

ФЕНОТИП ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА И ПРЯМОЙ КИШКИ ПОСЛЕ ИММУНОТЕРАПИИ АКТИВИРОВАННЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ

Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Неприна Г.С., Пасова И.А.,
Бердов Б.А.

ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России, г. Обнинск, Россия

Резюме. В работе оценен фенотип лимфоцитов периферической крови и маркеры активации (HLA-DR, CD38, CD69, CD314, CD25) у 13 пациентов с диссеминированными формами рака желудка и толстой кишки до и после проведения адоптивной иммунотерапии с использованием активированных лимфоцитов. Показано, что лимфоциты хорошо активируются и пролиферируют *in vitro*. Было выявлено, что у пациентов повышено содержание Трег-лимфоцитов и NK-клеток. После иммунотерапии у всех больных сохранился исходно низкий уровень В-лимфоцитов (ср. 5%) и не изменилось содержание Трег-лимфоцитов. Выявлено увеличение экспрессии маркеров активации на всех лимфоцитах (CD25, CD314, CD38, HLA-DR) и на Т-лимфоцитах (CD3⁺HLA-DR, CD3⁺CD38⁺). Отмечено достоверное снижение в кровяном русле Т-хелперов и активированных NK-клеток (CD16⁺CD314⁺), снижение соотношения CD4⁺/CD8⁺. Незначительно повысилось содержание зрелых (CD45RO⁺) и снизилось содержание юных лимфоцитов (CD45RA⁺). Адоптивная иммунотерапия хорошо переносится, характеризуется отсутствием побочных эффектов и может рекомендоваться как сопроводительная к лучевой и химиотерапии.

Ключевые слова: адоптивная иммунотерапия, активированные лимфоциты, рак желудка и прямой кишки, фенотип лимфоцитов периферической крови

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2014-5-449-456>

Результаты исследований последних лет показывают способность опухоли привлекать клетки иммунной системы и создавать в своем микроокружении иммуносупрессивный фон, что препятствует формированию адекватного клеточного иммунного ответа. Поэтому актуален поиск путей повышения функции иммунной системы, в том числе для противоопухолевой защиты организма [1, 11, 12, 13, 15]. В связи с развитием молекулярной биологии и иммунологии,

все большее значение в терапии онкологических заболеваний приобретают комплексные подходы с использованием методов иммунотерапии, которые направлены на активацию противоопухолевой активности и усиление эффекторного звена иммунного ответа за счет цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) и NK-клеток [4–11]. Наиболее эффективным и перспективным методом для лечения различных форм злокачественных новообразований считается адоптивная тера-

Авторы:

Абакушина Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России, г. Обнинск, Россия
Маризина Ю.В. — лаборант-исследователь научно-организационного отдела ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России, г. Обнинск, Россия
Неприн Г.С. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России, г. Обнинск, Россия
Пасова И.А. — врач аллерголог-иммунолог, лаборатория клинической иммунологии ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России, г. Обнинск, Россия
Бердов Б.А. — д.м.н., профессор, заведующий отделом лучевых и хирургических методов лечения ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России, г. Обнинск, Россия

Адрес для переписки:

Абакушина Елена Вячеславовна
к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России
249036, Россия, Калужская область, г. Обнинск, ул. Королева, 4.
Тел.: 8 (484) 392-96-04.
Факс: 8 (495) 956-14-40.
E-mail: abakushina@mail.ru

Поступила 26.03.2014
Отправлена на доработку 20.04.2014
Принята к печати 28.04.2014

© Абакушина Е.В. и соавт., 2014

пия активированными цитотоксическими лимфоцитами в сочетании с цитокинами [4, 11, 13, 15]. Данные виды клеток применяются в адьювантном или неоадьювантном режиме после хирургического лечения и в комбинации иммунотерапии с традиционными методами химио- и/или лучевой терапии и/или гипертермией при различных онкологических заболеваниях [3, 8].

