinson, США):

- 1) CD45RA FITC/CD45RO PE/CD3 PerCP/CD4 APC (кат. № 340571) или CD45RA FITC/CD45RO PE/CD3 PerCP/CD8 APC (кат. № 340574);
- 2) CD45RA FITC/CD62L PE/CD3 PerCP/CD4 APC (кат. № 340977).

Данная панель антител позволяет определить содержание Th0, Tcm и Tem (CD62L⁺CD45RA⁺CD45RO⁻, CD62L⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ и CD62L⁻CD45RA⁻CD45RO⁺

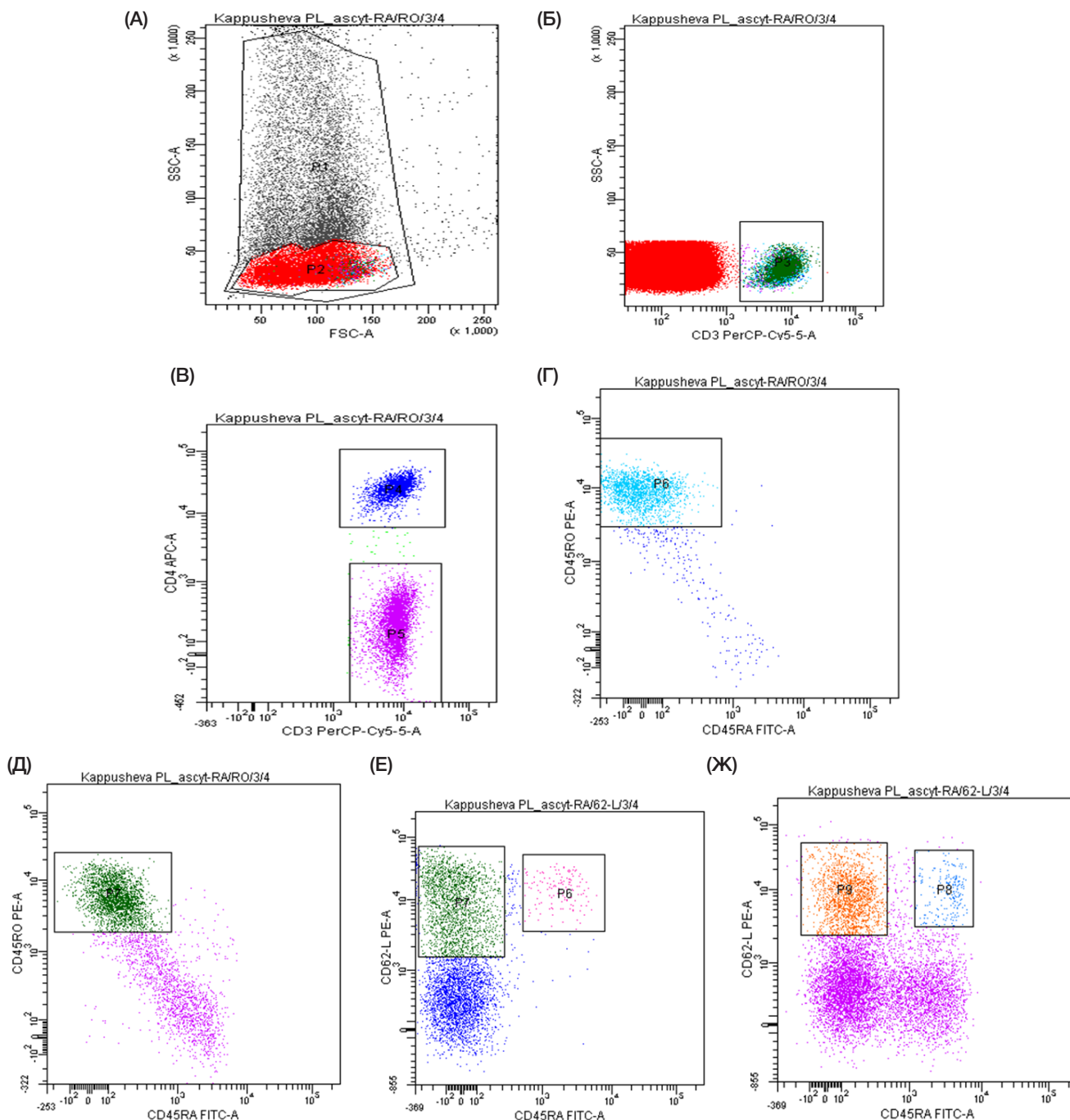


Рис. 2. Анализ Тм АЖ методом проточной цитофлуориметрии: (А) — выделение региона лимфоцитов; (Б) — определение популяции Т-лимфоцитов; (В) — распределение CD4 и CD8; (Г) — распределение CD45RA и CD45RO после логического ограничения по CD4; (Д) — распределение CD45RA и CD45RO после логического ограничения по CD8; (Е) — распределение CD45RA и CD62L после логического ограничения по CD4; (Ж) — распределение CD45RA и CD62L после логического ограничения по CD8

соответственно) среди CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляций Тм. В каждом образце для анализа данных накапливали не менее 50 000 клеток.

