

*На правах рукописи*

**ШУБИНА ИРИНА ЖАНОВНА**

**СТРАТЕГИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ЭФФЕКТОРОВ  
ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА В АДОПТИВНОЙ  
ИММУНОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ**

**14.01.12 - онкология**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук**

**Москва – 2012**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении  
«Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина»  
Российской академии медицинских наук  
(директор – академик РАН и РАМН, профессор Давыдов Михаил Иванович)

**Научные консультанты:**

доктор медицинских наук, профессор Михаил Валентинович Киселевский  
доктор медицинских наук, профессор Лев Вадимович Демидов

**Официальные оппоненты:**

Филатов Александр Васильевич доктор биологических наук, профессор,  
ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии»  
ФМБА России, заведующий  
лабораторией иммунохимии

Островская Лариса Анатольевна доктор биологических наук, Института  
биохимической физики им. Н.М.  
Эмануэля РАН, главный научный  
сотрудник лаборатории количественной  
онкологии

Бычков Марк Борисович доктор медицинских наук, профессор,  
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН,  
ведущий научный сотрудник отделения  
химиотерапии

**Ведущая организация:**

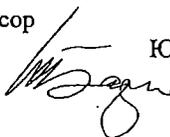
ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им.  
П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России

Защита состоится «8» 02 2013 г. в 10:00 часов на заседании  
диссертационного совета Д001.017.02 Федерального государственного  
бюджетного учреждения «Российский онкологический научный центр  
им. Н.Н.Блохина» Российской академии медицинских наук  
(115478, Москва, Каширское шоссе, 23).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.  
Блохина» РАМН (115478, г.Москва Каширское шоссе, 24).

Автореферат разослан «13» 12 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор



Юрий Андреевич Барсуков

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Клиническое применение методов иммунотерапии (биотерапии) злокачественных новообразований основано на способности иммунной системы организма элиминировать злокачественно трансформированные клетки [Smyth M.J., 2000; Барышников, А.Ю., 2003; Kim R., 2007; Olivos P., 2009]. Несмотря на более чем 20-летнюю историю исследований, противоопухолевая иммунотерапия остается новым, перспективным методом лечения злокачественных новообразований, рассматриваемая в качестве четвертой модальности в ряду традиционных методов хирургической, лучевой и химиотерапии опухолей [Hui D., 2009; Jiang J.T., 2010]. Актуальность внедрения в клиническую практику онкологии подходов иммунотерапии обусловлена недостаточной эффективностью современных схем консервативного лечения так называемых иммуночувствительных форм неоплазий (таких как меланома и рак почки) и ряда относительно химиорезистентных форм рака (немелкоклеточный рак легкого, рак желудка и др.) [Jiang J., 2006; Niu Q., 2011; Hontscha C., 2011]. Расширенные хирургические операции (радикальные и условно-радикальные) позволяют удалить новообразования и эффективно предупреждают развитие рецидивов опухоли, однако вероятность возникновения отдаленных метастазов у этих пациентов остается достаточно высокой, что свидетельствует о необходимости проведения системного лечения даже при местно-распространенных формах злокачественных новообразований [Pages F., 2005; Sagiolo D., 2011].

По данным ряда клинических исследований применение иммунотерапии после хирургической резекции опухоли увеличивает безрецидивный период, в некоторых случаях наблюдается стабилизация процесса злокачественного роста опухоли или регрессия метастазов. Актуальной проблемой является поиск методов биотерапии, направленных на активацию противоопухолевого иммунитета и повышение распознаваемости опухолевых антигенов [Pittet M.J., 2001; Provinciali M., 2009]. Терапевтические подходы противоопухолевой иммунотерапии основаны на стимуляции врожденного и приобретенного

иммунитета в результате воздействия<sup>1</sup> на неспецифическое и адаптивное эффекторное звено иммунной системы. Используемые для адаптивной иммунотерапии получаемые *ex vivo* эффекторы врожденного и приобретенного иммунитета (натуральные киллеры (НК), Т-лимфоциты, цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), инфильтрирующие опухоль Т-клетки (ОИЛ), НКТ-клетки, дендритные клетки (ДК) претерпевают дифференцировку под воздействием различного рода агентов и приобретают определенные морфологические, иммунофенотипические и функциональные свойства [Hiroishi K., 2000; Antony P., 2005; Zwinger N.W., 2007; Tap G., 2011]. Однако к настоящему времени многие аспекты, характеризующие применяемые в клинической практике эффекторы иммунитета, остаются неисследованными, а имеющиеся литературные данные часто противоречивы.

Практическое применение и повышение эффективности иммунотерапии злокачественных новообразований связано с решением сложного комплекса проблем на разных этапах этого метода лечения. Ключевым звеном здесь является разработка методики стандартизации и контроля качества клеточных препаратов на основе морфологической, фенотипической и функциональной характеристики эффекторов иммунитета. Кроме того, необходим поиск и оценка оптимальных режимов генерации функционально активных эффекторных клеток и иммуоудирующих препаратов. Важным и недостаточно разработанным аспектом иммунотерапии злокачественных новообразований является определение схем лечения, и выбор наиболее чувствительных в отношении данного метода терапии форм злокачественных заболеваний.

Таким образом, ввиду большого разнообразия существующих клеточных технологий, отсутствия стандартизованных параметров и методов контроля качества используемых клеток-эффекторов, а также неопределенность в подборе контингента онкологических больных, для которых данный вид иммунотерапии будет наиболее эффективным, и отсутствие ясных рекомендаций в отношении оптимальных режимов проводимой иммунотерапии, становится необходимой разработка современной стратегии получения и применения эффекторов

противоопухолевого иммунитета в адоптивной иммунотерапии злокачественных новообразований.

**Цель исследования.** Целью работы является изучение особенностей дифференцировки эффекторов противоопухолевого иммунитета под воздействием активационных факторов различной природы и экспериментальное обоснование стратегии применения адоптивной иммунотерапии злокачественных новообразований.

**Задачи исследования.**

1. Изучить особенности морфологической, иммунофенотипической и функциональной характеристики эффекторных клеток врожденного и приобретенного иммунитета человека, генерируемых экстракорпорально для адоптивной иммунотерапии.
2. Оценить возможность генерации активированных эффекторных иммунокомпетентных клеток из различных источников.
3. Изучить влияние отечественных иммуномодулирующих препаратов («Ронколейкин», «Дикарбамин», поликомпонентная вакцина «Иммуовак-ВП4», «Нейпоген», «Бивален», «Галавит») на морфологические, иммунофенотипические и функциональные свойства эффекторных клеток иммунитета.
4. Определить эффективность иммунотерапии с использованием активированных *ex vivo* интерлейкином-2 лимфоцитов и пульсированных лизатом опухоли дендритных клеток (в монорежиме) на экспериментальных животных с переносимыми опухолями.
5. Изучить эффективность комбинированной иммунотерапии с использованием активированных интерлейкином-2 лимфоцитов и вакцин на основе дендритных клеток на экспериментальных животных с переносимыми опухолями.
6. Оценить возможность оптимального применения активированных эффекторов противоопухолевого иммунитета для иммунотерапии онкологических больных со злокачественными выпотами в пилотном клиническом исследовании.

7. Разработать современную стратегию получения и применения стандартизованных эффекторов противоопухолевого иммунитета для адоптивной иммунотерапии злокачественных новообразований.

#### **Научная новизна**

Впервые представлена комплексная морфологическая, иммунофенотипическая и функциональная характеристика эффекторов противоопухолевого иммунитета, используемых для адоптивной иммунотерапии злокачественных новообразований.

Получены новые данные об особенностях дифференцировки эффекторных клеток иммунной системы при их генерации *ex vivo* из различных источников и при воздействии стимулирующих препаратов с различным механизмом действия.

Впервые проведена оценка наиболее эффективного клинического применения смешанной популяции активированных лимфоцитов в лечении злокачественных плевритов.

Разработана современная стратегия получения и применения активированных эффекторов противоопухолевого иммунитета для адоптивной иммунотерапии злокачественных новообразований.

#### **Научно-практическая значимость**

Разработаны методические рекомендации по получению смешанной культуры активированных натуральных киллерных клеток, определяющие оптимальные условия генерации эффекторов противоопухолевого иммунитета со стандартной морфологической, иммунофенотипической, функциональной характеристикой для использования в адоптивной иммунотерапии опухолей.

Предложено экспериментальное обоснование проведения противоопухолевой иммунотерапии с применением экстракорпорально активированных эффекторов иммунной системы, воздействующих как на звено врожденного, так и адаптивного иммунитета.

Показана высокая эффективность и удовлетворительная переносимость адоптивной иммунотерапии злокачественных плевритов с применением экстракорпорально активированных иммунокомпетентных клеток.

Полученные данные создают основу для разработки клинических протоколов по иммунотерапии онкологических больных. Внедрение в клиническую практику результатов работы обеспечит повышение эффективности адоптивной иммунотерапии при локорегионарном введении активированных эффекторов иммунитета при лечении злокачественных плевритов.

#### Основные положения, выносимые на защиту

- разработана двух-стадийная методика экстракорпоральной генерации активированных натуральных киллерных клеток, которая позволяет получить стандартизованную смешанную культуру эффекторных иммунокомпетентных клеток;
- получены и охарактеризованы по основным морфологическим, иммунофенотипическим и функциональным свойствам культуры активированных эффекторных клеток из различных источников (плевральный экссудат, селезенка после спленэктомии при радикальной операции рака желудка, паратуморальные участки печени);
- под влиянием отечественных иммуномодулирующих препаратов различного механизма действия («Ронколейкин», «Дикарбамин», поликомпонентная вакцина «Иммуновак-ВП4», «Нейпоген», «Бивален», «Галавит») в культуре мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека происходит стимуляция эффекторов иммунитета, обладающих характеристикой смешанной культуры активированных натуральных киллерных клеток;
- пилотные клинические исследования по применению иммунотерапии с использованием экстракорпорально генерируемых активированных лимфоцитов показали ее удовлетворительную переносимость и высокую эффективность при лечении метастатических плевритов;
- использование дендритных клеток в экспериментальных исследованиях позволило установить минимальную прививочную дозу, при которой выявлен протективный противоопухолевый эффект при вакцинации дендритными клетками, пульсированными лизатом аутологичной опухоли; показано

преимущество комбинированной иммунотерапии с применением активированных ИЛ-2 лимфоцитов и нагруженных опухолевым лизатом дендритных клеток;

- современная стратегия применения эффекторов противоопухолевого иммунитета подразумевает получение и контроль качества стандартной культуры активных иммунокомпетентных клеток; выявление чувствительных к иммунотерапии форм злокачественных новообразований; создание наиболее эффективного соотношения эффектор/мишень, которое достигается при локорегионарном воздействии или при максимальной опухолевой циторедукции; в результате иммунотерапевтического воздействия происходит активная стимуляция эффекторов врожденного и адаптивного иммунитета.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены на II Российской конференции по иммунотерапии и иммунореабилитологии, Москва, 1-3 февраля, 2005г.; IV Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва, 16-18 марта, 2005г.; V Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва, 21-24 марта, 2006г.; X Всероссийском научном форуме «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», 29 мая – 1 июня 2006г.; конференции «The 2-nd Russian–Japanese International Conference on Lung Cancer», Токио, Япония, 15-16 октября, 2006г.; семинаре «Опухолевые заболевания органов грудной полости у мелких домашних животных», Москва, 21 января 2007г.; VI Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва, 24-26 марта, 2007г.; VII Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва, 17-18 апреля, 2008 г.; V Всероссийской конференции по вопросам онкологии и анестезиологии мелких домашних животных - Москва, 24 января 2009г.; VI Всероссийской конференции «Онкология мелких домашних животных». Москва, 30-31 января 2010г. ; IX Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты», Нижний Новгород, 18-19 мая, 2010 г.; II Всероссийской конференции «Напоонкология», Тюмень, 26-28 сентября 2010г.; X Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препара-

ты», Москва, 22-23 марта 2011 г.; совместной научной конференции лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, лаборатории медицинской биотехнологии, лаборатории фармакоцитокинетики, лаборатории клеточного иммунитета, лаборатории фармакологии и токсикологии, лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза, лаборатории иммунофармакологии, лаборатории радиоизотопных методов исследования, лаборатории медицинской химии, лаборатории химико-фармацевтического анализа, лаборатория комбинированной терапии опухолей НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, отделения биотерапии, лаборатории клинической иммунологии опухолей НИИ КО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН 14 июня 2012 г.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано свыше 80 печатных работ в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе 33 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК РФ, 11 глав в монографиях, 40 тезисов в материалах различных конференций.

### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 5 глав собственных результатов, обсуждения, выводов, списка сокращений, списка литературы, включающего 44 отечественных и 326 зарубежных источников и двух приложений («Методические рекомендации по получению смешанной культуры а-НК» и «Алгоритм проведения диагностических и терапевтических мероприятий при опухолевом плеврите»). Материалы диссертации изложены на 348 страницах машинописного текста и иллюстрированы 44 таблицами и 71 рисунком.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### ***Объекты исследования и их характеристики***

Эффекторы противоопухолевого иммунитета генерировали *in vitro* из мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров (n=55), из лейкоцитов, выделенных из плеврального экссудата, фрагментов печени или

селезенки и лимфатических узлов, полученных при хирургических операциях онкологических больных. Для активации эффекторных клеток использовали препараты: «Ронколейкин» (ИЛ-2), «Дикарбамин», «Иммуновак ВП-4», «Галавит», «Нейпоген» (Г-КСФ), «Бивален» (МП-2).