В настоящее время злокачественные новообразования желудка, толстой и прямой кишки вышли на лидирующие позиции по заболеваемости во всем мире, в том числе и в Российской Федерации [2]. Это связано с тем, что среди всех больных большинство, при первичном обращении к врачу, уже имеет запущенную стадию, что снижает возможности лечения этих пациентов. Соответственно, самый главный вопрос — это снижение смертности и повышение эффективности лечения рака толстой кишки и желудка. Развитие данного направления представляет собой новую стратегию, а данные заболевания могут явиться хорошей мишенью для адоптивной иммунотерапии [6, 13]. Показано, что неоадьювантное лечение противоопухолевыми вакцинами может повысить ответ на последующий курс химиотерапии, при этом индуцированный иммунотерапией Т-клеточный ответ не только не подавляется стандартными дозами химиопрепаратов, но и приводит к увеличению показателей выживаемости больных. Таким образом, предпочтительнее проводить иммунотерапию активированными клетками киллерами до начала химиотерапевтического лечения больного. Однако в клинической практике не всегда удается отложить лечение. В ряде случаев иммунотерапия проводится совместно с химио- и/или лучевой терапией. Фундаментальные исследования последних лет показывают, что иммунотерапия, основанная на активированных NK-клетках и Т-клетках, больных колоректальным раком в комбинации с химио- и/или лучевой терапией позволяет достигнуть лучших результатов в показателях выживаемости, чем при проведении монотерапии [14, 15].

Цель исследования: оценка субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у онкологических больных раком желудка и кишечника и маркеров активации лимфоцитов на этапах сопроводительной иммунотерапии с использованием лимфоцитов активированных *in vitro*.

Материалы и методы

В исследовании участвовали 13 пациентов с диссеминированными формами рака желуд-

ка ($T_{3-4}N_1M_{0-1}$) — 3 человека и прямой кишки ($T_{2-3}N_{1-2}M_{0-1}$) — 10 человек, которым в качестве базисного лечения проводилось хирургическое лечение, лучевая и/или химиотерапия. В работе оценен фенотип В-, Т-, NKT-, NK-лимфоцитов периферической крови и маркеры активации (HLA-DR, CD38, CD69, CD314, CD25) у 13 онкологических больных в возрасте от 40 до 57 лет до иммунотерапии и у 7 пациентов через 2-4 недели и 2-3 месяца после иммунотерапии. Объектом исследования служила периферическая кровь больных данной группы после получения письменного согласия.

Периферические мононуклеары выделяли из 40 мл гепаринизированной крови на градиенте плотности (Hystopaque-1077, Sigma, Великобритания) по стандартной методике. Лимфоциты культивировали в концентрации $1-2 \times 10^6$ кл/мл на протяжении 7-9 дней в полной питательной среде с гентамицином и L-глутамином (X-VIVO 20, Lonza, США), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, Великобритания) или аутологичной сыворотки, с 250 ед/мл IL-2 (ронколейкин, Биотех, Россия) и 50 нг/мл IL-15 (ImmunoTools, Германия) в CO₂ инкубаторе при 37 °С. Каждые 72 часа меняли половину питательной среды. На 3, 5, 7 и 9 день культивирования собирали необходимое количество клеток для иммунотерапии. Активированные лимфоциты в количестве 2-10 млн вводили внутривенно паравerteбрально в 4-8 точек. Фенотипирование флуоресцентно меченых лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре FACSscan (Becton Dickinson, США) до иммунотерапии, через 2-4 недели и 2-3 месяца после иммунотерапии. Использовали конъюгированные с PE или FITC антитела к CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25, HLA-DR, CD38, CD56, CD69, CD95 (Beckman Coulter, Франция) и CD314 (eBioScience, США).

Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica 6.0.

Результаты

Было обследовано 13 человек, больных раком желудка и кишечника. Адоптивная иммунотерапия активированными клетками проведена 7 пациентам, одному из которых было проведено 4 курса, двоим по 3 курса и четверем по 1 курсу адоптивной иммунотерапии аутологичными активированными *in vitro* лимфоцитами. В ходе исследования была подобрана панель маркеров активации лимфоцитов, налажен оригинальный метод культивирования лимфоцитов с использованием полной питательной среды, содержа-

шей ростовые факторы (инсулин, трансферин) и цитокины (IL-2 и IL-15), которые обладают стимулирующим влиянием на пролиферацию и активацию цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток. Изучение активации лимфоцитов на 3 день культивирования было проведено у 7 пациентов. Экспрессия маркеров активации