Тактика гейтирования и анализ данных. С помощью графика Dot Plot по параметрам прямого (относительный размер клеток) и бокового (структура клеток) светорассеяния выделяли область лимфоцитов. В пределах этого региона по маркерам CD3, CD4 и CD8 рассчитывали процент Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов в общей популяции лимфоцитов. Далее анализировали процент Т-лимфоцитов с фенотипами CD4⁺CD45RO⁺CD45RA⁻, CD8⁺CD45RO⁺CD45RA⁻, CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺, CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺ в популяциях Т-хелперов и цитотоксических Т-лим-

фоцитов. Для каждой пробы вычисляли коэффициенты Тм/Тh0 среди CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляций. Уровни Тсм и Тем определяли в процентах от количества Тм, принадлежащих к субпопуляциям CD4⁺ и CD8⁺; рассчитывали коэффициент Тем/Тсм. Примеры результатов проточной цитофлуориметрии крови и АЖ приведены на рис. 1 и 2.

Методы математической и статистической обработки. Математическую обработку цитофлуориметрических данных проводили в программе BD FACSDiva Software (Becton Dickinson, США). Для анализа результатов и статистической обработки использовали программный пакет Statistica 8.0 for Windows и MS Excel. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Использовали

также критерий Уилкоксона; оценку достоверности различий между частотой развития полного и общего эффекта, частотой рецидивирования проводили по критерию соответствия χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования представлены в табл. 1–4 и на рис. 3 и 4. В пробах биологических жидкостей обнаружены различия содержания Тм- и Th0-лимфоцитов. Как видно из табл. 1, в крови больных РЯ выявлен статистически достоверно более высокий уровень Тм среди CD3⁺CD4⁺-клеток и более низкий уровень Th0 среди CD3⁺CD8⁺-клеток по сравнению с показателями здоровых женщин ($p < 0,05$). При сопоставлении уровней Тм в крови и в АЖ больных РЯ выявлено выраженное преобладание их в АЖ ($p < 0,05$); в отличие от них уровни Th0 в АЖ были статистически значимо ниже по сравнению с кровью больных ($p < 0,05$) (табл. 1).

При этом не наблюдалось статистически достоверных различий между уровнями CD4⁺- и CD8⁺-клеток в крови и в АЖ, хотя содержание лимфоцитов и моноцитов в АЖ значительно превышало показатели крови. Так, несмотря на значительно более высокий уровень лимфоцитов в АЖ ($52,4 \pm 5,5$ против $17,4 \pm 2,7$ % в крови больных), содержание их основных субпопуляций в этих биологических жидкостях не имело статистически достоверных различий: уровень CD4⁺-клеток в крови составлял $49,2 \pm 3,1$ %, в АЖ — $48,7 \pm 3,2$ %, а уровень CD8⁺ — $18,4 \pm 2,7$ и $22,6 \pm 3,3$ % соответственно. Индекс CD4⁺/CD8⁺ в АЖ также не имел статистически достоверных отличий от показателя крови больных. Однако соотношение Тм/Th0, относящихся к обеим Т-клеточным субпопуляциям, было существенно выше в АЖ больных по сравнению с показателями их крови ($7,7 \pm 1,0$ против $2,9 \pm 0,5$ для CD4⁺-клеток и $6,5 \pm 1,3$ против $2,1 \pm 0,3$ для CD8⁺-клеток соответственно; в обоих случаях $p < 0,05$), что говорит о выраженном преобладании Тм над Th0 именно в опухолевом очаге по сравнению с периферической кровью.

Установлен также ряд различий по содержанию субпопуляций Тм в исследуемых биологических жидкостях (табл. 2).

Как видно из табл. 2, уровни Тем среди субпопуляций CD4⁺- и CD8⁺-клеток в АЖ статистически достоверно превышали содержание этих клеток в крови больных, а также в крови здоровых женщин ($p < 0,05$). По содержанию Тсм найдено различие только в субпопуляции CD8⁺ между их уровнем в АЖ больных и в крови здоровых женщин. Интересно, что не обнаружено статистически значимых различий исследуемых субпопуляций в крови больных и здоровых лиц.

Уровни Тем в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ в большинстве случаев оказались сходными, тогда как процент Тсм в субпопуляции CD4⁺-клеток был в 2–3 раза выше, чем в CD8⁺. Соотношение Тем/Тсм в пробах крови и АЖ характеризовалось преобладанием Тем в субпопуляции CD8⁺-клеток, превышая 1,0, и преобладанием Тсм в субпопуляции CD4⁺, где оно было ниже 1,0 (рис. 3).

Таким образом, сопоставление показателей системного и локального клеточного иммунитета при асцитных формах РЯ продемонстрировало преобладание Тм в крови больных по сравнению со здоровыми женщинами, а также в АЖ по сравнению с периферической кровью больных. При этом среди Тм, относящихся к CD4⁺, отмечено преимущественное содержание Тсм, а среди CD8⁺ Тм наблюдается преобладание Тем с накоплением последних в АЖ больных.

Анализ клинической динамики у больных основной и контрольной групп на этапе неoadьювантного лечения показал, что в основной группе, получавшей ХТ с рИФНу, полная регрессия опухоли отмечена у 4 (26,7 %) больных, в контрольной группе — у 1 (6,7 %) больной. При оценке общего эффекта от проводимого лечения получены статистически достоверные различия показателей основной и контрольной групп (87,0 и 30,0 % соответственно). Прогрессирование заболевания отмечено только в группе без применения рИФНу у 1 (6,7 %) больной.