Оценивали морфологическую характеристику клеток и иммунофенотип разных субпопуляций клеток на проточном цитометре FACSCalibur и FACSCanto II™ (Becton Dickinson & Co.). Для анализа экспрессии поверхностных клеточных антигенов использовали моноклональные антитела, конъюгированные с флуоресцентными красителями FITC, PE или APC к антигенам CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD38, CD14, CD56, CD57, CD58, CD80, CD86, CD83, CD40, HLA-DR, NKG2D, NKp30, MHC I (H-2Db MHC), MHC II (IAb MHC), CD20, CD19, NK, CD34, F4/80 («Caltag Laboratories»), а также к внутриклеточному маркеру FOXP3 и соответствующие изотипические контроли IgG1 и IgG2. Для иммуномагнитной сепарации клеток Treg CD4+CD25+FOXP3+ использовали набор Regulatory T cell isolation Kit («Miltenyi Biotec Inc.»), а для НК клеток (CD16+, CD56) - набор Dynal® NK Cell Negative Isolation Kit («DynaL Biotech»). Оценку функциональной активности эффекторных клеток проводили с помощью иммуноферментного анализа ELISA (тест-системы для определения цитокинов: IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, TNF-α, IFN-γ («BioSource»). Проллиферативную активность оценивали в колориметрическом тесте с витальным красителем AlamarBlue («BioSource»), а цитотоксическую активность определяли методом МТТ-теста с использованием линий опухолевых клеток K-562, A549, SCOV3, MCF7, Mel Cor, MelP, MelII, MelIb, YAC-1, L929, Colo и опухоли Эрлиха, нетрансформированных клеток LEK. Проводили иммуногистохимическое исследование материала лимфатических узлов с целью выявления контаминации опухолевыми клетками.

В результате разработанной двух-стадийной методики получена смешанная культура активированных натуральных киллерных клеток (α-НК) со стандартным соотношением субпопуляций Т-лимфоцитов (CD3+), НК-клеток (CD16+/CD56+), Т-регуляторных клеток (CD4+/CD25+/FOXP3+), НКТ-клеток

(CD3+/CD16-/CD56+) и повышенной экспрессией молекулы адгезии (CD58+), которая изучена в экспериментальном и пилотном клиническом исследовании.

### *Экспериментальные исследования*

Исследования выполнены с использованием 300 мышей-самцов линии СВА и С57Bl/6, полученных из питомника лабораторных животных РАМН «Столбовая», содержащихся в условиях вивария ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН согласно методическим указаниям «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» («Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» под общей редакцией Р.У.Хабриева, «Издательство «Медицина», 2005, С.832). Перевиваемые опухоли включали меланому В16, опухоль Эрлиха, рак яичников СаО-1.

### *Пилотные клинические исследования*

В исследование было включено 28 больных раком молочной железы (РМЖ) с опухолевым плевритом. Во всех случаях диагноз был морфологически подтвержден. Все больные проходили лечение в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН в 2005–2011гг., до начала иммунотерапии получали комбинированное лечение, на момент иммунотерапии большинство из них имели резистентность к химиотерапии. Пилотные клинические исследования проводили для оценки безопасности и эффективности локорегионарной иммунотерапии. Перед началом внутриполостной иммунотерапии, в середине и по окончании курса лечения производился забор экссудата на цитологическое исследование для оценки опухолевого процесса и количества иммунокомпетентных клеток, а также для иммунофенотипирования лимфоидных клеток. Пункции проводились в оптимальных точках скопления плеврального выпота на основании рентгенологических исследований.

Курс внутриполостной ИЛ-2/а-НК иммунотерапии включал введение рекомбинантного интерлейкина-2 («Ронколейкин») по 1 млн. МЕ и смешанной популяции а-НК (единовременно 100-150 млн.кл.)/сут., при средней продолжительности курса до достижения клинического эффекта 14 дней. Контроль эффективности иммунотерапии осуществляли рентгенологически, с

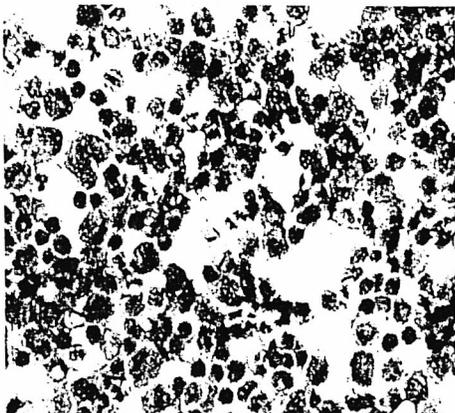
использованием КТ, цитологически и по объективной оценке прекращения экссудации. За полный клинический эффект принимали прекращение экссудации в течение месяца после завершения лечения, частичный эффект - наличие осумкованной жидкости, не требующей удаления.

Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента при помощи стандартного пакета статистических программ Windows 2000 (StatSoft 6), Exel и WINMDI 2.8., BD FACSDiva.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### *Современная методика получения и характеристика генерированных ex vivo активированных эффекторов противоопухолевого иммунитета*

Оптимальные условия разработанной 2-стадийной методики генерации смешанной популяции активированных натуральных киллерных клеток (а-НК) включают на первом этапе выделение моноклеарных клеток (МНК) из периферической крови на 2-х ступенчатом градиенте плотности, культивирование в полной культуральной среде в присутствии фактора роста Т-клеток ИЛ-2 (1000 МЕ/мл) при 37°C и 5 % CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. Затем пролиферирующую суспензию клеток, не прилипших к пластику культурального флакона, переносят в другой флакон для последующей инкубации, отделяя макрофагальные элементы (характеризующиеся высокой адгезией к пластику). В течение оптимального срока 3 – 5 сут. инкубации в присутствии ИЛ-2 (1000 МЕ/мл) в смешанной культуре а-НК достигается определенное соотношение субпопуляционного состава (Т-лимфоцитов, НК-клеток, Т-регуляторных, НКТ-клеток), что позволяет получаемой популяции клеток эффективно реализовывать цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток-мишеней. При морфологической оценке генерируемой культуры цитокин-активированных а-НК наблюдается увеличение числа клеток типа больших гранулярных лимфоцитов, пролимфоцитов и иммунобластов. с выраженной пиропинофильной реакцией, которая свидетельствует об активации их белок-синтезирующего аппарата (рис.1).



**Рис. 1.** Цитологический препарат. Смешанная популяция цитокин-активированных лимфоцитов при генерации в присутствии ИЛ-2 на 3-5 сутки инкубации. Окраска по Браше с контролем РНК-азой (x400).

Известно, что НК принадлежат к неспецифическому звену иммунитета и не требуют каскада реакций антигенной презентации, чтобы при контакте с трансформированной клеткой вызвать ее лизис. Показано, что литическая активность генерируемой в присутствии ИЛ-2 культуры МНЛ в первую очередь коррелирует с количеством CD56+/CD16+/CD3- НК-клеток [Fuchshuber PR, 1991]. В результате комплексной оценки иммунофенотипа смешанной популяции активированных ИЛ-2 МНЛ было выявлено изменение уровня экспрессии различных маркеров поверхностных клеточных антигенов по сравнению с интактными МНЛ. В целом, клетки смешанной популяции а-НК обладают повышенной экспрессией мембранных активационных молекул CD38, CD25, молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) II класса HLA-DR, антигенов НК CD16, CD56, CD57, а также характеризуются высоким уровнем экспрессии молекул адгезии CD58 (табл.1) и низким уровнем экспрессии маркера моноцитов/макрофагов CD14.

В культуре наблюдается рост количества клеток, экспрессирующих маркеры НК (CD16+, CD56+). Маркерами, отражающими повышенную активацию НК, проявляющих усиление функциональных свойств, считают экспрессию рецептора NKG2d и специфического активационного рецептора НК NKp30.

**Таблица 1.** Экспрессия поверхностных антигенов смешанной популяции а-НК и интактных МНЛ, выделенных из периферической крови здоровых доноров (3-5 сутки инкубации; %), (n=45)

Маркер	Смешанная популяция а-НК	МНЛ
CD3	42,3±8,7*	59,4±4,1
CD4	31,9±6,2*	43,1±6,6
CD8	20,2±4,5	30,8±2,3
<b>CD16</b>	<b>34,6±8,3*</b>	<b>11,9±1,5</b>
<b>CD25</b>	<b>38,3±5,9*</b>	<b>5,2±2,1</b>
<b>CD38</b>	<b>38,5±4,1*</b>	<b>19,9±4,8</b>
<b>CD56</b>	<b>41,9±9,3*</b>	<b>19,9±2,0</b>
<b>CD57</b>	<b>31,2±3,5*</b>	<b>8,9±2,4</b>
<b>CD58</b>	<b>84,2±4,8*</b>	<b>1,7±0,8</b>
<b>HLA-DR</b>	<b>69,2±5,1*</b>	<b>5,9±1,3</b>
<b>CD14</b>	<b>15,1±3,5*</b>	<b>2,2±1,5</b>

\*— достоверность различий между МНЛ и смешанной популяции цитокин-активированных а-НК,  $p < 0,05$

Было выявлено значительное повышение интенсивности флуоресценции NKG2d в смешанной популяции а-НК в течение 1-3 суток по сравнению с субпопуляцией НК в культуре неактивированных МНЛ (MFI= 90,0; 155,0 и 42,0; 105,0) (табл. 2). Экспрессия специфического маркера НКp30 также повышалась в присутствии ИЛ-2 по сравнению с интактными МНЛ (76,1 и 3,52; 75,03 и 46,7% от общего числа клеток). Процентный состав субпопуляций зрелых Т-лимфоцитов (CD3+) и НК (CD16+/CD56+/CD3-) также менялся в зависимости от срока инкубации. При инкубации с ИЛ-2 повышалась пролиферация НК, а генерация зрелых форм лимфоцитов замедлялась. Наибольшие различия в субпопуляционном составе смешанной культуры а-НК и интактных МНЛ наблюдались на 3-и сутки. С увеличением срока инкубации до 10 суток активационный потенциал популяции а-НК снижался до уровня контрольных значений. Интересно, однако, что интенсивность флуоресценции специфического маркера НК CD56 в смешанной преобладающей таковой интактной культуре МНЛ (MFI=2088,3 и 213,0; 3 сут.) и сохранялась повышенной вплоть до 10 суток инкубации.

**Таблица 2.** Экспрессия поверхностных антигенов и активационных рецепторов на а-НК в смешанной популяции цитокин-активированных МНЛ на разные сроки культивирования (n=15)

Маркер (субпопуляции или активационного рецептора)	Экспрессия соответствующего маркера (% от общего) или интенсивность флуоресценции (MFI)							
	1 сут		3 сут		5 сут		10 сут	
	а-НК	МНЛ	а-НК	МНЛ	а-НК	МНЛ	а-НК	МНЛ
Т-клетки (%) CD3+	23,85±2,2	40±3,1	46,5±2,4	62,9±4,3	42,5±3,4	53,7±2,7	65,8±3,2	58,8±3,5
НК (%) CD16+CD56+ CD3-	28,5±2,5	17,3±2,4	29,8±3,6	15,2±2,1	20,1±2,5	13,1±3,2	11,7±2,2	12,3±3,4
CD16+ (MFI)	110,0 ±5,4	110,0±4,2	203,0±5,7	152,0±2,4	52,0±2,3	43,0±3,5	197,0±7,1	132,0±6,7
CD56+ (MFI)	562,0±3,7 *	196,0±4,9	2088,3±12,7*	213,0±8,9	1427,0±10,2*	226,0±6,8	1720,0±61,2*	255,0±2,4,5
NKG2d+ (MFI) на НК (CD16+CD56+ CD3-)	90,0±2,7*	42,0±2,5	155,0±2,1*	105,0±2,3	96,1±2,8	119,5±2,9	158,0±2,3	117,7±2,7
НКp30 +(%) на НК (CD16+CD56+ CD3-)	76,1±3,4*	3,5±1,2	75,0±2,3*	46,7±1,7	42,4±1,3	21,4±1,3	28,9±1,2	30,8±1,1

\*— достоверность различий между группами,  $p < 0,05$

популяции цитокин-активированных а-НК увеличивалась до уровня в десять раз

Очевидно, что при активации цитокином роста ИЛ-2 в культуре клеток происходит не столько количественное увеличение а-НК, сколько повышение их функциональной активности, что отражается в существенном повышении экспрессии специфических маркеров активации НК NKp30 и NKG2d, а также значительном усилении интенсивности флуоресценции маркера НК CD56.

При анализе иммунофенотипа смешанной культуры а-НК, выделяется субпопуляция так называемых НКТ-клеток (CD3+/CD16+/CD56+), которые при активации способны быстро продуцировать цитокины Tх1 или Tх2 иммунной реакции. Установлено, что НКТ-клетки участвуют в противоопухолевом ответе, однако их роль может быть двойной – либо в подавлении опухолевого роста, либо, напротив, - супрессия иммунной реакции [Кадагидзе З.Г., 2011]. В условиях стимуляции МНЛ цитокином ИЛ-2 значительно увеличивается количество клеток

субпопуляции НКТ 1 - CD3+/CD16-/CD56+ (табл.3) в общем пуле активированной культуры по сравнению с клетками культуры без стимулятора (35,3% и 3,9%).

**Таблица 3.** Экспрессия поверхностных антигенов НКТ-клеток в смешанной популяции а-НК на разные сроки культивирования (n=15)

Маркер (субпопуляции или активационного рецептора)	Экспрессия соответствующего маркера (% от общего)							
	1 сут		3 сут		5 сут		10 сут	
	а-ИИК	МНЛ	а-ИИК	МНЛ	а-ИИК	МНЛ	а-НК	МНЛ
НКТ 1 CD3+CD16-CD56+	35,3±3,1 *	3,9±2,2	14,6±1,2 *	2,7±2,1	22,4±2,5	12,2±3,1	9,2±2,3	4,7±2,6
НКТ 2 CD3+CD16+CD56+	0	3,5±1,0	4,4±1,2	0,25±0,2	2,1±1,1	0	7,1±1,2	6,4±2,3
НКТ 3 CD3+CD16+CD56-	1,6±0,1	3,1±1,4	1,8±1,1	0,38±0,1	1,1±1,0	0	2,3±1,4	2,4±1,5

\*— достоверность различий между группами,  $p < 0,05$

В опубликованных ранее исследованиях [Park S.H., 2003; Godfrey D.I., 2000] было показано, что генерация НКТ происходит в печени в результате локальной секреции ИЛ-12 резидентными макрофагальными (дендритными) клетками, участвующими в презентации опухоль-ассоциированных антигенов. Как видно из полученных результатов субпопуляционной иммунофенотипической оценки смешанной цитокин-активированной культуры а-НК, пролиферация НКТ-клеток значительно возрастает и при воздействии ИЛ-2.