HLA-DR, CD38 и CD69 на всех лимфоцитах составила 28%, 53,3% и 59,8% соответственно. Среднее содержание рецептора NKG2D (CD314) на всех лимфоцитах было 66,8%. Количество NK-клеток в культуре составило 26,8%, а активированных NK-клеток (CD314⁺CD16⁺) – 24,8%. Таким образом, показано, что 92,5% NK-клеток

ТАБЛИЦА 1. ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ КАРТИНА ЛИМФОЦИТОВ И МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ ДО И ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОТЕРАПИИ БОЛЬНЫМ РАКОМ ЖЕЛУДКА И ПРЯМОЙ КИШКИ (СРЕДНЕЕ ± SD), %

Фенотип лимфоцитов	до иммунотерапии	после иммунотерапии через 2-4 недели	после иммунотерапии через 2-3 месяца
лимфоциты	28,57±12,48	28,50±10,59	29,24±7,12
CD20 ⁺	5,93±2,79	5,29±3,50	3,50±2,38
CD3 ⁺	68,60±12,74	76,00±9,33	69,80±11,97
CD3 ⁺ CD4 ⁺	44,93±10,12	46,71±8,48	37,00±5,39 [*]
CD4 ⁺ CD25 ^{bright}	8,21±3,66	6,50±3,89	11,25±8,46
(CD4 ⁺ CD25 ^{bright})/ лимфоциты	0,32±0,17	0,26±0,15	0,38±0,28
CD8 ⁺ CD3 ⁺	24,67±8,13	29,29±8,69	31,20±11,26
Индекс соотношения (CD4 ⁺ /CD8 ⁺)	2,11±1,08	1,83±1,02	1,28±0,35 [*]
CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁺	2,77±2,83	2,43±1,27	4,00±0,82 ^{**}
CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁻	22,93±11,78	15,43±7,63	16,80±5,72
(CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁻) /лимфоциты	1,07±0,91	0,60±0,36	0,57±0,09 [*]
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	9,27±4,62	9,29±7,30	13,80±8,47
HLA-DR	17,87±6,41	18,14±8,65	25,00±9,41
CD25 ⁺	9,79±4,44	9,00±4,00	16,00±10,55
CD314 ⁺	41,20±11,33	41,50±10,56	43,75±6,65
CD314 ⁺ CD16 ⁺	17,13±11,52	9,00±6,13 [*]	14,75±8,54
CD3 ⁺ CD38 ⁺	10,18±7,19	17,60±7,13	–
CD38 ⁺	28,27±8,93	31,00±10,86	–
CD69 ⁺	22,92±11,01	16,50±7,64	18,75±13,89
CD69 ⁺ CD16 ⁺	8,92±4,66	5,83±3,54	7,50±5,92
CD95 ⁺	44,17±18,29	52,83±22,52	59,20±20,62
CD95 ⁺ CD3 ⁺	33,73±11,37	44,00±17,32	44,60±13,46
CD45 ⁺ RO ⁺	42,91±9,22	45,25±3,86	–
CD45 ⁺ RO ⁺ RA ⁺	5,82±5,33	6,50±3,51	–
CD45 ⁺ RA ⁺	58,27±13,68	53,00±12,96	–

Примечание. * – достоверно отличающиеся значения относительно группы показателей до и через 2-4 недели после иммунотерапии (по t-критерию Стьюдента) (p ≤ 0,05);

** – достоверно отличающиеся значения относительно группы показателей через 2-4 недели и 2-3 месяца после иммунотерапии (по t-критерию Стьюдента) (p ≤ 0,05).

в культуре несут на своей поверхности рецептор NKG2D, который необходим для проведения активирующего сигнала внутрь клетки. Экспрессия альфа цепи рецептора IL-2 (CD25) на лимфоцитах составила 21%. Число активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺HLA-DR⁺) было 26,3%, незрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺CD38⁺) — 31,2%, а CD69⁺CD3⁺ — 41,2%.