После проведения 2–3 курсов неoadьювантной полихимиотерапии удалось выполнить оперативное лечение полного объема (экстирпация матки с придатками, резекция или экстирпация большого сальника) у 12 (80,0 %) больных основной группы и у 6 (40,0 %) — из контрольной; различия достоверны ($p < 0,05$). Неполный объем оперативного пособия, включающий удаление опухолей яичников с резекцией большого сальника, в основной группе был

Таблица 1. Количество Тм и Th0 субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ в крови и АЖ больных РЯ

Пробы	Тм, %		Th0, %	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Кровь здоровых женщин (n = 20)	55,0 ± 3,7	35,0 ± 4,3	23,4 ± 3,2	27,7 ± 3,7
Кровь больных РЯ (n = 30)	64,5 ± 2,3*	40,8 ± 5,1	22,4 ± 4,1	18,5 ± 2,7*
АЖ больных РЯ (n = 30)	79,2 ± 4,0***	57,5 ± 3,1***	10,2 ± 1,6***	9,5 ± 2,5***

Примечание. * — достоверные отличия от показателей крови здоровых доноров ($p < 0,05$); ** — достоверные отличия от показателей крови больных ($p < 0,05$). Здесь и далее в табл. 2–4 для расчета достоверности различий применяли критерий Уилкоксона.

Таблица 2. Количество центральных и эффекторных Тм с фенотипом CD4⁺ и CD8⁺ в крови и АЖ больных РЯ

Пробы	Тм CD4 ⁺		Тм CD8 ⁺	
	Тсм, %	Тем, %	Тсм, %	Тем, %
Кровь здоровых женщин (n = 20)	41,7 ± 2,5	17,8 ± 2,3*	17,7 ± 2,5*	24,1 ± 3,6*
Кровь больных РЯ (n = 30)	42,0 ± 3,1	24,8 ± 1,8*	22,0 ± 1,5	28,2 ± 3,2*
АЖ больных РЯ (n = 30)	47,1 ± 3,3	39,8 ± 3,9	27,0 ± 2,0	42,1 ± 4,1

Примечание. * — достоверные отличия от показателей АЖ больных ($p < 0,05$).

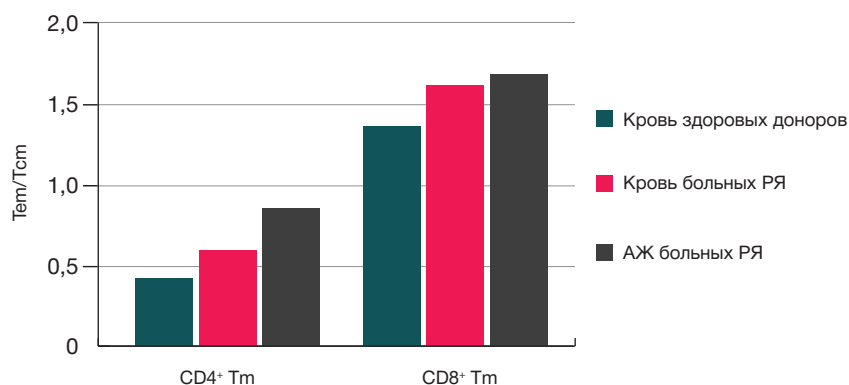


Рис. 3. Соотношение Тем/Тсм в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти

выполнен у 3 (20,0 %) больных, а в контрольной группе — у 8 (53,3%) пациенток, еще у 1 (6,7 %) больной из той же группы была выполнена пробная лапаротомия.

После проведения адъювантного лечения больных наблюдали в течение 3 лет. Процент возникновения рецидива у больных основной группы составил 46,7 % против 80,0 % в контрольной группе (7 и 12 больных соответственно), а средний срок его возникновения был $17,5 \pm 1,6$ мес. и $11,3 \pm 1,5$ мес. соответственно; различия достоверны ($p < 0,05$).

Учитывая, что больным выполняли разные по объему операции, для иммунологического исследования мы отбирали тех, кому проводили операцию одинакового типа, а именно полного объема.

Изучение динамики уровней Тм и Тh0 в крови больных при лечении с применением и без применения интерферона-гамма показало ряд различий (табл. 3). Обращает на себя внимание, что у больных основной группы, получавших ХТ с рИФНу, произошло снижение уровней наивных Тh0, статистически значимое к концу лечения ($p < 0,05$). В контрольной группе уровень этих клеток не отличался от исходного на протяжении всего срока наблюдения.

Соотношение Тм/Тh0 в процессе лечения статистически достоверно возрастало у больных основной, но не контрольной группы (рис. 4). Так, соотношение Тм/Тh0 среди CD8⁺-клеток у больных основной группы возросло с $2,5 \pm 0,5$ до $3,4 \pm 0,7$, а в контрольной группе снизилось с $1,7 \pm 0,3$ до $1,4 \pm 0,3$, оказавшись достоверно ниже, чем в основной ($p < 0,05$). В субпопуляции CD4⁺-лимфоцитов отмечено 2,5-кратное возрастание этого показателя в основной группе и отсутствие изменений в контрольной.

Несмотря на то, что содержание Тм не имело статистически достоверных различий в процессе лечения (табл. 3), оценка динамики процентного содержания Тсм и Тем у больных основной и контрольной групп показала наличие таких различий в субпопуляции Тм CD8⁺ (табл. 4).

В крови больных контрольной группы происходило постепенное снижение уровня Тсм, к концу лечения достигшее статистически значимого ($p < 0,05$); при этом уровни Тем не менялись.