Обсуждая роль эффекторных клеток в противоопухолевом иммунитете, многие авторы считают, что популяция CD4+/CD25+ Т-клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор FOXP3 (Т-рег клетки) оказывает иммуносупрессорную функцию [Fontenot J.D., 2005], вызывая угнетение литической и секреторной функций НК, и контролирует их пролиферацию (эксперименты *in vitro*). Было показано, что функциональная активность НК обратно пропорциональна численности Т-рег у онкологических больных, а их удаление может стимулировать НК-опосредованный лизис опухолевых клеток *ex vivo* [Chen A., 2007]. В нашем исследовании результаты оценки экспрессии маркеров Т-рег, выделенных из смешанной популяции а-НК, свидетельствуют о том, что при генерации а-НК в течение 3–5 суток изменения процентного содержания субпопуляции Т-рег не наблюдается (табл. 4).

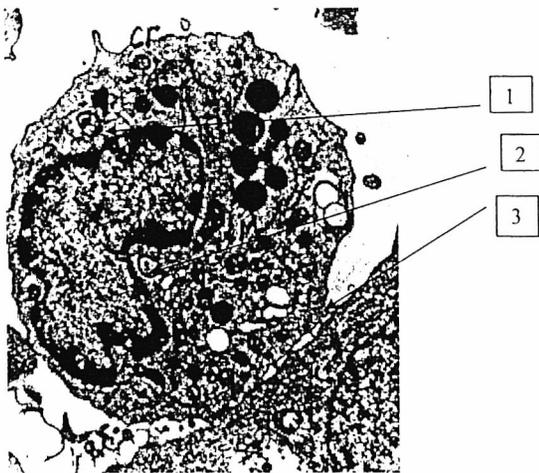
**Таблица 4.** Экспрессия маркеров Т-регуляторных клеток в смешанной популяции а-НК на разные сроки инкубации в присутствии ИЛ-2 (%), (n=10)

Время инкубации (сут)	CD4+CD25+FOXP3+		CD4+CD25+FOXP3-	
	а-НК	МНЛ	а-НК	МНЛ
1	1,6±1,0	3,2±1,1	7,7±1,7	7,25±1,1
3	2,9±1,1	3,5 ±1,5	6,7±3,1	6,1±2,1
5	1,3±1,0	3,1±1,3	4,4±0,5	5,1±1,1
10	3,0±1,2	4,2±1,4	5,1 ±2,5	7,5±2,2

Несмотря на колебания уровня экспрессии FOXP3+, процентная составляющая субпопуляции T-reg (CD4+/CD25+/FOXP3+) от общего числа CD4+/CD25+ Т-лимфоцитов в смешанной культуре а-НК и интактных МНЛ остается практически неизменной: 1%-4%. Вероятно, это может свидетельствовать в пользу существования регуляторных механизмов, которые поддерживают невысокий уровень Т-супрессоров CD4+/CD25+/FOXP3+ по отношению к общему количеству лимфоцитов здорового организма.

Функциональная активность НК-клеток, реализуемая через их цитолитические эффекты, может проявляться как естественная и антитело-зависимая цитотоксичность, в то время как цитолитические эффекты НКТ-клеток и ЦТЛ (цитотоксических лимфоцитов) проявляются в результате естественной и специфической (антиген-индуцированной) цитотоксичности [Abrams S.I., 1988]. Способность распознавать и лизировать трансформированные клетки сохраняется в популяции лимфоцитов, индуцированных ИЛ-2 [Gautan S.C., 1992]. Пусковым сигналом для реализации литической активности а-НК может стать также отсутствие ГКГ, его изменения (ассоциация с чужеродным белком или вирусная трансформация клетки) или ГКГ аллогенных нетрансформированных клеток.

На рис.2 видно, что клетки а-НК содержат большое количество гранул, иногда заключенных в везикулы. Наиболее изученный компонент этих гранул перфорин, играет важнейшую роль в реакции цитотоксичности – формирует поры



**Рис. 2.** Электроннограмма а-НК на 3 сутки активации интерликином-2: 1) везикулы с включениями гранул; 2) гранулы; 3) контакты а-НК с клеткой макрофагального ряда.

в мембране клетки-мишени и благодаря этому запускается цитолитический процесс. Помимо перфорины в состав гранул а-НК входят цитотоксические протеазы, в частности, гранзим В. Механизм цитолиза связан как с высвобождением компонентов гранул а-НК, так и с индукцией апоптоза различными секреторными продуктами этих клеток, и экспрессией молекул-лигандов на поверхности киллерных клеток.

При анализе цитотоксической активности смешанной популяции а-НК в отношении НК-чувствительной линии эритробластного лейкоза человека К-562 при разных соотношениях было установлено, что наибольшая степень цитотоксической активности а-НК наблюдается на 3 сутки генерации при соотношении 1:5 (кл.мишень/кл.эффектор). Клетки культуры а-НК вызывают гибель до 92% опухолевых клеток, в то время как МНЛ лизируют 42 % клеток К-562; ЭС50 при этом (эффективное соотношение) составляет 5,6 и 2,2.

Необходимо отметить, что основной вклад в эффективность киллерной функции получаемой смешанной популяции, вносят именно а-НК, поскольку клетки мишени (К-562) не несут специфических маркеров и полностью лишены экспрессии антигенов МНС I и II класса, и реализация киллерной функции

происходит, главным образом, по принципу: «свой» - «не свой» т.е. киллинг происходит независимым от экспрессии антигена и МНС образом..

Было также проведено сравнительное исследование цитотоксической активности клеток-эффекторов в отношении опухолевых и нетрансформированных клеток различных линий (табл. 5, 6, 7). Результаты расчета цитолитической активности лимфоцитов свидетельствуют о том, что киллерная способность клеток культуры а-НК значительно превышает цитотоксическую активность интактных МНЛ (табл. 5 и 6). Литическая активность смешанной популяции а-НК (при соотношении м/э 1:5) составила от 51,5% до 86,0% (цитотоксичность интактных МНЛ: от 28,0% до 68,0%).

**Таблица 5.** Цитотоксическая активность мононуклеарных лейкоцитов (МНЛ) и цитокин-активированных клеток смешанной популяции а-НК (а-НК) по отношению к клеткам солидных опухолей (%), (n=10)

Соотношение кл.мишень / кл.эффектор	Немелкоклеточный рак легкого А-549		Рак толстой кишки Colo		Рак яичника SKOV-3		Рак молочной железы человека MCF7	
	МНЛ (контр.)	а-НК	МНЛ (контр.)	а-НК	МНЛ (контр.)	а-НК	МНЛ (контр.)	а-НК
1:5	58,1±4,5	77,3±5,8*	68,2±9,7	86,3±5,1*	28,1±9,2	51,5±10,1*	10,2±5,2	62,5±5,8*
1:2	53,4±5,2	60,3±6,4	41,1±5,3	69,4±6,3*	25,2±8,9	40,3±9,2*	7,5±2,4	35,5±4,6*
1:1	42,2±3,1	58,6±6,2	33,3±3,4	57,4±2,7*	20,1±5,4	30,3±7,6	6,7±3,1	27,4±6,7*

\*— достоверность различий между МНЛ и а-НК,  $p < 0,05$

**Таблица 6.** Цитотоксическая активность мононуклеарных лейкоцитов (МНЛ) и цитокин-активированных клеток смешанной популяции а-НК (а-НК) по отношению к клеткам гемобластозов (%), (n=10)

Соотношение кл.мишень / кл.эффектор	В-леточная лимфома человека Raji		Эритробластный лейкоз человека K 562	
	МНЛ (контр.)	а-НК	МНЛ (контр.)	а-НК
1:5	48,4±2,7	59,3±3,8*	68,5±9,7	86,3±5,1*
1:2	33,2±5,3	40,5±3,4	41,7±5,3	69,4±6,3*
1:1	22,5±3,1	28,2±5,2	33,1±3,4	57,3±2,7*

\*— достоверность различий между МНЛ и а-НК,  $p < 0.05$

Интересно, что при ко-инкубации МНЛ или а-НК с клетками нормальных тканей цитотоксического эффекта не наблюдалось (табл. 7).

**Таблица 7.** Цитотоксическая активность мононуклеарных лейкоцитов (МНЛ) и цитокин-активированных клеток смешанной популяции а-НК (а-НК) по отношению к линиям нетрансформированных клеток (%), (n=10)

Соотношение кл.мишень / кл.эффиктор	Клетки легкого эмбриона теленка LEK		Фибробласты кожи	
	МНЛ (контр.)	а-НК	МНЛ (контр.)	а-НК
1:5	20,2±3,4	24,7±4,5	18,3±2,7	32,2±4,7
1:2	12,3±5,2	15,6±4,1	22,4±3,6	23,5±5,3
1:1	20,5±3,1	20,3±2,3	15,5±4,2	17,1±2,1

Таким образом, клетки смешанной популяции а-НК обладают избирательной противоопухолевой активностью по отношению к злокачественно трансформированным клеткам различного гистогенеза, не оказывая достоверного влияния на жизнеспособность клеток нормальных тканей.

В связи с тем, что с одной стороны, в литературе есть данные об участии отдельных цитокинов в стимуляции процесса злокачественного роста, а с другой стороны, существуют убедительные свидетельства о том, что цитокины обладают прямой противоопухолевой активностью или являются медиаторами противоопухолевого иммунитета, в нашей работе была проведена оценка «цитокиновой среды» смешанной популяции а-Н (табл. 8). При инкубации МНЛ в присутствии ИЛ-2 на 3 сутки отмечали повышенный уровень ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИФН- $\gamma$ , а также ИЛ-10 по сравнению со спонтанной продукцией цитокинов интактными МНЛ. На 5 сутки сохранялся повышенным уровень ИФН- $\gamma$ , экспрессируемого в основном НК, Th1 лимфоцитами и являющегося активатором ДК. В последующие сутки уровень всех показателей снижался. Содержание в среде ИЛ-2 на 3–4 сутки достигало 8987±433,8 пкг/мл. В основе действия ИЛ-2, называемого Т-клеточным фактором роста лежит стимуляция иммунного ответа за счет активации Т-клеточных популяций, в результате чего повышается синтез других, продуцируемых Т-клетками цитокинов, что способствует дифференцировке Т-

лимфоцитов по Th1-типу. Об этом же свидетельствует и отсутствие динамики в уровне IL-4, являющегося медиатором дифференцировки Т-лимфоцитов по Th2 типу и индуктором переключения В-лимфоцитов на синтез IgE.

**Таблица 8.** Продукция цитокинов в среде на 3 и 5 сутки культивирования МНЛ и смешанной популяции а-НК (в пг/мл), (n=10)

Цитокин	3 сутки		5 сутки	
	МНЛ	Смешанная популяция а-НК	МНЛ	Смешанная популяция а-НК
ИЛ-1 $\beta$	20,3 $\pm$ 5,1*	313 $\pm$ 21,5	25 $\pm$ 5,4*	75 $\pm$ 13,6
ИЛ-4	22,6 $\pm$ 9,2	10,8 $\pm$ 5,5	11 $\pm$ 5,8	12 $\pm$ 1,8
ИЛ-6	75,5 $\pm$ 12,6*	324 $\pm$ 21,2	12 $\pm$ 3,7*	100 $\pm$ 23,6
ИЛ-10	77,7 $\pm$ 5,2*	150 $\pm$ 10,5	35 $\pm$ 4,2*	50 $\pm$ 11,5
ИЛ-12	3,5 $\pm$ 1,0	25,7 $\pm$ 2,2	8,5 $\pm$ 5,8	7,0 $\pm$ 4,2
ФНО- $\alpha$	30,2 $\pm$ 0,3	40,7 $\pm$ 10,2	21,3 $\pm$ 0,3	33,2 $\pm$ 1,2
ИФН- $\gamma$	1,0 $\pm$ 0,9*	210 $\pm$ 22,3	1,0 $\pm$ 0,5*	198 $\pm$ 32,2

\* — достоверность различий между МНЛ и а-НК,  $p < 0.05$

В целом, рассмотренные аспекты оценки клеток смешанной популяции лимфоцитов, получаемых *ex vivo* по двух-стадийной методике в присутствии ИЛ-2 позволяют характеризовать данную культуру как состоящую из нескольких субпопуляций лимфоидных элементов, включая Т-клетки (CD3+) 35-55%, НК (CD16+/CD56+) 30-50%, Т-рег (CD4+/CD25+/FOXP3+) не более 4%, НКТ-клетки (CD3+/CD16-/CD56+) 10-14%. При этом высокая цитотоксическая активность реализуется в основном за счет активированных НК, экспрессирующих высокий уровень антигенов NKG2d и NKp30, а пролиферативная и цитокиновая секреторная активность отражают многофункциональность клеточных субпопуляций. Проведенные исследования позволили разработать методические рекомендации по получению смешанной культуры а-НК.

## *Генерация смешанной популяции а-НК из различных источников*

Наиболее часто в качестве источника для генерации активированных лимфоцитов используют МНЛ периферической крови [Fuchshuber PR, 1991; де Вита В.Т., 2002; Canderan G., 2010]. Однако в определенных условиях возможно получение аутологичных МНЛ для активации *ex vivo* и из других источников.

Для проведения внутриплевральной иммунотерапии злокачественных выпотов популяцию аутологичных а-НК генерировали из лимфоидных клеток, выделенных из злокачественного выпота.

Для коррекции иммунологических нарушений у группы больных раком желудка (РЖ) после радикальной операции с удалением селезенки изучали возможность применения адоптивной иммунотерапии. В связи с этим была разработана методика генерации а-НК-клеток из лимфоцитов селезенки для последующего применения в качестве ИЛ-2/а-НК терапии.

В случае хирургического лечения больных с опухолевым поражением печени было проведено исследование паратуморальных участков, полученных из операционного материала, с целью оценки клеточного состава опухолеинфильтрирующих лейкоцитов и возможности активации НКТ-клеток, которые в норме обнаруживают именно в составе лимфоцитарных элементов печени.