До лечения в периферической крови у 5 (38%) больных отмечалось снижение относительного числа В-лимфоцитов меньше нижней границы нормы. У 6 (46%) больных наблюдалось повышение абсолютного и у 10 (78%) относительного содержания Трег-клеток (CD4⁺CD25^{bright}). Возможно, данные изменения связаны с увеличением иммуносупрессивного воздействия регуляторных Т-клеток у больных с диссеминированными формами рака. С другой стороны, более чем у половины пациентов (62%) процент НК-клеток превышал верхнюю границу нормы, что говорит о повышении противоопухолевой защиты и наличии онкологического заболевания [1]. Число всех активированных лимфоцитов (HLA-DR⁺) у больных в среднем составило 17,87%, CD25⁺ — 9,79%, CD38⁺ — 28,27%, а CD69⁺ — 22,92% (табл. 1). Экспрессия активирующего рецептора NKG2D (CD314) на всех лимфоцитах в среднем составила 41,2%, а на НК-клетках — 17,13%.

Через 2-4 недели после иммунотерапии у всех больных сохранился исходно высокий уровень Трег-лимфоцитов (среднее 6,5%), а через 2-4 месяца после иммунотерапии увеличился до 11,25%, что, возможно, связано с активацией супрессорных свойств регуляторных клеток в отдаленные сроки после иммунотерапии [5]. Исходно низкий уровень В-лимфоцитов сохранился через 2-4 недели (ср. 5,29±3,5%) и снизился до 3,5% через 2-3 месяца. Нормализовалось относительное число НК-клеток (в среднем 15,43%) и снизилось соотношение НК-клеток к лимфоцитам ($p = 0,05$). Возможно, это произошло за счет миграции НК-клеток из кровяного русла в органы мишени. С этим можно связать уменьшение относительного количества активированных НК-клеток (CD314⁺CD16⁺) ($p = 0,05$), CD69⁺CD16⁺ и юных форм лимфоцитов (CD45⁺RA⁺) через 2-4 недели после иммунотерапии.

Через несколько месяцев после иммунотерапии наблюдалась положительная тенденция в увеличении экспрессии маркеров активации на всех лимфоцитах (HLA-DR, CD25, CD314) и на HLA-DR⁺ Т-клетках. Экспрессия маркера апоптоза Fas (CD95⁺) на всех клетках и на Т-лимфоцитах (CD95⁺CD3⁺) также имела тен-

денцию к увеличению, правда, отличия от первоначальных значений недостоверные. Возможно, эти явления связаны с запуском долгосрочных каскадных реакций активации иммунитета. Отмечено достоверное снижение Т-хелперов и соотношения CD4/CD8, за счет некоторого увеличения CTL. Хотя относительное и абсолютное количество Т-лимфоцитов и CTL было в пределах референсных значений, выявлено достоверное увеличение содержания НКТ-клеток.

На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что для пациентов данной группы характерно снижение В- и повышение Трег-лимфоцитов и НК-клеток. После иммунотерапии наблюдается нормализация содержания НК-клеток и снижение их активированной субпопуляции в кровяном русле, а также увеличение активированных Т-клеток. Это явление, возможно, связано с более ранней миграцией активированных НК-клеток из циркуляции.

В работе была проанализирована динамика изменения субпопуляционного состава лимфоцитов и экспрессии маркеров активации у трех больных с диссеминированными формами рака прямой кишки и различным исходом заболевания (стабилизация процесса, частичная регрессия и прогрессирование).

Больной Г. 44 лет T2N2M0 на фоне химиотерапии была проведена иммунотерапия (ИТ) активированными лимфоцитами на протяжении 6 недель в количестве 35 млн. До начала иммунотерапии наблюдалось относительное повышение содержания лимфоцитов (45%) и субпопуляции Трег, отмечено снижение до 3% CD3⁺HLA-DR⁺ лимфоцитов и отношения CD4⁺/CD8⁺. Через месяц после проведения ИТ нормализовалось содержание лимфоцитов в крови, снизилось относительное содержание В-клеток до 2%, за счет повышения количества Т-клеток до 82% и CD3⁺CD8⁺ до 40%. Нормализовалось количество CD3⁺HLA-DR⁺, и увеличилось до 12% содержание антигена CD25⁺ на всех лимфоцитах. Экспрессия маркеров активации CD69⁺ на всех лимфоцитах через месяц после ИТ снизилась с 23 до 12%, а на НК-клетках с 8 до 4%. Наблюдалась тенденция к увеличению CD95⁺ лимфоцитов с 16 до 53% и CD3⁺CD95⁺ с 15 до 45%, экспрессия остальных изучаемых маркеров активации CD38 и CD314 практически не изменилась. Через 4 месяца после иммунотерапии клиническая ремиссия основного заболевания сочеталась с уменьшением в кровяном русле НК-клеток в 2 раза до 9%, CD3⁺HLA-DR⁺ в 5 раз с 16 до 3%, снижением CD314⁺ лимфоцитов в 2 раза с 51 до 23%, а CD314⁺ НК-клеток в 7 раз с 14 до 2%, CD69⁺