Применение ХИТ с рИФНу первоначально приводило к подобным изменениям, однако, в финале лечения количество Тсм оказалось выше, а уровень Тем ниже у больных основной группы по сравнению с контрольной (табл. 4). Таким образом, в крови больных контрольной группы к концу лечения преобладали Тем, а в основной группе — Тсм (соотношение Тем/Тсм составляло $2,27 \pm 0,4$ и $0,62 \pm 0,18$ соответственно; $p < 0,05$).

Динамику уровней исследуемых субпопуляций в АЖ можно было определить только в тех случаях и в те сроки, когда происходило накопление АЖ, т. е. в предоперационном периоде. Было установлено, что в субпопуляции CD4⁺-лимфоцитов соотношение уровней Тм и Тh0 в динамике ХИТ с применением рИФНу статистически достоверно повышалось с $7,7 \pm 1,0$ до $13,0 \pm 1,5$ ($p < 0,05$). В АЖ больных той же группы отмечены изменения и в субпопуляции Тм CD8⁺, где произошло снижение уровня Тем ($13,6 \pm 4,6$ против $42,1 \pm 4,1$ % в контрольной группе; $p < 0,05$), а количество в ней Тсм имело тенденцию к повышению. Общее количество лимфоцитов после проведения ХИТ в АЖ составляло $42,2 \pm 7,8$ против $31,1 \pm 7,1$ % после ХТ (различия статистически недостоверны), однако после ХТ без рИФНу отмечено их достоверное снижение по сравнению с исходным показателем ($52,4 \pm 5,5$ %, $p < 0,05$). Кроме того, отмечены и другие статистически значимые различия: уровни CD3⁺- и CD4⁺-клеток были выше после ХИТ по сравнению с наблюдаемыми после ХТ, составив $82,1 \pm 6,3$ против $65,4 \pm 6,5$ % и $57,6 \pm 5,7$ против $42,6 \pm 2,5$ % соответственно; в обоих случаях $p < 0,05$).

Таким образом, в АЖ больных РЯ обнаружено более высокое содержание Тм как среди субпопуляций CD4⁺, так и среди CD8⁺ при более низких количествах Тh0, чем

Таблица 3. Динамика содержания Тм и Тh0 в крови больных РЯ основной и контрольной групп

Группа больных	Срок исследования	Тм, %		Тh0, %	
		CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Основная (n = 12)	до лечения	65,8 ± 4,2	40,9 ± 5,2	20,5 ± 3,5*	17,2 ± 1,6*
	после 2–3 курсов ХИТ	64,6 ± 6,1	37,7 ± 4,5	15,7 ± 3,4	16,5 ± 2,3
	после окончания ХИТ	72,8 ± 5,9	35,7 ± 5,1	9,7 ± 2,7	10,4 ± 2,6
Контрольная (n = 6)	до лечения	66,3 ± 4,4	38,1 ± 4,7	23,6 ± 4,6	23,6 ± 5,6
	после 2–3 курсов ХТ	59,1 ± 7,1	31,6 ± 4,5	16,8 ± 3,9	18,8 ± 3,2
	после окончания ХТ	63,2 ± 7,3	37,5 ± 7,2	24,4 ± 6,2*	27,3 ± 7,5*

Примечание. * — достоверные отличия от показателей основной группы после окончания ХИТ ($p < 0,05$).

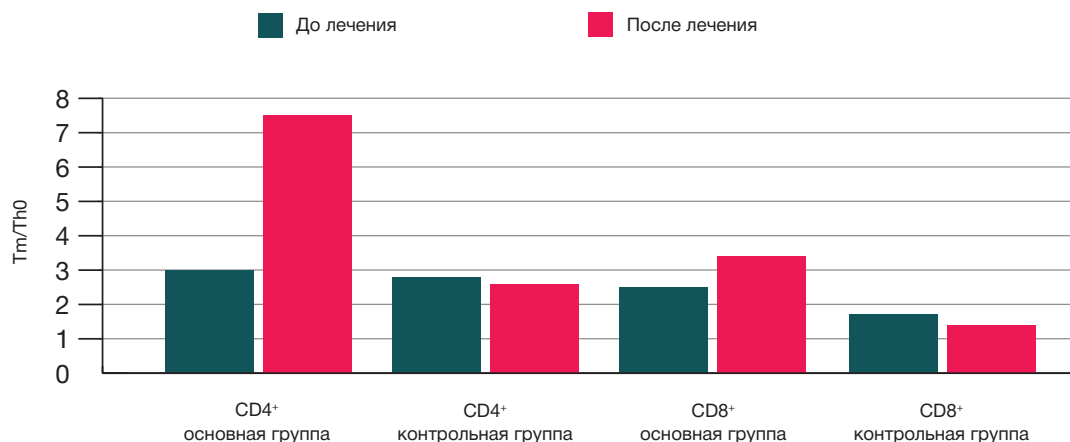


Рис. 4. Изменение соотношения Tm/Th0 в субпопуляциях CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов в крови больных РЯ до и после лечения