Полученные в результате активации ИЛ-2 МНЛ плеврального экссудата онкологических больных а-НК характеризуются значительно большей цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток:  $55,0 \pm 6,0\%$  по сравнению с  $10,0 \pm 4,0\%$  неактивированными МНЛ экссудата, ( $p < 0,05$ ), что, однако ниже цитотоксичности а-НК, генерированных из МНЛ периферической крови здоровых доноров (до 92%). Для иммунофенотипа данной популяции а-НК характерно увеличение экспрессии маркера НК CD16 (до 20%), активационных антигенов CD25 (до 14%), CD38 (до 24%), молекул адгезии CD58 (до 78%), маркера ГКГ II типа HLA-DR (до 49%) по сравнению с экспрессией тех же маркеров на поверхности МНЛ, выделенных из экссудата, которая для всех названных маркеров регистрировалась в пределах от 0 до 10%. Однако уровень экспрессии отмеченных поверхностных антигенов этой популяции а-НК был несколько ниже,

чем у клеток смешанной популяции а-НК, генерированных из периферической крови здоровых доноров (см. табл.1).

При анализе иммунофенотипа смешанной популяции а-НК, генерированных из лимфоцитов селезенки больных РЖ, наблюдали повышенную экспрессию активационных молекул CD38+, CD58+, HLA-DR+ и антигенов а-НК NKG2D и NKp30:  $34,5 \pm 4,0$ ;  $80,2 \pm 2,8$ ;  $69,2 \pm 5,1$ ;  $76,8 \pm 2,1$ ;  $65,0 \pm 2,3$ , соответственно, по сравнению с интактными клетками:  $18,8 \pm 5,8$ ;  $3,7 \pm 1,8$ ;  $5,9 \pm 1,3$ ;  $55,7 \pm 3,3$ ;  $40,6 \pm 1,7$ , при этом процентная составляющая субпопуляции T-reg CD4+/CD25+ была на уровне значений популяции а-НК, генерированных из МНЛ периферической крови здоровых доноров (1 - 4%). Полученные а-НК применялись в пилотном исследовании по оценке иммунокоррекции с помощью ИЛ-2/а-НК иммунотерапии у больных РЖ после радикальной операции со спленэктомией. В процессе проведения больным лечебной группы адьювантной адоптивной ИЛ-2/а-НК иммунотерапии, начиная с 4 курса данного лечения, была отмечена тенденция к восстановлению сниженных после операции показателей иммунного статуса (CD3, CD4, CD4/CD8) и полная их нормализация к 8 курсу иммунотерапии.

При опухолевом поражении печени в паратуморальной области обнаруживают большое количество НКТ-клеток. Эти клетки, по мнению ряда авторов [Тробонжаса Z., 2001, Тробонжаса Z., 2002, Park S.H., 2003], обладают антиметастатической активностью, а их активация может существенно усиливать цитотоксический потенциал данной разновидности НК.

В наших исследованиях НКТ-клетки, выделенные из параметастатических участков печени больных, обладали почти в 3 раза большей НК-активностью по сравнению с интактными МНЛ периферической крови этих пациентов. ЭС50 составляло 1,3 и 3,5, соответственно. При последующей генерации культуры а-НК из НКТ печени онкологических больных, а-НК по своей киллерной активности почти на порядок превышали цитотоксичность интактных МНЛ (ЭС50 = 0,27 и 3,5, соответственно). Уровень экспрессии дифференцировочных антигенов CD3, CD4 и CD8 в популяции клеток а-НК, полученных из лимфоцитов печени и периферической крови онкологических больных различен (табл. 9). Наиболее

выраженные различия наблюдаются в соотношении активационных антигенов CD38 и HLA-DR, уровень которых значительно выше на а-НК из НКТ печени, чем на а-НК из периферической крови (в 2 и 6,5 раз, соответственно).

**Таблица 9.** Иммунофенотип а-НК-клеток, полученных из НКТ печени и МНЛ периферической крови онкологических больных (n=10)

Дифференцировочные антигены	а-НК из НКТ печени (%)	а-НК из МНЛ периферической крови онкологических больных (%)
CD3	44,7 ± 7,1	73,3 ± 5,4
CD4	18,3 ± 3,5	44,1 ± 4,1
CD8	28,4 ± 6,2	18,6 ± 3,4
CD16	6,3 ± 2,2	10,9 ± 3,1
CD25	13,0 ± 4,3	11,3 ± 2,3
CD38	49,2 ± 6,5	25,7 ± 5,5
CD57	18,1 ± 3,1	15,1 ± 4,2
CD58	31,7 ± 5,2	25,9 ± 3,7
HLA-DR	46,2 ± 4,6	7,9 ± 4,5

В результате проведенных исследований предложены варианты генерации функционально активных а-НК из различных клеток-источников, которые могут быть использованы для адоптивной иммунотерапии онкологических больных.

Исследования японских ученых [Kimura H. et al., 2005] показали, что в состав клеток дренирующего опухоль лимфатического узла (л/у) входят CD3+Т-клетки (до 89%), ДК, нагруженные опухоль-ассоциированными антигенами, а также предшественники специфических ЦТЛ, что позволяет получать высокоэффективные киллерные клетки при инкубации их в присутствии ИЛ-2. Нами была усовершенствована методика Kimura H. за счет идентификации и элиминации из популяции МНЛ л/у цитокератин-позитивных (ЦК+) клеток, несущих эпителиальные маркеры (ЦК), обнаруженных методами иммуноцитохимии и положительной иммуномагнитной сепарации в костном мозге и л/у пациентов с немелкоклеточным раком легких (НМРЛ) и раком пищевода. Метод магнитной сепарации позволяет в достаточно короткие сроки получить обогащенную популяцию ЦК+ клеток из образцов костного мозга и л/у. Вместе с тем, нами было установлено, что большинство из данных клеток при последующем окрашивании гематоксилином-эозином расцениваются как ложно-

положительные. В итоге, методика извлечения ЦК+клеток в ходе магнитной сепарации позволяет удалить вероятные элементы опухолевой контаминации из общего пула клеток л/у, которые после этой процедуры можно использовать в качестве источника МНЛ для генерации *ex vivo* смешанной популяции активированных эффекторов иммунитета.

Обнаружение опухолевых клеток в л/у или костном мозге свидетельствует о наличии микрометастазов. В ходе сравнительного анализа результатов проведенного исследования, было показано, что для диагностики микрометастазов метод магнитной сепарации ЦК+ клеток целесообразно использовать в сочетании с последующей окраской гематоксилином-эозином и цитологическим исследованием. В этом случае могут быть получены наиболее точные данные о распространенности опухолевого процесса, которые могут быть учтены для решения вопроса об объеме лимфодиссекции, а также для более точного определения стадии заболевания.

#### ***Индукция активированных эффекторов иммунитета иммуномодуляторами различной природы***

Учитывая неимеющиеся данные способности ИЛ-2 наряду с НК супрессорную судпопуляцию лимфоцитов (Т-рег) были исследованы иммуностропные препараты, обладающие различными механизмом действия: «Нейпоген» (рекомбинантный Г-КСФ), вакцина «Иммуновак ВП-4» (включающая бактериальные антигены), синтетические препараты «Бивален» (миелопептид МП-2), «Галавит» и «Дикарбамин». Препаратом сравнения был выбран «Ронколейкин», (рекомбинантный ИЛ-2 человека).

На первом этапе были выявлены оптимальные концентрации: Г-КСФ — 100-1000 МЕ/мл, МП-2 — 0,05 – 5×10<sup>-5</sup> мкг/мл, Галавит — 1-10 мкг/мл, ВП-4 — 1-10 мкг/мл, ИЛ-2 — 1000 МЕ/мл. В результате проведенных исследований показано, что наряду с цитокином ИЛ-2 («Ронколейкин») возможно эффективное использование других иммуномодуляторов. Так, гемопозитический ростовой фактор Г-КСФ, стимулирующий созревание и фагоцитарную активность нейтрофилов, индуцировал усиление экспрессии маркеров как зрелых Т-лимфоцитов, так и НК-клеток

(рис. 4, 5), повышал цитотоксичность культуры МНЛ в отношении НК-чувствительных опухолевых клеток К562 и химиорезистентной линии рака легкого А-549 (табл. 10), при этом не вызывал увеличения субпопуляции супрессорных Т-рег клеток.

**Таблица 10.** Цитотоксическая активность смешанной популяции лимфоцитов, активированных различными иммуномодуляторами\*, в отношении клеток эритробластного лейкоза человека К562 и немелкоклеточного рака легкого А-549 (%), (n=10)

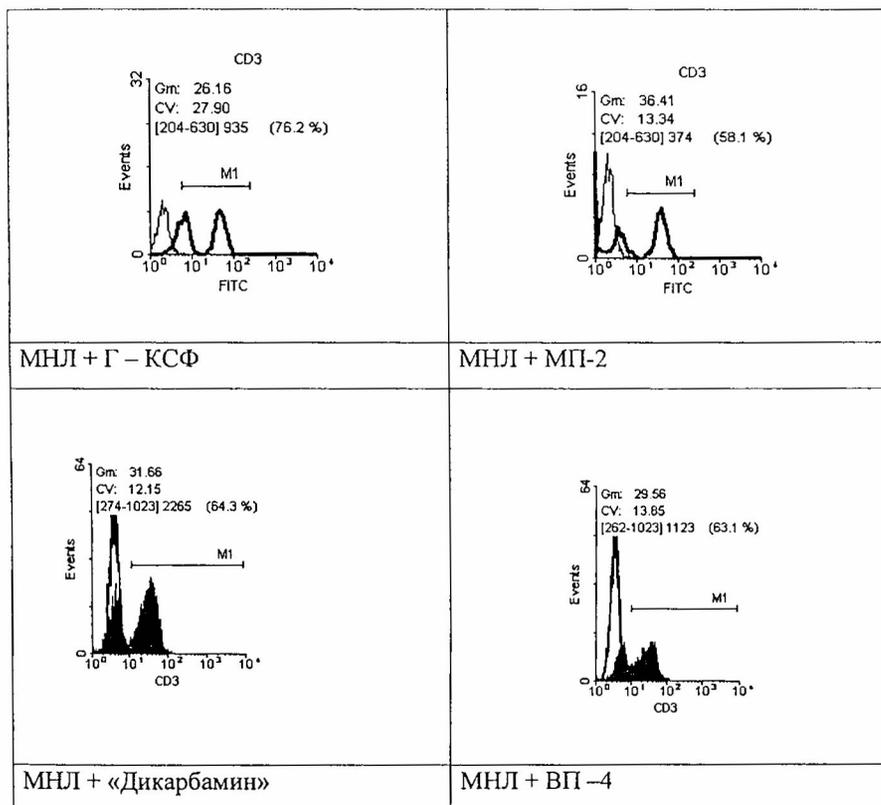
Иммуномодуляторы	К562	А-549
МНЛ (контр.)	48,0±1,7	41,1±1,5
МНЛ+ ИЛ-2	89,3±1,1	77,5±1,6
МНЛ+Дикарбамин	79,1±4,1	75,1±0,8
МНЛ+ ВП-4	77,4±1,6	78,2±1,6
МНЛ+ МП-2	73,2±2,1	73,6±1,3
МНЛ+ Галавит	78,6±0,5	67,8±1,7
МНЛ+ Г-КСФ	68,2±0,7	68,3±1,8

\*примечание: 3 сутки инкубации в присутствии оптимальной дозы активатора

Способность МП-2 («Бивален») восстанавливать функциональную активность Т-лимфоцитов является следствием его связывания со специфическими рецепторами на поверхности Т-лимфоцитов [Петров Р.В., 1999]. При инкубации МП-2 с МНЛ происходило увеличение субпопуляции зрелых Т-клеток и НК-клеток (рис. 4, 5), повышалась цитотоксичность лимфоцитов как в отношении НК-чувствительной линии К562, так и химиорезистентной линии А-549 (табл. 10), без усиления экспрессии маркеров Т-рег.

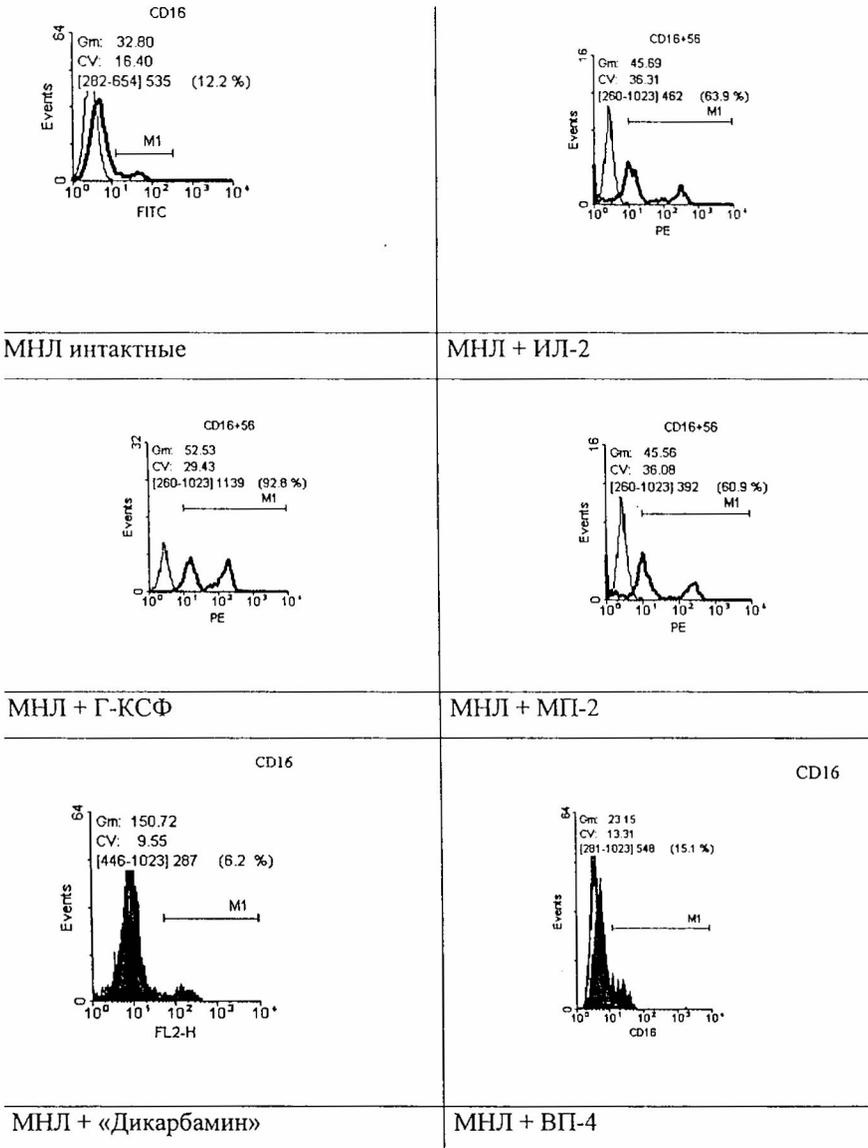
Поскольку поликомпонентная вакцина ВП-4 содержит антигены условно-патогенных микроорганизмов, то можно ожидать, что основным механизмом ее действия является стимуляция специфического звена иммунитета. Цитотоксичность МНЛ инкубированных с ВП-4 по отношению к опухолевым линиям К562 и А-549 была выше, чем интактных МНЛ (табл.10). Вакцина ВП-4 повышала экспрессию CD3, и не изменяла экспрессию маркеров НК-клеток (рис.4,5), однако усиливала экспрессию антигенов Т-рег (до 11%).