НК-клеток в 2,7 раза с 8 до 3%. Увеличение через месяц после ИТ количества $CD8^+$ Т-лимфоцитов до 40% нормализовалось до 29%. Данные изменения, возможно, связаны с перераспределением цитотоксических и активированных лимфоцитов в организме. Однако незначительно повысилось в кровяном русле содержание $CD38^+$ с 26 до 41%, за счет $CD3^+CD38^+$ с 10 до 25% (в 2,5 раза), что, может быть, связано с пролиферативной активностью циркулирующих лимфоцитов.

Больной Ч. 54 лет T4N2M2 после комплексного лечения между курсами химиотерапии была проведена иммунотерапия активированными лимфоцитами на протяжении 3 месяцев в количестве 30 млн. До иммунотерапии количество В-, Т-, Т-хелперов и $CD8^+$ Т-лимфоцитов было в пределах нормы, количество Трег-клеток было повышено до 14%, НК-клеток до 26%, $CD25^+$ лимфоцитов до 17%, процент HLA-DR⁺ Т-лимфоцитов снижен до 3%. Положительная динамика в клинической картине наблюдалась у больной через 1 месяц после окончания ИТ и проявилась стабилизацией процесса и незначительной лимфаденопатией, которая сохранялась на протяжении 6 месяцев. В иммунограмме через 2 месяца от начала ИТ появился лимфоцитоз, который сохранялся на протяжении 6 месяцев. Отмечена нормализация содержания в крови Трег, $CD25^+$ и $CD3^+HLA-DR^+$ лимфоцитов, повышение экспрессии маркеров поздней активации HLA-DR⁺ на лимфоцитах с 12 до 26% и некоторое снижение $CD314^+$ лимфоцитов с 50 до 40%. Количество лимфоцитов с фенотипом $CD16^+CD314^+$, $CD3^+CD38^+$, $CD38^+$, $CD69^+$ не изменилось. Число $CD69^+$ НК-клеток снизилось через 3 месяца после ИТ с 13 до 9% и повысилось до 18% через 8 месяцев. По данным УЗИ и КТ через 6 месяцев после ИТ отмечена забрюшинная лимфаденопатия и подмышечных впадин — положительная динамика, очаговых изменений в печени не выявлено. Гистологически подтвержден реактивный лимфаденит на фоне ИТ. В настоящее время через 10 месяцев после окончания ИТ наблюдается стойкая ремиссия.

Больному Ф. 55 лет T3N1M1 на фоне химиотерапии было проведено 3 курса иммунотерапии активированными лимфоцитами — каждый по 27 млн. До иммунотерапии у больного отмечалось снижение содержания в кровяном русле В-клеток до 5%, увеличение Т-клеток и субпопуляции $CD8^+CD3^+$ лимфоцитов, которое сохранялось на протяжении 5 месяцев. Через 4 месяца после иммунотерапии несколько уменьшилось содержание НКТ-клеток с 7 до 4%. Количество

НК-клеток было на нижней границе нормы и несколько повысилось до 12% через 3–4 месяца. Содержание маркера поздней активации HLA-DR было ниже нормы и увеличилось почти в 7 раз с 5 до 34% через 3 месяца после ИТ, за счет повышения доли активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+HLA-DR$) с 6 до 24%. Также за счет субпопуляции $CD3^+CD38^+$ лимфоцитов в 2,6 раз (с 16% до 41%) увеличилось содержание $CD38^+$ лимфоцитов, в 4,5 раза увеличился процент $CD69^+$ лимфоцитов (с 8% до 36%) и $CD69^+$ НК-клеток в 6 раз с 2 до 12%, экспрессия α -цепи рецептора IL-2 на лимфоцитах увеличилась почти в 3 раза с 4 до 11%. Процент клеток, экспрессирующих на своей поверхности маркеры $CD45^+RO^+$ и RA⁺ практически не изменился на протяжении всего периода наблюдения. Можно предположить, что стойкое увеличение количества Т-лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD8^+$ связано с повышением доли Т-супрессоров, а не цитотоксических лимфоцитов. Многократное повышение экспрессии маркеров ранней ($CD38$, $CD69$) и поздней ($CD25$, HLA-DR) активации лимфоцитов, видимо, связано с декомпенсацией работы иммунной системы, что, возможно, и привело к прогрессии заболевания и смерти пациента.