в крови больных; при этом выявлено преобладание Tem среди Tm CD8⁺. Показана разнонаправленная динамика Tem и Tcm клеток в крови и АЖ больных, подвергавшихся ХТ с включением и без включения препарата «Ингарон» (РИФНу).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учитывая важность биологической роли Tm при онкологических заболеваниях и возможность изменения их количества и соотношения субпопуляций при проведении иммунотерапии, нами было выполнено исследование уровней Tm, включая Tcm и Tem, а также Th0 в крови и асцитической жидкости больных РЯ до лечения и при проведении химиоиммунотерапии. Кроме ранее описанного нами присутствия в АЖ больных высокого количества лимфоцитов с преобладанием Tm [29], в данной работе показано превалирование среди последних Tem, преимущественно принадлежащих к субпопуляции CD8⁺. Хотя пока не представляется возможным установить их специфичность и обосновать предположение об их возможной противоопухолевой активности, данные литературы свидетельствуют о том, что поскольку экспансия лимфоцитов, находящихся в составе лимфоидного инфильтрата в опухоли (опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов), носит клональный характер, в окружении опухоли преобладают антиген-специфические лимфоциты [6]. При этом у больных РЯ, судя по наличию распространенного опухолевого процесса, не происходит развития эффективных иммунных реакций, причинами чего могут быть особенности микроокружения опухоли. Опухолевые клетки, находящиеся в АЖ, видимо, активируют перитонеальные макрофаги

и моноциты, что приводит к гиперпродукции цитокинов, обладающих проонкогенными свойствами [21]. Моноциты АЖ служат потенциальным источником макрофагов 2-го типа, поддерживающих опухолевый рост путем аутокринной продукции VEGF, EGF, TGF β , IL-6, IL-8, IL-10, чему способствует гипоксия, развивающаяся в опухолевой ткани [23, 30]. Эти же цитокины, а также хемокины, способные вырабатываться и опухолевыми клетками, стимулируют миграцию лимфоцитов в перитонеальную полость. По данным литературы, среди них находятся естественные T-регуляторные клетки (T-regs), обладающие иммуносупрессивной и проонкогенной активностью, количество которых у больных РЯ выше, чем у здоровых женщин [31], а в АЖ значительно выше, чем в крови [32]. Возможно, они блокируют активность T-лимфоцитов, в частности Tm, как и других лимфоцитов (NK⁺, CD8⁺), которые, несмотря на их высокое содержание, по-видимому, являются функционально неполноценными, как это было показано на примере CD8⁺ Tm, хронически стимулируемых при вирусных инфекциях [7, 9, 33, 34]. Tm, в отличие от T-regs, подвергаются апоптозу при взаимодействии с FasL, экспрессируемым эндотелиоцитами опухолевых сосудов, что рассматривается как один из защитных механизмов опухоли [35]. Возможно, применение воздействий, направленных на снятие локальной иммуносупрессии, позволило бы добиться результативного включения клеточных факторов в противоопухолевый иммунный ответ с возможностью повышения эффективности лечения РЯ.

Как описано нами ранее, применение «Ингарона» в курсе химиотерапии, наряду с другими позитивными изменениями иммунного статуса, вызывает снижение уровня Th0 у больных РЯ [36]. В данной работе, где сделан акцент на изучение Tm у этих больных, показано, что

Таблица 4. Динамика содержания Tcm и Tem в крови больных РЯ основной и контрольной групп

Группа больных	Срок исследования	Tm CD4 ⁺		Tm CD8 ⁺	
		Tcm, %	Tem, %	Tcm, %	Tem, %
Основная (n = 12)	до лечения	43,0 ± 2,5	26,3 ± 3,8	24,4 ± 3,6	25,8 ± 3,3
	после 2–3 курсов ХИТ	39,8 ± 4,1	26,8 ± 3,3	13,3 ± 3,4*	22,6 ± 3,7
	после окончания ХИТ	42,8 ± 3,8	28,4 ± 5,1	22,2 ± 2,9**	13,9 ± 3,6**,**
Контрольная (n = 6)	до лечения	42,3 ± 3,6	25,5 ± 2,8	22,5 ± 2,3	30,6 ± 4,9
	после 2–3 курсов ХТ	45,3 ± 4,7	23,7 ± 3,7	17,8 ± 4,0	25,3 ± 2,9
	после окончания ХТ	43,1 ± 6,1	23,8 ± 4,7	12,6 ± 2,2*	28,7 ± 3,3

Примечание. * — достоверные отличия от показателей до лечения ($p < 0,05$); ** — достоверные отличия от соответствующих показателей контрольной группы ($p < 0,05$).

применение рИФНу способствует увеличению преобладания Tm над уровнем Th0 в крови и в АЖ больных РЯ после химиоиммунотерапии, а также вызывает перераспределение Tm CD8⁺ в пользу Tsm, в отличие от больных, получавших химиотерапию без рИФНу, с чем отчасти может быть связано повышение клинического эффекта, наблюдаемое при включении данного иммунопрепарата в курс химиотерапии. Хотя в литературе описано, что при повторном введении антигена происходит нарастание пролиферативной активности и цитотоксичности как среди Tsm, так и среди Tem, входящих в субпопуляцию CD8⁺ T-клеток, считается, что эти свойства, а также более активное взаимодействие с антигенпрезентирующими клетками, более высокая антиген-индуцированная пролиферация, генерация цитотоксических T-эффекторов и хоуминг во вторичные лимфоидные органы превалирует у Tsm [7, 37]. Это говорит о преимуществе опухоль-специфичных CD8⁺ Tsm по сравнению с Tem как противоопухолевых факторов, что позволяет рассматривать полученные нами данные как один из механизмов реализации терапевтического действия «Ингарона» при асцитных формах РЯ.