Гематопротекторный эффект «Дикарбамина» обусловлен стимуляцией дифференцировки и функционального созревания нейтрофилов. При культивировании МНЛ под влиянием «Дикарбамина» увеличивается субпопуляция зрелых Т-лимфоцитов (рис. 4) и повышается экспрессия активационного антигена CD38, однако увеличения экспрессии CD25 и маркеров НК-клеток не наблюдается. «Дикарбамин» усиливает цитотоксичность популяции лимфоцитов в отношении опухолевых клеток К562 и А-549 (табл.10).



**Рис. 4. Экспрессия поверхностных антигенов зрелых Т-лимфоцитов**

Экспрессия маркеров CD3, по оси ординат – количество клеток; по оси абсцисс– интенсивность флуоресценции; тонкая линия графика – изотипический контроль, жирная линия – клетки меченые МКА, конъюгированными с FITC (обозначение оси: FL1-H, CD3, FITC)



**Рис. 5. Экспрессия поверхностных антигенов натуральных киллеров под воздействием различных иммуномодуляторов**  
 Экспрессия маркеров CD16+/CD56+ или CD16, по оси ординат – количество клеток; абсцисс– интенсивность флуоресценции; тонкая линия графика – изотипический конъюгат, жирная линия – клетки меченые МКА, конъюгированными с FITC или PE.

Механизм действия «Галавита» связан со способностью воздействовать на функционально-метаболическую активность макрофагов, ингибируя гиперактивность макрофагов, снижая синтез ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 и других провоспалительных цитокинов. При инкубации МНЛ в присутствии «Галавита» повышается экспрессия маркеров НК и CD25 [Барышникова М.А., 2006], но не происходит увеличения субпопуляции зрелых Т-лимфоцитов или Т-рег клеток, однако цитотоксическая активность всей популяции в целом возрастает по отношению к линиям опухолевых клеток K562 и А-549 (табл. 10).

Следовательно, киллерная активность лимфоцитов может быть существенно повышена при воздействии различных стимулирующих факторов, в том числе и не цитокиновой природы. Увеличение цитотоксичности МНЛ очевидно обусловлено в первую очередь индукцией НК-клеток (экспрессия CD56+ и CD16+), кроме того возможно вовлечение и других механизмов, связанных с активацией специфического звена иммунитета, что создает предпосылку совместного применения этих иммуномодуляторов с рекомбинантным ИЛ-2, для усиления эффективности препарата, используемого в монорежиме.

*Оценка возможности использования смешанной популяции  $\alpha$ -НК в клинической практике иммунотерапии злокачественных плевритов*

Группой ученых под руководством С. Розенберга [Rosenberg S.A., 1985, 1987, 1993] в клиническую практику был внедрен метод иммунотерапии распространенных форм злокачественных заболеваний с применением ИЛ-2 в монорежиме или сочетающий системное введение ИЛ-2 и лимфокин-активированных киллеров (ЛАК). Впоследствии, более эффективные клинические результаты были достигнуты при локальном и локорегионарном использовании этого метода [Mattijssen V., 1991; Van Herpen C. M. 2000; Yasumoto K., 1987].

В нашем исследовании была проведена оценка клинической эффективности и переносимости локорегионарной иммунотерапии при внутривидеальном введении аутологичных активированных лимфоцитов в комбинации с ИЛ-2 («Ронколейкин») и ИЛ-2 в монорежиме при лечении 28 больных РМЖ с метастатическим плевритом. Состояние всех больных расценено как средней

тяжести. До начала внутриплевральной терапии все пациентки, получали комбинированное лечение, как правило хирургическое лечение в комбинации с химио-, гормоно- или радиотерапией. Из плевральной полости удалялось 1000–3500 мл серозного или серозно-геморрагического экссудата. Были сформированы 2 группы: в 1-ой группе проводили адоптивную иммунотерапию с использованием аутологичных активированных лимфоцитов и ИЛ-2 (13 больных), во 2-ой группе - монотерапию ИЛ-2 (15 больных).

Для проведения иммунотерапии плевральная полость дренировалась в среднем на 14 дней. Аутологичные активированные лимфоциты генерировали из МНЛ эвакуированного экссудата по отработанной методике [Шубина И.Ж., 2006]. В 1-й группе через установленный катетер вводили суспензию а-НК-клеток в дозе 110-150 млн. клеток и 1 млн. МЕ ИЛ-2 (1 мг) на 1-5 и 8-12 сутки и во 2-й группе в те же сроки вводили по 1 млн. МЕ (1мг) ИЛ-2.



**Рис. 6. Цитологическая картина плеврального экссудата при раке молочной железы перед началом (а) и в конце (б) курса иммунотерапии**  
 а – шарообразные структуры опухолевых клеток в экссудате при инфильтративно-протоковом РМЖ (б.Б.)

б – опухолевых клеток нет, лимфоидные клетки типа иммунобластов, зрелые лимфоциты, мезотелиальные клетки, эозинофильные лейкоциты (б.Б.)

Окр. азур-эозин по Романовскому-Гимза, ув. x 400

Во всех случаях (n =28) при первичном исследовании экссудата лимфоциты присутствовали в среднем от 1 до 10 - 20 клеток в поле зрения (рис.6,а). В конце курсов внутриплевральной ИЛ-2/а-НК и монорежимной ИЛ-2 иммунотерапии в экссудате наблюдались активированные лимфоидные элементы (рис. 6,б).

Внутриплевральная ИЛ-2/а-НК или ИЛ-2 иммунотерапия показала высокую эффективность (84,5% и 66,6%) в плане прекращения или существенного уменьшения экссудации, что подтверждалось рентгенологически и результатом цитологического исследования плеврального экссудата (рис. 7, 6).



а – перед началом лечения – в правой плевральной полости значительное количество экссудативной жидкости



б – после курса иммунотерапии – в правой плевральной полости жидкости практически нет

**Рис. 7. Рентгенограммы органов грудной клетки (б. Б.) с опухолевым плевритом при РМЖ на фоне внутриплевральной иммунотерапии**

Внутриполостная иммунотерапия ИЛ-2 и ИЛ-2/а-НК хорошо переносима, даже пациентами в тяжелом состоянии, которым невозможно проводить специфическое лечение. По данным рентгенологического анализа и КТ ИЛ-2/а-НК терапия не приводит к образованию грубых напластований на плевре, характерных для плевродеза вызванного цитостатиками или склерозирующими агентами.

Иммунотерапия с использованием ИЛ-2 и а-НК характеризуются хорошей переносимостью и вызывают побочные эффекты, выражающиеся в основном, умеренной гипертермией, которая не требует фармакологической коррекции. Выраженная гипертермия эффективно купируется нестероидными противовоспалительными препаратами. Вместе с тем гипертермию следует

расценивать не только как побочную реакцию иммунотерапии, но и как проявление специфического действия ИЛ-2 и  $\alpha$ -НК – стимуляцию системы иммунологического надзора, в том числе и его противоопухолевой составляющей.

На основании проведенных трансляционных исследований и учитывая состояние данной проблемы, на совместном совещании специалистов ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН был предложен алгоритм диагностики и лечения опухолевых плевритов.

### *Применение дендритных клеток в комбинированной противоопухолевой иммунотерапии в экспериментальных исследованиях*

В последнее десятилетие интенсивно проводятся исследования вакцин на основе ДК, участвующих в реализации адаптивного иммунитета, для лечения злокачественных заболеваний или предотвращения их рецидива [Dhodopkar, M.V., 2000; Keller, R., 2001; Барышников, А.Ю., 2004, 2008; Моисеенко, В.М., 2005].

В то же время, терапевтические подходы с использованием цитокинов и активированных НК направлены на стимуляцию неспецифического звена противоопухолевого иммунитета. Однако следует учитывать, что при этом цитотоксические Т-клетки (ЦТЛ), отвечающие за реализацию специфических механизмов, остаются не задействованными в противоопухолевой защите. В связи с этим, нами были проведены исследования по получению ДК, профессиональных антиген-презентирующих клеток, и оценке комбинированного применения ДК и смешанной популяции  $\alpha$ -НК в экспериментальных условиях.

Изучены морфологические, иммунофенотипические, функциональные свойства ДК, генерируемых *in vitro* из костномозговых предшественников мышей линии СВА, а также из моноцитов/макрофагов периферической крови доноров.

В процессе культивирования в присутствии факторов роста (ГМ-КСФ, ИЛ-4) и созревания ДК (ФНО- $\alpha$ ) изменялся иммунофенотип клеток: снижение экспрессии маркера стволовых клеток CD34 от исходных  $43,6 \pm 1,1\%$  до  $6,7 \pm 1,3\%$  на незрелых ДК и  $0,9 \pm 0,5\%$  на зрелых ДК, свидетельствует об активном процессе дифференцировки. Характерные особенности зрелых ДК – высокий уровень экспрессии ко-стимулирующих молекул CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) и CD40 (до

66,9; 61,2 и 25,2%), отвечающих за формирование вспомогательных сигналов при активации лимфоцитов, в сочетании с экспрессией молекул МНС I и II класса ( $31,0 \pm 4,5$  и  $32,3 \pm 4,2\%$ ), обеспечивает эффективное представление антигенов ДК. Существенное повышение содержания в культуральной среде такого спектра цитокинов как ИЛ-6 ( $566,2 \pm 10,3$  пкг/мл), ИЛ-12 ( $152,1 \pm 7,2$  пкг/мл), ФНО- $\alpha$  ( $733,2 \pm 12,8$  пкг/мл) и ИФН- $\gamma$  ( $159,8 \pm 6,4$  пкг/мл), но не ИЛ-4, позволяет предположить, что полученные зрелые ДК обладают необходимым потенциалом направлять иммунный ответ по Th1-типу. Так, после инкубации лимфоцитов с ДК, нагруженными опухолевым лизатом, МНЛ приобретали повышенную способность разрушать аутологичные опухолевые антигены клетки-мишени: опухоль Эрлиха ( $89,12 \pm 5,8\%$ ), мышиную фибросаркому L929 ( $81,32 \pm 5,13\%$ ), лимфому мышей YAC-1 ( $85,30 \pm 2,74\%$ ).

Иммунофенотип получаемых *in vitro* в присутствии ГМ-КСФ, ИЛ-4 и ФНО- $\alpha$  ДК человека может варьировать, однако характерным остается экспрессия молекулы CD14 (до 33%) на незрелых ДК и практически ее отсутствие на зрелых ДК (менее 6%). На незрелых ДК может наблюдаться достаточно высокая экспрессия CD86 и CD40 ( $63,4 \pm 15,1$  и  $50,4 \pm 13,1\%$ ), но не CD80 (менее 12%) и полное отсутствие экспрессии маркера терминальной дифференцировки ДК CD83. Зрелые ДК способны активно презентировать антигены, о чем свидетельствует повышенная экспрессия ко-стимулирующих молекул - CD86, CD80, CD40 ( $73,3 \pm 3,4$ ,  $55,9 \pm 6,1$ ,  $47,5 \pm 9,8\%$ ), появляется экспрессия маркера CD83 ( $52,3 \pm 5,3\%$ ), и высокий уровень молекулы адгезии CD58 (до 98%).

Созревание в различных условиях может значительно влиять на функциональные свойства ДК, включающих секрецию важнейших цитокинов (напр., ИЛ-12) и способность стимулировать активность иммунокомпетентных клеток [Luft T., 2002]. В стандартных для нашего исследования условиях инкубации зрелые ДК, также как и незрелые способны активно синтезировать хемотаксический и регуляторный пептид ИЛ-12 ( $322,5 \pm 25,8$  и  $233,7 \pm 23,3$  пкг/мл, соответственно). Наблюдается также высокая продукция много-функционального активационного фактора ФНО- $\alpha$  незрелыми и зрелыми ДК ( $314,2 \pm 22,4$  и

302,3±25,7 пкг/мл). Антигенпрезентирующую функцию ДК, оценивали по изменению цитотоксической активности (МТТ-тест) лимфоцитов при совместной инкубации с ДК по отношению к линиям человеческих опухолевых клеток лейкоза K562, меланомы Уокера MeWo, рака яичников SKOV-3, меланомы кожи melKog, melP, melIbg. Меланомные линии различались как по характеру роста, так и по цитоморфологическим, иммунофенотипическим, генетическим признакам и детально охарактеризованы [Бурова О.С., 2010]. Повышение цитотоксичности ДК-стимулированных МНЛ по сравнению с интактными проявлялось в отношении всех опухолевых линий. При соотношении эффектор/мишень 5:1 оно составило (%): против клеток линии melP -74,9±3,2, melKog - 69,9±3,8, melIbg - 61,4±4,1, K562 - 61,1±4,6.

В отношении линий меланомы человека, различающихся по экспрессии меланомных антигенов и иммунофенотипических маркеров было также проведено сравнение киллерной активности лимфоцитов смешанной популяции а-НК. Выявлен высокий уровень цитотоксичности популяции а-НК в отношении линий melP и melIbg (84,6±4,2 и 77,1±5,8%), при этом особо следует отметить воздействие а-НК на клетки линии melKog, цитотоксичность которых достигала 100%. Поскольку фенотип опухолевых клеток melKog отличается полным отсутствием экспрессии антигенов МНС I и II класса, а на клетках линий melP и melIbg экспрессированы антигены МНС I и даже II класса, можно предположить, что функциональная активность популяции а-НК реализуется по типу «свой» - «не свой», в результате чего происходит лизис клеток независимо от наличия специфического антигена или при отсутствии МНС, тогда как Т-лимфоциты действуя по принципу «свой» - «чужой» проявляют цитотоксичность в отношении клеток экспрессирующих антиген в ассоциации с МНС I.