Обсуждение

Несмотря на активное исследование особенностей клеточного иммунитета при онкологических заболеваниях, многие детали пока остаются недостаточно изученными, что и диктует необходимость дальнейшего решения этой проблемы. Раскрытие данного явления и обнаружение субпопуляций лимфоцитов-супрессоров с фенотипом $CD3^+CD8^+CD28^+$ и $CD4^+CD25^{bright}CD127^{low}$ у онкологических больных может улучшить понимание механизма ускользания опухоли из-под иммунного надзора.

В работе показано, что адоптивная иммунотерапия хорошо переносится больными и характеризуется отсутствием побочных эффектов. У некоторых пациентов наблюдалось незначительное увеличение температуры до 37,5 °C на 2–3-й день после начала лечения, зуд и гиперемия в местах введения активированных лимфоцитов. Все пациенты отмечали положительные эмоциональные сдвиги, лучше переносили химиотерапию, в ряде случаев отмечена нормализация стула, уменьшение диспепсических явлений, улучшение настроения. Положительные отзывы пациентов дают основание полагать, что иммунотерапия активированными лимфоцитами может применяться для улучшения качества жизни

больных с диссеминированными формами рака желудка и прямой кишки.

Результаты данной работы и выявление активированных лимфоцитов в периферической крови у онкологических больных со злокачественными новообразованиями абдоминальной области

после проведенных курсов иммунотерапии могут рекомендовать иммунотерапию как сопроводительную к базисной терапии (лучевой и химиотерапии). Динамические наблюдения за фенотипом лимфоцитов могут дополнить клиническую оценку течения основного заболевания.