ВЫВОДЫ

У больных асцитными формами рака яичников до лечения среди Tm, относящихся к CD4⁺, отмечено преимущественное содержание Tsm, а среди субпопуляции CD8⁺ — преобладание Tem с их накоплением в асцитической жидкости больных. Несмотря на высокие уровни Tm в крови и АЖ, их функция, по-видимому, является дефектной, вследствие чего представляется важным изучить возможность ее восстановления.

Положительная клиническая динамика у больных РЯ после завершения химиотерапии с рекомбинантным интерфероном-гамма по сравнению с получавшими только химиотерапию сопровождается снижением количества Th0 в крови больных, а среди CD8⁺ Tm — формированием преобладания Tsm над Tem. Поскольку подобные изменения развиваются и в АЖ, такая модуляция иммунологического микроокружения опухоли может вносить вклад в развитие полученного клинического эффекта, в частности, более длительного безрецидивного периода у больных РЯ после введения рекомбинантного интерферона-гамма.

Литература

- Cannon MJ, O'Brien TJ. Cellular immunotherapy for ovarian cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2009 Jun; 9 (6): 677–88. doi: 10.1517/14712590902932897
- Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2016 Mar 15; 8 (3): pii: E36. doi: 10.3390/cancers8030036
- Beckhove Ph, Feuerer M, Dolenc M, Schuetz F, Choi C, Sommerfeldt N, et al. Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. *J Clin Invest.* 2004 Jul 1; 114 (1): 67–76. doi: 10.1172/JCI200420278
- Dunbar PR, Smith CL, Chao D, Salio M, Shepherd D, Mirza F, et al. A Shift in the Phenotype of Melan-A-Specific CTL Identifies Melanoma Patients with an Active Tumor-Specific Immune Response. *J Immunol.* 2000 Dec 1; 165 (11): 6644–52. doi: https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6644
- Valmori D, Scheibenbogen C, Dutoit V, Nagorsen D, Asemussen AM, Rubio-Godoy V, et al. Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+) CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. *Cancer Res.* 2002 Mar 15; 62 (6): 1743–50.
- Hadrup S, Donia M, Thor Straten P. Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.* 2013 Aug; 6 (2): 123–33. doi: 10.1007/s12307-012-0127-6
- Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, Kerstann K, Cardones AR, Finkelstein SE, et al. Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul 5; 102 (27): 9571–6.
- Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, von Andrian UH. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8 (+) T cells. *J Exp Med.* 2001 Oct 1; 194 (7): 953–66.
- Wherry EJ, Teichgräber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol.* 2003 Mar; 4 (3): 225–34.
- Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999 Oct 14; 401 (6754): 708–12.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 745–63.
- Church SE, Jensen SM, Antony PA, Restifo NP, Fox BA. Tumor-specific CD4+ T cells maintain effector and memory tumor-specific CD8+ T cells. *Eur J Immunol.* 2014 Jan; 44 (1): 69–79. doi: 10.1002/eji.201343718
- Perret R, Ronchese F. Memory T cells in cancer immunotherapy: which CD8 T-cell population provides the best protection against tumours? *Tissue Antigens.* 2008 Sep; 72 (3): 187–94. doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01088.x
- Shin H, Iwasaki A. Tissue-resident memory T cells. *Immunol Rev.* 2013 Sep; 255 (1): 165–81. doi: 10.1111/imr.12087
- Zammit DJ, Turner DL, Klonowski KD, Lefrançois L, Cauley LS. Residual antigen presentation after influenza virus infection affects CD8 T cell activation and migration. *Immunity.* 2006 Apr; 24 (4): 439–49.
- Shin H, Iwasaki A. A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature.* 2012 Nov 15; 491 (7424): 463–7. doi: 10.1038/nature11522
- Mackay LK, Stock AT, Ma JZ, Jones CM, Kent SJ, Mueller SN, et al. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 May 1; 109 (18): 7037–42. doi: 10.1073/pnas.1202288109
- Preston CC, Goode EL, Hartmann LC, Kalli KR, Knutson KL. Immunity and immune suppression in human ovarian cancer. *Immunotherapy.* 2011 Apr; 3 (4): 539–56. doi: 10.2217/imt.11.20
- de Bruyn M, Wiersma VR, Wouters MC, Samplonius DF, Klip HG, Helfrich W, et al. CD20+ T cells have a predominantly Tc1 effector memory phenotype and are expanded in the ascites of patients with ovarian cancer. *Oncoimmunology.* 2015 Mar 19; 4 (4): e999536. eCollection 2015 Apr. doi: 10.1080/2162402X.2014.999536
- Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jul; 4 (7): 540–50. doi: 10.1038/nrc1388
- Бережная Н. М., Чехун В. Ф. Иммунология злокачественного роста. К.: Наукова Думка; 2005. 792 с.
- Fidler IJ. The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation.* 2002 Dec; 70 (9–10): 498–505.
- Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 2006 Jan 15; 66 (2): 605–12.
- Ашрафян Л. А., Киселев В. И., Муйжнек Е. Л., Герфанова Е. В., Антонова И. Б., Кузнецов И. Н. и др. Современные принципы эффективной терапии рака яичников. Опухоли женск. репрод. системы. 2015; 11 (2): 68–75.