Спонтанная цитотоксичность (против клеток K562) смешанной популяции а-НК была на достаточно высоком уровне, и ко-инкубация с ДК лишь незначительно стимулировала цитотоксический потенциал этих эффекторных клеток (93,1±3,5; 70,9±3,5; 58,7±5,7% при м/э 5:1, 2:1, 1:1).

Совместная инкубация а-НК и стабильных линий рака яичника человека SKOV-3 и меланомы Уокера MeWo, характеризующихся плотной адгезией к пластику и агрессивным характером роста, приводила лишь к незначительному нарушению хорошо сформированного монослоя. Отсутствие существенного повреждающего действия клеток смешанной популяции а-НК на линии MeWo и SKOV-3 лишь подтверждает зависимость цитотоксического эффекта от биодоступности клеток-мишеней.

Таким образом, для активации адаптивного иммунитета могут быть использованы зрелые ДК, которые экспрессируют МНС I и II класса и секретируют ИЛ-12. Активация врожденного иммунитета осуществляется, главным образом, за счет функции НК клеток, способных вызывать лизис трансформированных клеток.

Экспериментальные исследования по оценке комбинированного применения смешанной популяции а-НК, и зрелых ДК проводились на мышах C57/B16 с привитой опухолью меланомы B16. На первом этапе подбора оптимальной прививочной дозы опухолевых клеток установили, что наименьшая доза в 50 тыс. кл./мышь вызывает образование опухоли и гибель животных в 100% случаев, при этом стандартная прививочная доза составляет 500тыс.—1 млн.кл./мышь. Было обнаружено, что при стандартной дозе, не удается получить терапевтического эффекта при вакцинации ДК, нагруженными лизатом меланомы B16. Лишь при малых прививочных дозах не превышающих 50 тыс. опухолевых клеток наблюдался защитный эффект ДК-вакцины. При более высоких прививочных дозах меланомы B16 вакцина была не эффективна, хотя у всех иммунизированных животных опухолевые узлы верифицировались позднее, а гибель животных также наступала в более поздние сроки по сравнению с контрольной группой.

На следующем этапе, в серии экспериментов на мышах линии CBA с перевиваемой внутрибрюшинной опухолью рака яичников CaO-1, проводили оценку комбинированной иммунотерапии. Смешанную популяцию лимфоцитов а-НК генерировали из МНЛ селезенки мышей CBA. Аутологичную ДК-вакцину получали в результате генерации зрелых ДК, нагруженных лизатом опухоли CaO-

1. Суспензии эффекторных клеток а-НК и ДК вводили на 1,3, 5,7 и 10 день после прививки опухолевых клеток (50 тыс. кл/мышь) и измеряли размер опухолевого узла в трех проекциях (АхВхС, мм<sup>3</sup>) на 20 и 30 сутки после начала эксперимента. По результатам измерения опухоли (табл.11) можно заключить, что торможение роста опухоли (ТРО) рака яичников наблюдалось в различной степени при всех методах клеточной иммунотерапии по сравнению с контрольной группой.

**Таблица 11.** Результаты применения эффекторов противоопухолевого иммунитета на размер опухоли мышей

Группы	Кол-во животных	Размер опухолевого узла (мм <sup>3</sup> )	
		20 сут.	30 сут.
Контроль	10	3230 ± 218	8242 ± 689
а-НК	10	1887 ± 251 (42%)*	5553 ± 698 (37%)*
а-НК + ДК-вакцина	10	1597 ± 235 (51%)*	4422 ± 353 (47%)*
ДК-вакцина	10	1757 ± 207 (46%)*	4782 ± 653 (42%)*

*Примечание\**: в скобках указан процент уменьшения размеров опухолевого узла по сравнению с контролем (торможение роста опухоли ТРО)

При первом измерении (20 сут.) уменьшение размеров опухоли наблюдали при введении популяции а-НК – до 42% и при ДК-вакцинации – до 46%, однако показатель ТРО был наиболее высоким в группе комбинированной терапии а-НК и ДК – до 51%. К 30 суткам ТРО был ниже, что говорит о более слабой защите со стороны иммунной системы в ответ на прогрессирующий рост злокачественного новообразования. Однако и в этом случае торможение опухолевого процесса было сильнее при комбинированном введении а-НК и ДК. Эти данные позволяют предположить о более успешном воздействии эффекторов врожденного и адаптивного иммунитета при их совместном применении вследствие активации разных механизмов иммунного ответа, включая возможности межклеточной кооперации как дополнительного фактора, стимулирующего иммунную реакцию.

Таким образом, клеточные технологии позволяют генерировать *ex vivo* активированные эффекторы специфического и неспецифического иммунитета,

которые могут быть использованы для адоптивной иммуноотерапии и инимунопрофилактики злокачественных заболеваний.

### *Современная стратегия использования клеточных технологий в противоопухолевой иммуноотерапии*

Новая стратегия применения активированных эффекторов иммунитета, направленная на достижение наиболее эффективного противоопухолевого ответа иммунной системы, на первом этапе предполагает получение стандартизированной культуры активированных натуральных киллерных клеток. Стандартизированная смешанная культура а-НК, получаемая по разработанной двух-стадийной методике, включает несколько субпопуляций активированных эффекторов противоопухолевого иммунитета: Т-клетки (CD3+) - 35–55%, НК (CD16+/CD56+) – 30-50%, НКТ (CD3+/CD16-/CD56+) – 10-15%, Т-per CD4+/CD25+/FOXP3+) < 4%, при этом экспрессия молекулы адгезии CD58 > 70%, и характеризуется высокой пролиферативной (ИС = 21,3±6,5) и цитотоксической активностью (по отношению к линии K562 (ЭС50= 2,2).

Реализация новой стратегии основана на активации эффекторного звена как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Следовательно, сочетанное применение активированных натуральных киллеров и дендритных клеток, нагруженных соответствующим опухоль-ассоциированным антигеном (антигенами, опухолевым лизатом) позволит достичь наиболее эффективного противоопухолевого ответа.

Новая стратегия применения активированных *ex vivo* эффекторов иммунитета подразумевает создание наиболее оптимального соотношения клеток-эффекторов и опухолевых клеток-мишеней. Следовательно, методы адоптивной иммуноотерапии в первую очередь целесообразно применять для локорегионарного воздействия, а также учитывать необходимость максимальной циторедукции злокачественного новообразования. Так, при внутривенном введении цитокин-активированных лимфоцитов удастся создать в ограниченной полости эффективное соотношение эффектор/мишень и достичь полной или частичной регрессии метастатического выпота.

Таким образом, проведенные доклинические и пилотные клинические исследования позволяют создать необходимую основу для новой стратегии применения активированных эффекторов противоопухолевого иммунитета.

## **ВЫВОДЫ**

1. Разработана двух-стадийная методика экстракорпоральной генерации активированных натуральных киллерных клеток, которая позволяет получить стандартизованную культуру клеток, включающую субпопуляции Т-лимфоцитов (CD3+) 35-55%, НК-клеток (CD16+/CD56+) 30-50%, Т-регуляторных клеток (CD4+/CD25+/FOXP3+) не более 4%, НКТ-клеток (CD3+/CD16-/CD56+) 10-14% и характеризующуюся экспрессией маркера адгезии CD58 свыше 70%, высоким пролиферативным индексом  $21,3 \pm 6,5$  и цитотоксической активностью по отношению к линии K562 (не менее 85% при соотношении клетка-эффектор/клетка-мишень 5:1). Разработаны методические рекомендации по получению смешанной культуры активированных натуральных киллерных клеток.
2. Показано, что разработанная методика позволяет получить популяцию активированных эффекторных клеток со стандартной иммунофенотипической, морфологической и функциональной характеристикой из различных источников (злокачественный экссудат, селезенка после спленэктомии при радикальной операции рака желудка, паратуморальные участки печени).
3. Показано, что метод иммуномагнитной сепарации цитокератин-положительных клеток позволяет удалить элементы опухолевой контаминации из общего пула клеток, выделенных из костного мозга и лимфатических узлов при хирургической операции онкологических больных, которые можно использовать в качестве источника мононуклеарных лейкоцитов для генерации активированных эффекторов иммунитета.
4. Выявление цитокератин-положительных клеток в обогащенной клеточной популяции, полученной из костного мозга и лимфатических узлов, при по-

следующем иммуноцитохимическом окрашивании позволяет обнаружить метастазы и уточнить стадию заболевания.

5. Установлено, что под влиянием отечественных иммуномодулирующих препаратов различного механизма действия («Ронколейкин», «Дикарбамин», поликомпонентная вакцина «Иммуновак-ВП4», «Нейпоген», «Бивален», «Галавит») в культуре мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека происходит стимуляция эффекторов иммунитета, обладающих характеристикой смешанной культуры активированных натуральных киллерных клеток со специфичными для каждого индуктора свойствами.
6. В экспериментальных условиях установлено, что протективный противоопухолевый эффект при вакцинации дендритными клетками, нагруженными опухолевым лизатом, наблюдается только при наименьшей прививочной дозе меланомы В-16 (50 тыс.кл./мышь). На экспериментальных животных с переносимой опухолью САО-1 (рак яичника мышей) установлено преимущество комбинированной иммунотерапии с использованием активированных ИЛ-2 лимфоцитов и нагруженных опухолевым лизатом дендритных клеток.
7. В пилотных клинических исследованиях показано, что при лечении злокачественных плевритов с использованием активированных ИЛ-2 лимфоцитов, эффективность (полная или частичная регрессия экссудата) внутриплевральной комбинированной иммунотерапии ИЛ-2/а-ИК составила 84,5% и иммунотерапии ИЛ-2 (препарат «Ронколейкин») в монорежиме - 66,6%. Показана удовлетворительная переносимость внутриплевральной иммунотерапии.
8. Современная стратегия применения эффекторов противоопухолевого иммунитета подразумевает: 1) необходимость получения стандартизированной культуры активированных иммунокомпетентных клеток; 2) проведение соответствующих тестов контроля качества полученной культуры; 3) определение чувствительных в отношении данного метода терапии форм злокачественных новообразований с учетом возможности создания наиболее эф-

фективного соотношения клеток эффектор/мишень, которое достигается при локорегионарном воздействии или при максимальной опухолевой циторедукции; 4) активную стимуляцию как эффекторов врожденного, так и адаптивного иммунитета.

## Список работ по теме диссертации

### Список статей, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Шубина, И.Ж. Сравнительная характеристика лимфокин-активированных киллеров, генерированных из различных источников. / И.Ж. Шубина, К.С. Титов, О.В. Лебединская, Л.В. Демидов, М.В. Киселевский // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – №3. – С. 43-50.
2. Шубина, И.Ж. Адоптивная иммунотерапия злокачественных новообразований / И.Ж. Шубина, А.Г. Блюменберг, С.М. Волков, Л.В. Демидов, М.В. Киселевский // Вестник РАМН. – 2007. – №11. – С.9 – 15.
3. Шубина, И.Ж. Определение микрометастазов в костном мозге и лимфатических узлах у больных раком пищевода и немелкоклеточным раком легкого/ И.Ж. Шубина, И.С. Стилиди, А.В. Пирогов, Е.Е. Кулевич, Л.М. Родионова, М.В. Киселевский // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина. – 2007. – Т.8, №2. – С. 64-71.
4. Shubina, I.Zh. Protective effect of dendritic cells in mice infected by *Klebsiella pneumoniae* / I.Zh. Shubina, N.K. Akhmatova, M.V. Kiselevsky, E.A. Kurbatova // Central European Journal of Immunology. – 2007. – V.32, N4. – P. 189 – 195.
5. Шубина И.Ж. Активированные натуральные киллеры в клеточной иммунотерапии / Шубина И.Ж., Чикилева И.О., Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Огородникова Е.В., Тазаев В.Н., Киселевский М.В. // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Т 6(15), № 1. – С. 71–79.
6. Халтурина, Е.О. Морфологические особенности и иммунофенотип дендритных клеток, полученных из моноцитов периферической крови человека / Е.О. Халтурина, О.В. Лебединская, И.Ж. Шубина, Ф.В. Доненко., Н.Т. Райхлин, Киселевский М.В. // Морфология. — 2004. — № 3. — С. 89-92.
7. Лебединская, О.В. Морфологические и функциональные особенности лимфокин-активированных киллеров, полученных из мононуклеарных клеток периферической крови человека / О.В. Лебединская, Е.О. Халтурина, Н.К. Ахматова, И.Ж. Шубина, О.Г. Леонова, В.И. Попенко, С.В. Мелехин, М.В. Киселевский // Морфология. — 2005. — № 1. — С. 28–32.
8. Лебединская, О.В. Функциональная активность и морфологическая характеристика лимфокин-активированных киллеров / О.В. Лебединская, Н.К. Ахматова, И.Ж. Шубина, М.В. Киселевский // Пермский медицинский журнал. — 2005. — № 1. — С. 6–12.
9. Демидов, Л.В. Проблемы клинического применения ИЛ-2/ЛАК терапии / Л.В. Демидов, И.Н. Михайлова, И.Е. Синельников, И.Ж. Шубина, Е.А. Че-