Список литературы / References

1. Абакушина Е.В., Кузьмина Е.Г., Коваленко Е.И. Основные свойства и функции НК-клеток человека // Иммунология. 2012. Т. 33, № 4. С. 220-224. [Abakushina E.V., Kuz'mina E.G., Kovalenko E.I. Osnovnye svoystva i funktsii NK-kletok cheloveka [The main characteristics of human natural killer cells]. *Immunologiya = Immunologiya*, 2012, Vol. 33, no. 4, pp. 220-224].
2. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность) / Под редакцией В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2012. 260 с. [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2010 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Pod redaktsiey V.I. Chissova, V.V. Starinskogo, G.V. Petrovoy [Malignancies in Russia in 2010 (morbidity and mortality). Eds.: Chissov V.I., Starinsky V.V., Petrova G.V.] Moscow: FGBU «MNIIOI after P. A. Hertzen» Minzdravsocrazvitija Rossii, 2012. 260 p.]
3. Исмаил-заде Р.С., Белевцев М.В., Потапнев М.П., Савицкий В.П., Жаврид Э.А. и Буглова С.Е. Иммуномодулирующее действие препаратов ИЛ-2 и ИФН-α в комбинации с сеансами общей гипертермии на этапах интенсивной химиотерапии у детей с далеко зашедшими злокачественными новообразованиями // Медицинская иммунология. 2006. Т. 8, № 4. С. 561-566. [Ismail-zade R.S., Belevtsev M.V., Potapnev M.P., Savitskiy V.P., Zhavrid E.A. i Buglova S.E. Immunomoduliruyushchee deystvie preparatov IL-2 i IFN-α v kombinatsii s seansami obshchey gipertermii na etapakh intensivnoy khimioterapii u detey s daleko zashedshimi zlokachestvennyimi novoobrazovaniyami [IL-2 and IFN-alpha induced changes of peripheral blood lymphocyte subpopulations in children with advanced malignancies, treated with chemotherapy and whole body hyperthermia]. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology*, 2006, Vol. 8, no. 4, pp. 561-566].
4. Киселевский М.В. Адоптивная иммунотерапия при злокачественных новообразованиях // Вестник Российской академии наук. 2003. № 1. С. 40-44. [Kiselevskiy M.V. Adoptivnaya immunoterapiya pri zlokachestvennykh novoobrazovaniyakh [Adoptive immunotherapy for malignant tumors]. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk = Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 2003, no. 1, pp. 40-44].
5. Козлов В.А., Черных Е.Р. Современные проблемы иммунотерапии в онкологии // Бюллетень СО РАМН. 2004. Т. 112, № 2. С. 13-19. [Kozlov V.A., Chernykh E.R. Sovremennyye problemy immunoterapii v onkologii [Modern problems of cancer immunotherapy]. *Byulleten' SO RAMN = Bulletin of Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2004, Vol. 112, no. 2, pp. 13-19].
6. Курилин В.В., Хантакова Ю.Н., Облеухова И.А., Шевченко Ю.А., Куликова Е.В., Якушенко В.К., Соколов А.В., Сенников С.В. Стимуляция дендритными клетками in vitro противоопухолевой цитотоксической активности моноклеарных клеток больных колоректальным раком // Медицинская иммунология. 2013. Т. 15, № 3. С. 235-246. [Kurilin V.V., Hantakova Yu.N., Obleukhova I.A., Shevchenko Yu.A., Kulikova E.V., Yakushenko V.K., Sokolov A.V., Sennikov S.V. Stimulyatsiya dendritnymi kletkami in vitro protivopukholevoy tsitotoksicheskoy aktivnosti mononuklearnnykh kletok bol'nykh kolorektal'nykh rakom [In vitro stimulation of antitumor cytotoxic activity of mononuclear cells from colorectal cancer patients]. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology*, 2013, Vol. 15, no. 3, pp. 235-246].
7. Нехаева Т.Л. Оптимизация аутологичных дендритно-клеточных вакцин для лечения больных злокачественными новообразованиями // Сибирский онкологический журнал. 2013. Т. 57, № 3. С. 52-56. [Nekhaeva T.L. Optimizatsiya autologichnykh dendritno-kletochnykh vaktzin dlya lecheniya bol'nykh zlokachestvennyimi novoobrazovaniyami [Autologous dendritic cell vaccine optimization for therapy of patients with disseminated malignant neoplasms]. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2013, Vol. 57, no. 3, pp. 52-56].
8. Титов К.С., Киселевский М.В., Демидов Л.В., Сельчук В.Ю., Грицай А.Н., Кучмезов Э.Х. Внутривентрикулярная биотерапия с использованием ИЛ-2 и донорских ЛАК-клеток при метастатических асцитсах у больных раком яичников // Российский биотерапевтический журнал. 2011. Т. 10, № 2. С. 51-54. [Titov K.S., Kiselevskiy M.V., Demidov L.V., Sel'chuk V.Yu., Gritsay A.N., Kuchmezov E.H. Vnutribryushinnaya bioterapiya s ispol'zovaniem IL-2 i donorskikh LAK-kletok pri metestaticeskikh astsitakh u bol'nykh rakom yaichnikov [Intraperitoneal IL-2 and allogeneic lymphokine activated killers biotherapy of malignant peritoneal

effusions in ovarian cancer patients]. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, 2011, vol. 10, no. 2, pp. 51-54].

9. Cheng M., Chen Y., Xiao W., Sun R., Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell. Mol. Immunol.*, 2013, Vol. 3, no. 10, pp. 1-23.

10. Sangiolo D., Martinuzzi E., Todorovic M., Vitaggio K., Vallario A., Jordaney N., Carnevale-Schianca F., Capaldi A., Geuna M., Casorzo L., Nash R., Aglietta M., Cignetti A. Alloreactivity and anti-tumor activity segregate within two distinct subsets of cytokine-induced killer (CIK) cells: implications for their infusion across major HLA barriers. *Int. Immunol.*, 2008, Vol. 20, no. 7, pp. 841-848.

11. Shen Y., Lu C., Tian W., Wang L., Cui B., Jiao Y., Ma C., Ju Y., Zhu L., Shao C., Liu X., Wang J., Zhang B., Lu Z. Possible association of decreased NKG2D expression levels and suppression of the activity of natural killer cells in patients with colorectal cancer. *Int. J. Oncol.*, 2012, Vol. 40, no. 4, pp. 1285-1290.