25. Тюляндин С. А., Деньгина Н. В., Коломиец Л. А., Морхов К. Ю., Нечушкина В. М., Покатаев И. А. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака яичников/ первичного рака брюшины/ рака маточных труб. Злокачеств. опухоли. 2016; (4 Спецвып. 2): 123–34.
26. Шмелев В. А., Личиницер М. Р., Абрамов М. Е., Кузнецов В. В., Славина Е. Г., Кадагидзе З. Г. Инновационный противоопухолевый цитокиновый препарат Ингарон. Мед. алфавит. Диагностич. радиол. и онкотер. 2013; (3–4): 60–8.
27. Неродо Г. А., Новикова И. А., Златник Е. Ю., Арджа А. Ю. Применение Ингарона в комплексе с химиотерапией у больных раком яичников III–IV стадий. Фундамент. исслед. 2015; 1–8: 1649–54.
28. Брюзгин В. В., Платинский Л. В. Роль цитокинов в химиотерапии злокачественных опухолей: практика применения цитокиновых препаратов. Рефлот и Ингарон при распространенных опухолевых процессах с множественными метастазами. Совр. онкол. 2014; 16 (1): 70–5.
29. Златник Е. Ю., Неродо Г. А., Новикова И. А., Бахтин А. В., Загора Г. И., Селютин О. Н. и др. Молекулярные и клеточные факторы локального иммунитета в асцитической жидкости при раке яичников. Мол. мед. 2016; 14 (3): 39–42.
30. Pollard JW. Tumor-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jan; 4 (1): 71–8.
31. Курганова Е. В., Тихонова М. А., Лебедева В. А., Ласкавая Е. Г., Коваленко В. Ф., Останин А. А. и др. Характеристика регуляторных Т-клеток у больных раком яичников. Сибирск. онкол. журн. 2008; 30 (6): 40–5.
32. Ласкавая Е. Г., Лебедева В. А., Наров Ю. И., Тихонова М. А., Курганова Е. В., Останин А. А. и др. Регуляторные CD4⁺ и CD8⁺ клетки у больных с доброкачественными и злокачественными образованиями яичников. Сибирск. онкол. журн. 2010; (Прилож. 1): 67–8.
33. Chu T, Tzunik AJ, Roepke S, Berkley AM, Woodward-Davis A, Pattacini L, et al. Bystander-activated memory CD8 T cells control early pathogen load in an innate-like, NKG2D-dependent manner. *Cell Rep*. 2013 Mar 28; 3 (3): 701–8. doi: 10.1016/j.celrep.2013.02.020
34. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005 Dec 22; 353 (25): 2654–66.
35. Motz GT, Santoro SP, Wang LP, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, et al. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat Med*. 2014 Jun; 20 (6): 607–15. doi: 10.1038/nm.3541
36. Неродо Г. А., Златник Е. Ю., Новикова И. А., Бахтин А. В., Загора Г. И., Арджа А. Ю. и др. Показатели клеточного иммунитета при применении ингарона в качестве терапии сопровождения при раке яичников. Рос. иммунол. журн. 2015; 1 (1): 141.
37. Roberts AD, Ely KH, Woodland DL. Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses. *J Exp Med*. 2005 Jul 4; 202 (1): 123–33.

References

1. Cannon MJ, O'Brien TJ. Cellular immunotherapy for ovarian cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 Jun; 9 (6): 677–88. doi: 10.1517/14712590902932897
2. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2016 Mar 15; 8 (3): pii: E36. doi: 10.3390/cancers8030036
3. Beckhove Ph, Feuerer M, Dolenc M, Schuetz F, Choi C, Sommerfeldt N, et al. Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. *J Clin Invest*. 2004 Jul 1; 114 (1): 67–76. doi: 10.1172/JCI200420278
4. Dunbar PR, Smith CL, Chao D, Salio M, Shepherd D, Mirza F, et al. A Shift in the Phenotype of Melan-A-Specific CTL Identifies Melanoma Patients with an Active Tumor-Specific Immune Response. *J Immunol*. 2000 Dec 1; 165 (11): 6644–52. doi: https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6644
5. Valmori D, Scheibenbogen C, Dutoit V, Nagorsen D, Asemussen AM, Rubio-Godoy V, et al. Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+) CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. *Cancer Res*. 2002 Mar 15; 62 (6): 1743–50.
6. Hadrup S, Donia M, Thor Straten P. Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron*. 2013 Aug; 6 (2): 123–33. doi: 10.1007/s12307-012-0127-6
7. Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, Kerstann K, Cardones AR, Finkelstein SE, et al. Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 5; 102 (27): 9571–6.
8. Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, von Andrian UH. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8 (+) T cells. *J Exp Med*. 2001 Oct 1; 194 (7): 953–66.
9. Wherry EJ, Teichgräber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol*. 2003 Mar; 4 (3): 225–34.
10. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999 Oct 14; 401 (6754): 708–12.
11. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22: 745–63.
12. Church SE, Jensen SM, Antony PA, Restifo NP, Fox BA. Tumor-specific CD4+ T cells maintain effector and memory tumor-specific CD8+ T cells. *Eur J Immunol*. 2014 Jan; 44 (1): 69–79. doi: 10.1002/eji.201343718
13. Perret R, Ronchese F. Memory T cells in cancer immunotherapy: which CD8 T-cell population provides the best protection against tumours? *Tissue Antigens*. 2008 Sep; 72 (3): 187–94. doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01088.x
14. Shin H, Iwasaki A. Tissue-resident memory T cells. *Immunol Rev*. 2013 Sep; 255 (1): 165–81. doi: 10.1111/immr.12087
15. Zammit DJ, Turner DL, Klonowski KD, Lefrançois L, Cauley LS. Residual antigen presentation after influenza virus infection affects CD8 T cell activation and migration. *Immunity*. 2006 Apr; 24 (4): 439–49.
16. Shin H, Iwasaki A. A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature*. 2012 Nov 15; 491 (7424): 463–7. doi: 10.1038/nature11522
17. Mackay LK, Stock AT, Ma JZ, Jones CM, Kent SJ, Mueller SN, et al. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 1; 109 (18): 7037–42. doi: 10.1073/pnas.1202288109
18. Preston CC, Goode EL, Hartmann LC, Kalli KR, Knutson KL. Immunity and immune suppression in human ovarian cancer. *Immunotherapy*. 2011 Apr; 3 (4): 539–56. doi: 10.2217/imt.11.20
19. de Bruyn M, Wiersma VR, Wouters MC, Samplonius DF, Klip HG, Helfrich W, et al. CD20+ T cells have a predominantly Tc1 effector memory phenotype and are expanded in the ascites of patients with ovarian cancer. *Oncoimmunology*. 2015 Mar 19; 4 (4): e999536. eCollection 2015 Apr. doi: 10.1080/2162402X.2014.999536
20. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jul; 4 (7): 540–50. doi: 10.1038/nrc1388
21. Berezhnaya NM, Chekhun VF. *Immunologiya zlokachestvennogo rosta*. Kiev: Naukova Dumka; 2005. 792 p. Russian.
22. Fidler IJ. The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation*. 2002 Dec; 70 (9–10): 498–505.
23. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different