- ремущин, Э.Р. Виршке., Н.Н. Петенко, Е.В. Огородникова, Л.Ю. Арустамян, М.В. Киселевский // Российский биотерапевтический журнал – 2005 – №4. – С. 29- 37.
10. Лебединская, О.В. Морфофункциональные особенности натуральных киллеров Т-клеток (НКТ) у больных с опухолевыми поражениями печени / О.В. Лебединская, Ю.И. Патютко, Д.А. Забежинский, Н.К. Ахматова, **И.Ж. Шубина**, М.Ю. Вершинина, М.В. Киселевский // Сибирский онкологический журнал. – 2005. – №3. – С. 24-31.
  11. Черешнев, В.А. Влияние препарата «Профеталь» на функциональную активность мононуклеарных лейкоцитов и дендритных клеток человека/ В.А. Черешнев, О.В. Лебединская, С.Ю. Родионов, Н.К. Ахматова, **И.Ж. Шубина**, Е.А. Лебединская, Т.В. Гаврилова, М.В. Киселевский // Медицинская иммунология — 2005. – Т.7, №5-6. – С. 525-534.
  12. Лебединская, О.В. Сравнительный анализ возможности экстракорпоральной генерации активированных лимфоцитов периферической крови человека с применением препарата «Профеталь» и интерлейкина-2 / О.В. Лебединская, В.А. Черешнев, Т.В. Гаврилова, Е.А. Лебединская, С.Ю. Родионов, **И.Ж. Шубина**, Н.К. Ахматова, М.В. Киселевский // Вестник Уральской медицинской академической науки — 2005. — №4. — С. 52-58.
  13. Черешнев, В.А. Иммуномодулирующее действие препарата «Профеталь» на мононуклеарные лейкоциты периферической крови человека и генерированные из них дендритные клетки / В.А. Черешнев, О.В. Лебединская, С.Ю. Родионов, Н.К. Ахматова, **И.Ж. Шубина**, Е.А. Лебединская, Т.В. Гаврилова, М.В. Киселевский // Иммунология — 2006. — Т. 27, №3. — С. 132-141.
  14. Ахматова, Н.К. Цитотоксическая активность натуральных киллеров Т-(НКТ)-клеток у мышей с опухолевым поражением печени / Н.К. Ахматова, Е.Н. Кузовлев, О.В. Лебединская, Ф.В. Доненко, **И.Ж. Шубина**, А.И. Макашин, М.В. Киселевский // Бюлл. Эксп. Биол. и мед. – 2006. – Т.141, №1. – С. 76-79.
  15. Барышникова, М.А. Влияние сублингвальной формы Галавита на иммунофенотип и функциональную активность иммунокомпетентных клеток мышей / М.А. Барышникова, Ф.В. Доненко, **И.Ж. Шубина**, М.В. Киселевский // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – №4. – С. 43-46.
  16. Ахматова, Н.К. Фагоцитарная активность дендритных клеток, генерированных из клеток костного мозга мышей / Н.К. Ахматова, И.Б. Семёнова, Е.А. Курбатова, О.В. Лебединская, Н.Б. Егорова, **И.Ж. Шубина**, М.В. Киселевский, Б.Ф. Семёнов // Вестник Уральской медицинской академической науки. — 2006. — №1. — С. 14-18.
  17. Лебединская, О.В. Влияние препарата «Профеталь» на дифференцировку и функциональную активность мононуклеарных лейкоцитов человека/ О.В. Лебединская, Н.П. Велижева, Ф.В. Доненко, В.А. Черешнев, С.Ю. Родионов, Н.К. Ахматова, **И.Ж. Шубина**, Е.А. Лебединская, М.В. Киселевский // Клеточные технологии в биологии и медицине . — 2006. — №2. — С.108-117.
  18. Стилиди, И.С. Выявление микрометастазов в костном мозге и лимфатических узлах онкологических больных с использованием метода иммуномаг-

- нитной сепарации/ И.С. Стлиди, О.В. Лебединская, **И.Ж. Шубина**, А.В. Пирогов, Б.Е. Полоцкий, Ф.В. Доненко, М.В. Киселевский // Сибирский онкологический журнал. — 2007. — Т. 21, №1. — С. 44-48.
19. Жукова, О.С. Избирательная противоопухолевая активность лимфокин-активированных киллеров *in vitro* / О.С. Жукова, О.В. Лебединская, **И.Ж. Шубина**, Г.К. Герасимова, А.М. Карамзин, М.В. Киселевский // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2007. — № 1. — С. 21–31.
  20. Жукова, О.С. Комбинированное действие цисплатина и лимфокин- активированных киллеров на клетки немелкоклеточного рака легкого линии А549/ О.С. Жукова, Г.К. Герасимова, **И.Ж. Шубина**, М.В. Киселевский // Бюл. экп. биол. мед. — 2007. — №8. — С. 198-201.
  21. Лебединская, О.В. Сравнительная характеристика методов иммуоцитохимии и иммуомагнитной сепарации на примере выявления цитокератин-позитивных клосток / О.В. Лебединская, **И.Ж. Шубина**, Ф.В. Доненко, А.В. Пирогов, М.В. Киселевский // Морфология. — 2007. — № 4 — С. 14-21.
  22. Велижева, Н.П. Противоопухолевая цитотоксическая активность лимфокин-активированных киллеров / Н.П. Велижева, О.В. Лебединская, О.С. Жукова, **И.Ж. Шубина**, Е.А. Лебединская, М.В. Киселевский // Сибирский онкологический журнал. — 2008. — № 1. — С. 39-44.
  23. Чикилева, И.О. Содержание CD4+CD25+FOXP3+ Т-регуляторных лимфоцитов в популяции лимфокин-активированных киллеров / И.О. Чикилева, Н. П. Велижева, **И. Ж. Шубина**, К. С. Титов, М. В. Киселевский // Вестник РОНЦ им.Н.Н.Блохина. — 2008. — № 3 — С. 16-25.
  24. Титов, К.С. Биотерапия опухолевых перикардитов / К.С. Титов, **И.Ж. Шубина**, С.М. Волков, Л.М. Родионова, М.В. Киселевский // Российский биотерапевтический журнал. — 2009. — №4. — С. 9-12.
  25. Грицай, А.Н. Использование рекомбинантного интерлейкина-2 при внутриплевральном лечении опухолевых плевритов /А.Н. Грицай, М.В. Киселевский, И.Н. Михайлова, Л.В. Демидов, Л.М. Родионова, К.С. Титов, **И.Ж. Шубина**, И.Е. Синельников, К.Ю. Тополь // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.— 2009. — № 11. — С.547-549.
  26. Титов, К.С. Внутриплевральная иммунотерапия метастатических плевритов у больных раком молочной железы / К.С. Титов, Л.В. Демидов, М.В. Киселевский, И.Н. Михайлова, **И.Ж. Шубина**, А.Н. Грицай, И.Е. Синельников, Л.М. Родионова // Опухоли женской репродуктивной системы. — 2009. — №3-4 — С. 29 — 33.
  27. Chikileva, Irina O. Is it necessary to deplete the lymphokine activated killers' populations of CD4+CD25+ lymphocytes? Regulatory Foxp3-positive T cells within lymphokine activated killers / Irina O. Chikileva , **Irina Zh. Shubina**, Gianfranco Baronzio, Mikhail V. Kiselevsky // Biomedicine & Pharmacotherapy. — 2010. — №64. — С.379 – 385
  28. Титов, К.С. Внутриплевральная иммунотерапия интерлейкином –2 больных с метастатическим плевритом / К.С. Титов, Л.В. Демидов, М.В. Киселевский, **И.Ж. Шубина**, И.Н. Михайлова, Л.М. Родионова, К.Ю. Тополь, И.Е.

Синельников, А.Н. Грицай // Российский онкологический журнал. – 2010. – №4. – С. 20-24.

29. Михайлова, И.Н. Иммунорегуляторные CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клетки у больных диссеминированной меланомой на фоне химиотерапии / И.Н. Михайлова, Н.Н. Петенко, **И.Ж. Шубина**, И.В. Самойленко, С. Субраманиан, Е.В. Огородникова, А.В. Караулов, М.В. Киселевский, А.Ю. Барышников, Л.В. Демидов // Иммунология. – 2010. – Т.31, №3 – С. 143-146.
30. Титов, К.С. Внутривнутрикардиальная иммунотерапия опухолевых перикардитов. / К.С. Титов, С.М. Волков, **И.Ж. Шубина**, М.В. Киселевский, В.Ю. Сельчук, А.Н. Грицай, А.Н. Антонов // Вестник службы крови России. – 2011. – №1. – С. 34 - 37.
31. Лебединская, О.В. Морфо-функциональная и иммуногистохимическая характеристика клеток лейкоцитарных инфильтратов печени онкологических больных / Лебединская О.В., Кабановская И.Н., Якушева Т.А., Годовалов А.П., Ахматова Н.К., **Шубина И.Ж.**, Лебединская Е.А., Киселевский М.В., Хохрякова В.Н. // Морфологические ведомости. – 2011. – №1. – С.26-35.
32. Титов, К.С. Возможности внутривнутрикардиальной иммунотерапии с использованием интерлейкина-2 и аллогенных ЛАК-клеток при метастатических экссудативных перикардитах у больных раком молочной железы и яичников / Титов К.С., Волков С.М., **Шубина И.Ж.**, Анисимова Н.Ю., Сельчук В.Ю., Киселевский М.В. // Сибирский медицинский журнал – 2011. – Т. 104, № 5. – С.47-52.
33. Чикилева, И.О. Влияние регуляторных Т-клеток на функциональную активность натуральных киллеров при иммунотерапии злокачественных опухолей / Чикилева И.О., **Шубина И.Ж.**, Киселевский М.В. // Вестник РАМН. – 2012. – №4. – С. 60 –64.

*Список статей, опубликованных в монографиях*

34. **Shubina, Irina Zh.** Natural Killer Cells. Lymphokine-Activated Killers/ **Irina Zh. Shubina**, Olga V. Lebedinskaya, Evgenia O. Khalturina, Irina O. Chikileva, Mikhail V.Kiselevsky // Atlas Effectors of Anti-Tumor Immunity. — Springer — 2008. — P.45-65.
35. Lebedinskaya, Olga V. Natural Killer T (NKT) Cells: Immunophenotype, Functional Characteristics and Significance in Clinical Practice/ Olga V. Lebedinskaya, Nelly K. Akchmatova, Irina O. Chikileva, **Irina Zh Shubina**, Mikhail V.Kiselevsky // Atlas Effectors of Anti-Tumor Immunity. — Springer — 2008. — P.81-101.
36. **Shubina, Irina Zh.** LAK Immunotherapy in Clinical Studies / **Irina Zh. Shubina**, Lev V. Demidov, Irina O. Chikileva, Olga V. Lebedinskaya, Mikhail V.Kiselevsky // Atlas Effectors of Anti-Tumor Immunity. — Springer — 2008. — P.101-111.
37. **Shubina, Irina Zh.** CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> T-regulatory cells / **Irina Zh. Shubina**, Nadezhda P. Velizheva and Mikhail V.Kiselevsky // Atlas Effectors of Anti-Tumor Immunity. — Springer — 2008. — P.65-72.

38. **Shubina, I. Zh.** Intraoperative Immunomagnetic Separation of CK+ Cells to Identify Occult Micrometastases of NSCLC and Esophageal Cancer / **Shubina I. Zh.**, Stilidi I. S., Polotsky B. E., Kulevich E. E., Kiselevsky M. V. // in book: Cancer Clusters. Editor: Bradley D. Germano - Nova Science Publishers, New York – 2011. - P. 93-112.
39. Chikileva, Irina O. Role of regulatory T cells (Tregs) in Cancer Progression and Interference with Immunotherapy of Cancer / Irina O. Chikileva, **Irina Zh. Shubina**, Nadezhda P. Velizheva, Konstantin S. Titov, Vyacheslav M. Abramov, Valentin S. Khlebnikov, Mikhail V. Kiselevsky // in book: Cancer Clusters. Editor: Bradley D. Germano - Nova Science Publishers, New York – 2011. – P.1-36.
40. Титов, К.С. Иммунотерапия опухолевых серозитов / К.С.Титов, **И.Ж. Шубина**, С.М. Волков, Л.В. Демидов, И.Н. Михайлова, М.В. Киселевский // в кн. Опухолевые серозиты: плевриты, асциты, перикардиты. М: Практическая медицина.- 2011. - С. 233-258.
41. **Shubina, Irina** Immunological Pathogenesis of Septic Reactions and Elimination of Triggers and Mediators of Inflammation / **Irina Shubina**, Natalia Anisimova, Elena Gromova, Irina Chikileva and Mikhail Kiselevsky. // in book: Infectious Diseases in Global Scenario. Editor Priti Kumar Roy, InTech Open Access Publisher. - 2012 - P. 157-178.
42. **Shubina, Irina** Adoptive immunotherapy of malignant effusions / I.Zh.Shubina, K.S.Titov, I.O.Chikileva, L.V.Demidov, M.V. Kiselevsky// Malignant Effusions: Pleuritis, Ascites, Pericardites. – Springer – 2012. - P.99-123.
43. Lebedinskaya, O. Morphological and functional characteristics of serous cavities / O. Lebedinskaya, **I. Shubina**, N.Anisimova, A. Kopylov, M.Kiselevsky// Malignant Effusions: Pleuritis, Ascites, Pericardites. – Springer – 2012. - P.1-10.
44. Chikileva, I.O. Pathogenesis of malignant effusions / I.O. Chikileva, **I. Zh. Shubina**, N.Yu. Anisimova, M.V. Kiselevsky //Malignant Effusions: Pleuritis, Ascites, Pericardites. – Springer – 2012. - P.11-23.
- Список тезисов, опубликованных в материалах конгрессов и конференций*
45. Киселевский, М.В. Исследование возможности биотерапии с помощью лимфокин-активированных киллеров (ЛАК) у больных раком молочной железы со злокачественным плевральным выпотом / М.В. Киселевский, **И.Ж. Шубина**, О.В. Лебединская, С.В. Мелехин, Е.Р. Руди // Фундаментальные исследования. — № 6. — 2004. — С. 49.
46. Лебединская, О.В. Сравнительная характеристика иммунофенотипа и функциональных свойств мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека, активированных интерлейкином-2 и препаратом «Грофеталь» / О.В. Лебединская, В.А. Черешнев, С.Ю. Родионов, Н.К. Ахматова, **И.Ж. Шубина**, М.В. Киселевский // Материалы научно-практической конференции «Иммунология вчера, сегодня и завтра» 15 сентября 2005 г. Пермь. — 2005. — С. 3-14.
47. Киселевский, М. В. Функциональная и иммунофенотипическая характеристика лимфокин- активированных киллеров, полученных из мононуклеарных лейкоцитов больных с опухолевым поражением печени /