12. Terunuma H., Deng X., Nishino N., Watanabe K. NK cells-based autologous immune enhancement therapy for cancer. *JSRM*, 2013, Vol. 9, no. 1, pp. 9-13.

13. Todaro M., Orlando V., Cicero G., Caccamo N., Meraviglia S., Stassi G., Dieli F. Chemotherapy sensitizes colon cancer initiating cells to Vγ9Vδ2 T cell-mediated cytotoxicity. *PloS one*, 2013, Vol. 6, no. 8, pp. 1-8. e65145. doi: 10.1371.

14. van der Vliet H.J., Balk S.P., Exley M.A. Natural killer T cell-based cancer immunotherapy. *J. Clin. Cancer Res.*, 2006, Vol. 12, no. 20, pp. 5921-5923.

15. Zhang Z., Su T., He L., Wang H., Ji G., Liu X., Zhang Y., Dong G. Identification and functional analysis of ligands for natural killer cell activating receptors in colon carcinoma. *J. Exp. Med.*, 2012, Vol. 226, no. 1, pp. 59-68.

Medical Immunology/Meditsinskaya Immunologiya
2014, Vol. 16, No 5, pp. 449-456

ORIGINAL ARTICLES

LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN GASTRIC AND COLORECTAL CANCER PATIENTS AFTER IMMUNOTHERAPY WITH ACTIVATED LYMPHOCYTES

Abakushina E.V., Marizina Yu.V., Neprina G.S., Pasova I.A., Berdov B.A.

Medical Radiological Research Center, Russian Ministry of Health Care, Obninsk, Russian Federation

Abstract. Phenotyping of peripheral blood lymphocytes and immune activation markers of activation (HLA-DR, CD38, CD69, CD314, CD25) was performed in thirteen patients with disseminated forms of stomach and rectal cancer before cell treatment, and following adoptive immunotherapy with activated lymphocytes. It was shown that the lymphocytes are well activated and are able to proliferate *in vitro*. It was revealed that the relative content of Tregs and NK cells is increased in these patients. After the courses of immunotherapy, initially low levels of B-cells (average 5%) remained in all the patients, whereas concentration of Tregs didn't change. Increased expression of activation markers was revealed for all lymphocyte subsets (CD25, CD314, CD38, HLA-DR) and, especially, for T-lymphocytes (CD3⁺HLA-DR, CD3⁺CD38⁺). Significant decrease of T helpers, activated NK-cells (CD16⁺CD314⁺) and CD4⁺/CD8⁺ was noted in peripheral blood. A non-significant elevation in mature lymphocytes (CD45RO⁺) and reduced content of young lymphocytes (CD45RA⁺) were revealed. Adoptive immunotherapy is safe and well tolerated, being characterized by lack of side effects, and it may be recommended as a complement to conventional radio- and chemotherapy. (*Med. Immunol.*, 2014, vol. 16, N 5, pp 449-456)

Keywords: adoptive immunotherapy, activated lymphocytes, gastric and colorectal cancer, lymphocyte phenotype, peripheral blood

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2014-5-449-456>

Authors:

Abakushina E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, Medical Radiological Research Center, Russian Ministry of Health Care, Obninsk, Russian Federation

Marizina Yu.V., Laboratory Research Assistant, Science Organization Department, Medical Radiological Research Center, Russian Ministry of Health Care, Obninsk, Russian Federation

Neprina G.S., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Clinical Immunology, Medical Radiological Research Center, Russian Ministry of Health Care, Obninsk, Russian Federation

Pasova I.A., Immunologist, Laboratory of Clinical Immunology, Medical Radiological Research Center, Russian Ministry of Health Care, Obninsk, Russian Federation

Berdov B.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Radiology and Surgery Methods of Therapy, Medical Radiological Research Center, Russian Ministry of Health Care, Obninsk, Russian Federation

Address for correspondence:

Abakushina Elena V.

PhD, Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, Medical Radiological Research Center, Russian Ministry of Health Care

249036, Russian Federation, Obninsk, Kaluga Region, Koroleva str., 4.

Phone: 7 (484) 392-96-04.

Fax: 7 (495) 956-14-40.

E-mail: abakushina@mail.ru

Received 26.03.2014

Revision received 20.04.2014

Accepted 28.04.2014