- tumor microenvironments. *Cancer Res.* 2006 Jan 15; 66 (2): 605–12.
24. Ashrafyan LA, Kiselev VI, Muizhnek EL, Gerfanova EV, Antonova IB, Kuznetsov IN, et al. [Current principles of effective therapy for ovarian cancer.] *Opukholy zhenskoy reproduktivnoy sistemy.* 2015; 11 (2): 68–75. Russian.
 25. Tyulyandin SA, Den'gina NV, Kolomiets LA, Morkhov KYu, Nechushkina VM, Pokataev IA, et al. Prakticheskie rekomendatsii po lekarstvennomu lecheniyu raka yaichnikov/ pervichnogo raka bryushiny/ raka matochnykh trub. *Zlokachestvennye opukholy.* 2016; (4 Suppl 2): 123–34. Russian.
 26. Shmelev VA, Lichinitser MR, Abramov ME, Kuznetsov VV, Slavina EG, Kadagidze ZG. Innovatsionnyy protivopukholevyy tsitokinovyy preparat Ingaron. *Medsitsinskiy alfavit. Diagnosticheskaya radiologiya i onkoterapiya.* 2013; (3–4): 60–8. Russian.
 27. Nerodo GA, Novikova IA, Zlatnik EYu, Ardza AYu. [Application of Ingaron in combination with chemotherapy in patients with stage III–IV ovarian cancer]. *Fundamental'nye issledovaniya.* 2015; (1–8): 1649–54. Russian.
 28. Bryuzgin VV, Platinskij LV. [The role of cytokines in the chemotherapy of malignant tumors: the practice of cytokines Refnot and Ingaron administration in advanced cancer with multiple metastases]. *Sovremennaya onkologiya.* 2014; 16 (1): 70–5. Russian.
 29. Zlatnik EYu, Nerodo GA, Novikova IA, Bakhtin AV, Zakora GI, Selyutina ON, et al. [Molecular and cellular factors of local immunity in ascitic fluid of ovarian cancer patients]. *Molekulyarnaya meditsina.* 2016; 14 (3): 39–42. Russian.
 30. Pollard JW. Tumor-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jan; 4 (1): 71–8.
 31. Kurganova EV, Tikhonova MA, Lebedeva VA, Laskavaya EG, Kovalenko VF, Ostanin AA, et al. [Regulatory T-cells in ovarian cancer]. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal.* 2008; 30 (6): 40–5. Russian.
 32. Laskavaya EG, Lebedeva VA, Narov Yul, Tikhonova MA, Kurganova EV, Ostanin AA, et al. Regulyatornye CD4⁺ i CD8⁺ kletki u bol'nykh s dobrokachestvennymi i zlokachestvennymi obrazovaniyami yaichnikov. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal.* 2010; (Suppl 1): 67–8. Russian.
 33. Chu T, Tyznik AJ, Roepke S, Berkley AM, Woodward-Davis A, Pattacini L, et al. Bystander-activated memory CD8 T cells control early pathogen load in an innate-like, NKG2D-dependent manner. *Cell Rep.* 2013 Mar 28; 3 (3): 701–8. doi: 10.1016/j.celrep.2013.02.020
 34. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2005 Dec 22; 353 (25): 2654–66.
 35. Motz GT, Santoro SP, Wang LP, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, et al. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat Med.* 2014 Jun; 20 (6): 607–15. doi: 10.1038/nm.3541
 36. Nerodo GA, Zlatnik EYu, Novikova IA, Bakhtin AV, Zakora GI, Ardza AYu, et al. Pokazateli kletchnogo immuniteta pri primeneni ingarona v kachestve terapii soprovozhdeniya pri rake yaichnikov. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal.* 2015; 1 (1): 141. Russian.
 37. Roberts AD, Ely KH, Woodland DL. Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses. *J Exp Med.* 2005 Jul 4; 202 (1): 123–33.