- М. В. Киселевский, **И.Ж.Шубина**, М. Ю. Вершинина, Е. О. Халтурина, Ю. И. Патютко, Д. А. Забежинский // Российский биотерапевтический журнал. – 2005 - №1. - С.10-11.
48. Kiselevsky, M. Different Sources for Generating Dendritic Cells / M.Kiselevsky, N.Akhmatova, **I.Shubina** //16<sup>th</sup> International Congress on Anti-Cancer Treatment, February, 1<sup>st</sup>–4<sup>th</sup>, Paris, France, Abstract Book – 2005 - P.333.
49. Akhmatova, N. Immunophenotype and Functional Activity of Dendritic Cells Generated from Mouse Fetal Liver / N.Akhmatova, M.Kiselevsky, **I.Shubina**, B.Semenov //16<sup>th</sup> International Congress on Anti-Cancer Treatment, February, 1<sup>st</sup>–4<sup>th</sup> Paris, France, Abstract Book – 2005. - P.323.
50. **Shubina, I.** Immunotherapy of Gastric Cancer Patients with Lymphokine-Activated Killer Cells Generated from Spleen Lymphocytes/ **I.Shubina**, K.Titov, O.V.Lebedinskaya, M.Kiselevsky //16<sup>th</sup> International Congress on Anti-Cancer Treatment, February, 1<sup>st</sup>–4<sup>th</sup>, Paris, France, Abstract Book – 2005. - P.248.
51. Kiselevsky, M. Lymphokine-Activated Killers' Immunotherapy of Malignant Pleural Effusion. / M. Kiselevsky, **I. Shubina**, S. Volkov //11th World Conference on Lung Cancer, Barcelona, Spain, 3-6 July, Citation Lung Cancer - 2005. - V.49, Suppl.2. - P. S253.
52. **Шубина, И.Ж.** Возможные источники получения дендритных клеток для создания противоопухолевых вакцин. / **И.Ж. Шубина**, О.В. Лебединская, Н.К. Ахматова, М.В. Киселевский // Дни иммунологии в С-Петербурге, IX Всероссийский научный Форум с международным участием им. акад. В.И.Июффе, 23-26 мая, Медицинская иммунология. – 2005. - Т.7, №2-3 - С.215.
53. **Шубина, И.Ж.** Иммунотерапия злокачественных выпотов с использованием аллогенных лимфокин-активированных киллеров (ЛАК) / **И.Ж. Шубина**, М.В. Киселевский, К.С. Титов, С.М. Волков, А.Г. Кедрова // Сборник тезисов «Биотехнология и онкология», 29-31 мая, С-Петербург. - 2005. - С.145.
54. Киселевский, М.В. Влияние цитокинов на дифференцировку бластных клеток костного мозга больных острым миелоидным лейкозом / М.В. Киселевский, О.В. Лебединская, **И.Ж. Шубина**, Н.К. Ахматова, Г.Г. Фрейнд., С.В. Мелехин, Е.В. Фадеева //Современные наукоемкие технологии. – 2005. - №2 - С.37.
55. Кузовлев, Е.Н. Особенности иммунофенотипа лимфоцитов, выделенных из поражённой опухолью печени мышей / Е.Н. Кузовлев, О.В. Лебединская, Н.К. Ахматова, Ф.В. Доненко, **И.Ж. Шубина**, А.И. Макашин, М.В. Киселевский, Б.Ф. Семёнов // Современные наукоемкие технологии. — 2005. — № 3. — С. 44.
56. Кузовлев, Е.Н. Цитотоксическая активность лимфоцитов, выделенных из поражённой опухолевым процессом печени мышей / Е.Н. Кузовлев, О.В. Лебединская, Н.К. Ахматова, Ф.В. Доненко, **И.Ж. Шубина**, А.И. Макашин, М.В. Киселевский, Б.Ф. Семенов // Медицинские иммунобиологические препараты в XXI веке: разработка, производство и применение. Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием, посвя-

- щной 100-летию со дня основания филиала "Иммунопрепарат" МЗ и СР РФ 6-8 июня 2005 г., г.Уфа: в 2-х ч., ч. 1, (разд. 1-3). –2005. – 300 с.
57. Кузовлев, Е.Н. Цитотоксическая активность натуральных киллеров (НК) у мышей с опухолевым поражением печени / Е.Н. Кузовлев, О.В. Лебединская, Н.К. Ахматова, Ф.В. Доненко, **И.Ж. Шубина**, А.И. Макашин, М.В. Киселевский, Б.Ф. Семёнов // *Успехи современного естествознания*. — 2005. — №4. — С.32-33.
58. Лебединская, О.В. Влияние цитокинов на дифференцировку клеток перитонеального экссудата онкологических больных/ О.В. Лебединская, **И.Ж. Шубина**, С.В. Мелехин, Н.К. Ахматова, М.В. Киселевский // *Современные наукоёмкие технологии* — 2005. — №10. — С.45.
59. Макашин, А.И. Генерация дендритных клеток из клеток-предшественников костномозгового происхождения / А.И. Макашин, Е.Н. Кузовлев, Н.К. Ахматова, О.В. Лебединская, Ф.В. Доненко, **И.Ж. Шубина**, М.В. Киселевский // *Успехи современного естествознания*. — №4. — 2005. — С. 58.
60. Макашин, А.И. Роль дендритных клеток в стимуляции противoinфекционного иммунного ответа на модели *Klebsiella pneumoniae* / А.И. Макашин, Е.Н. Кузовлев, Н.К. Ахматова, О.В. Лебединская, Ф.В. Доненко, **И.Ж. Шубина**, М.В. Киселевский // *Успехи современного естествознания*. —2005. — №4.— С. 58-59.
61. Лебединская, О.В. Морфология мононуклеарных лейкоцитов в культурах крови здоровых доноров и костного мозга больных острым миелоидным лейкозом / О.В. Лебединская, С.В. Мелехин, **И.Ж. Шубина**, М.В. Киселевский, Е.В. Фадеева // *Современные наукоёмкие технологии*. —№ 7. —2005. — С. 49.
62. **Шубина, И.Ж.** Генерация дендритных клеток из культуры мононуклеарных лейкоцитов, активированных ИЛ-2 / **И.Ж. Шубина**, М.В. Киселевский // *Материалы Международного Конгресса «Иммунитет и болезни: от теории к терапии»*, АДАИР – 2005. - Т.6, N1. - С. 232, 95.
63. Subramanian, S. Peculiarities in smoking patterns among cancer patients in the Russian Federation / S.Subramanian, R.Shnoll, M.Davydov, L.Demidov, P.Engstrom, S.Michaelson, **I.Shubina**, B.Polyakov, E.Kovalevskiy, S.Malayev // 19<sup>th</sup> UICC Congress, Washington, USA – 2006. – P.62.
64. **Shubina, I.** Combined adoptive LAK/DC immunotherapy of metastases in patients with melanoma / **I.Shubina**, K.Titov, E.Cheremushkin, M.Kiselevsky // 17<sup>th</sup> International Congress on Anti-Cancer Treatment, January 30<sup>th</sup> - February, 2<sup>nd</sup>, 2006, Paris, France, Abstract Book. – 2006. - P.305.
65. **Шубина, И.Ж.** Апоптоз в популяциях дендритных клеток, генерированных из лимфокин-активированных киллеров / **И.Ж. Шубина**, М.В. Киселевский // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2006. - №1. - С.7-8.
66. Титов, К.С. Внутриполостная иммунотерапия опухолевых серозитов с использованием аллогенных лимфокин-активированных киллеров / К.С. Титов, М.В. Киселевский, Л.В. Демидов, **И.Ж. Шубина**, Е.А. Черемушкин // *Медицинская иммунология* – 2006. - Т.8, №2-3. - С.352-353.

67. Титов, К.С. Клиническая эффективность ИЛ-2/ЛАК иммунотерапии у больных раком желудка после радикальных операций со спленэктомией / К.С. Титов, М.В. Киселевский, Л.В. Демидов, **И.Ж. Шубина**, Е.А. Черемушкин // Медицинская иммунология. – 2006. - Т.8, №2-3. - С.353-354.
68. **Шубина, И.Ж.** Опыт клинического применения активированных дикарбаминном лимфоцитов у больных с опухолевыми плевритами / **И.Ж. Шубина**, К.С. Титов, И.Н. Михайлова, Е.В. Огородникова, Л.Ю. Вешнякова, В.Е. Небольсин, Л.В. Демидов, М.В. Киселевский // Медицинская иммунология. – 2006. - Т.8, №2-3. - С..358.
69. Mikhaylova, I.N. Locoregional LAK therapy of cancer/ IN Mikhaylova, KS Titov. IE Sinelnikov, NN Petenko, EA Cheremushkin, IZ Shubina, EV Ogorodnikova, LY Vishnyakova, MV Kiselevsky, LV Demidov // Abstracts selected for poster presentation. 8<sup>th</sup> International Symposium Biological Therapy of Cancer from Disease to Targeted Therapy. Germany, Dresden, June 21-24 - 2006.
70. **Шубина, И.Ж.** Интраоперационная диагностика микрометастазов в костном мозге и лимфатических узлах онкологических больных с использованием метода иммуномагнитной сепарации./ **И.Ж. Шубина**, И.С.Стилиди, А.В.Пирогов, Н.В.Малахова, Ф.В.Доненко, М.В Киселевский. // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. - №1. - С.71.
71. **Шубина, И.Ж.** Экссудативные опухолевые плевриты / **И.Ж. Шубина**, К.С. Титов, М.В. Киселевский //Опухолевые заболевания органов грудной полости у мелких домашних животных, Москва - 2007 - С.21-31.
72. Сергеев, А.В.Создание и внедрение в практику здравоохранения нового поколения средств химиопрофилактики рака/ А.В.Сергеев, М.Я.Шашкина, **И.Ж.Шубина** //Материалы симпозиума: Результаты фундаментальных и прикладных исследований для создания новых лекарственных средств, Москва. – 2008. - С.184.
73. **Шубина, И.Ж.**Т-регуляторные лимфоциты в популяции лимфокин-активированных киллеров / **И.Ж.Шубина**, И.О.Чикшлева, Н.П.Велижева, М.В.Киселевский. // XII Российский онкологический конгресс, Москва. - 2008. - С. 217.
74. **Shubina, I.** Intrapleural IL-2 immunotherapy of patients with malignant effusion / **I. Shubina**, K. Titov, L.V. Demidov, I.N. Mikhailova, M. Kiselevsky // Conference ECCO 15/ESMO 34, Berlin, 20-24 September - 2009.
75. **Шубина, И.Ж.** Принципы противоопухолевого иммунитета / **И.Ж.Шубина** // Материалы конференции по вопросам онкологии и анестезиологии мелких домашних животных. Москва, 30-31 января - 2010.
76. **Шубина, И.Ж.** Локорегионарная иммунотерапия рекомбинантным ИЛ-2 опухолевых серозитов/ **Шубина И.Ж.**, Титов К.С., Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Киселевский М.В // Российский биотерапевтический журнал – 2010. - №2. - С.48.
77. Шашкина, М.Я. Фармацевтические и медико-биологические аспекты создания препаратов «Чаговит» и «Чаголюкс»./ М.Я.Шашкина, Г.И.Кабакца, В.В.Решетникова, **И.Ж.Шубина**, С.А.Зорина, С.А.Хрусталева, А.Е.Хубулова, А.В.Сергеев // Российский биотерапевтический журнал – 2010. - №2. - С.84.

78. **Шубина, И.Ж.** Экзосомы, секретируемые опухолевыми клетками и их роль в реализации противоопухолевого иммунитета/ **И.Ж.Шубина**, И.О.Чикилева, Н.К. Ахматова, М.В. Киселевский // Российский биотерапевтический журнал – 2010. - №3. - С.28.
79. **Шубина, И.Ж.** Механизмы противоопухолевого иммунитета как основа действия лечебно-профилактических препаратов в онкологии / **И.Ж.Шубина**, В.В.Решетникова, Ю.Н.Соколов// Российский биотерапевтический журнал. – 2011. - №1. - С.69-70.
80. **Shubina, I.** Locoregional immunotherapy of patients with malignant effusion/ **I. Shubina**, K. Titov, L.V. Demidov, I.N. Mikhailova, M. Kiselevsky // Abstract book, 22nd ICACT International Congress of Anti-Cancer Treatment -2011. - IC/1347.
81. **Mikhailova, Irina.** Clinical Immunological Parameters of Patients with Skin Melanoma during Anti-Tumor Vaccine Therapy / **Irina Mikhailova**, Kermen Parsunkova, Georgiy Chkadua, Irina Manina, **Irina Shubina**, Natalya Petenko, Irina Evsegneeva, Lev Demidov, Anatoly Baryshnikov, Alexander Karaulov. // Final Program and abstracts. World Immune Regulation Meeting – VI, Davos, Switzerland, - 2012 - S47. - P.79.
82. **Сафронова, В.М.** Экспериментальное обоснование применения адьювантной адоптивной иммунотерапии у больных раком молочной железы./ **В.М.Сафронова**, **И.Ж.Шубина**, Е.М.Погодина, И.К.Воротников, К.С.Титов, Е.А.Черемушкин, Д.А.Рябчиков, М.В.Киселевский // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. - №2. - С.47.
83. **Сергеев, А.В.** Лечебно-профилактическое противоопухолевое средство на основе отечественного растительного сырья / **А.В.Сергеев**, Н.К.Власенкова, **В.В.Решетникова**, М.Я.Шашкина, **И.Ж.Шубина** // Российский биотерапевтический журнал – 2012. - №2. - С.48.
84. **Просалкова, И.Р.** Фармацевтические и медико-биологические аспекты создания препарата на основе природного каротин-токоферольного комплекса / **И.Р.Просалкова**, Н.К.Власенкова, А.Б.Капитанов, **В.В.Решетникова**, М.Я.Шашкина, **И.Ж.Шубина**, **А.В.Сергеев** // Российский биотерапевтический журнал – 2012. - №2. - С.43.



Подписано в печать 02.10.12      Формат 60×84/16.

Бумага офисная «SvetoСору». Тираж 100 экз. Заказ № 945

---

Отпечатано на участке множительной техники

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН

115478, г. Москва, Каширское ш., 24

12-24158



2012248923