

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Ковалева О. В.<sup>1</sup>, Белова Т.П.<sup>1</sup>, Кушлинский Д.Н.<sup>2</sup>, Короткова Е.А.<sup>1</sup>, Подлесная П.А.<sup>1</sup>, Грачев А.Н.<sup>1</sup>, Зиновьев С.В.<sup>3</sup>, Терешкина И.В.<sup>1</sup>, Соколов Н.Ю.<sup>1</sup>, Кудлай Д.А.<sup>4</sup>, Кушлинский Н.Е.<sup>1</sup>

### РАСТВОРИМЫЕ ФОРМЫ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ИММУНИТЕТА ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115478, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – Филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 249031, Обнинск, Россия;

<sup>3</sup>ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер», 603126, Нижний Новгород, Россия;

<sup>4</sup>Институт фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский университет), 119991, Москва, Россия

*Представлены данные комплексного иммуноферментного сравнительного исследования содержания растворимых форм sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G в плазме крови 75 больных эпителиальным раком яичников и 20 здоровых доноров контрольной группы. Определена диагностическая значимость исследованных белков. Исследование показало, что профиль растворимых контрольных точек иммунитета отличается при возникновении злокачественной патологии яичников. Выявлено статистически значимое снижение содержания sPD-L1, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G в плазме крови пациенток, по сравнению с контрольной группой. Обнаружены различия в содержании исследованных белков в зависимости от гистологического типа опухолей. Показаны корреляции между растворимыми формами некоторых исследованных маркеров, указывающие на наличие независимых механизмов иммунной регуляции при раке яичников, что может объяснять недостаточную эффективность существующей иммунотерапии данного типа опухолей. Полученные результаты, несомненно, помогут разработать новые эффективные методы диагностики и терапии рака яичников.*

**Ключевые слова:** рак яичников; контрольные точки иммунитета; sPD-1; sPD-L1; sNKG2D; sNKG2DL1; sB7-H3; sHLA-G.

**Для цитирования:** Ковалева О.В., Белова Т.П., Кушлинский Д.Н., Короткова Е.А., Подлесная П.А., Грачев А.Н., Зиновьев С.В., Терешкина И.В., Соколов Н.Ю., Кудлай Д.А., Кушлинский Н.Е. Растворимые формы контрольных точек иммунитета при раке яичников. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (2): 80-86. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-80-86>

*Kovaleva O.V.<sup>1</sup>, Belova T.P.<sup>2</sup>, Kushlinsky D.N.<sup>3</sup>, Korotkova E.A.<sup>1</sup>, Podlesnaya P.A.<sup>1</sup>, Gratchev A.N.<sup>1</sup>, Zinoviev S.V.<sup>4</sup>, Tereshkina I.V.<sup>1</sup>, Sokolov N.Yu.<sup>1</sup>, Kudlay D.A.<sup>2</sup>, Kushlinskii N.E.<sup>1</sup>*

#### SOLUBLE FORMS OF IMMUNE CHECKPOINTS IN OVARIAN CANCER

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>A.F. Tsyb Medical Radiological Scientific Center – Branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2490031, Obninsk, Russia;

<sup>3</sup>Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncological Healthcare Center, 603126, Nizhny Novgorod, Russia;

<sup>4</sup>Institute of Pharmacy, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia

*The data of a complex immunoassay comparative study of the content of soluble forms of sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 and sHLA-G in the blood plasma of 75 patients with epithelial ovarian cancer and 20 healthy donors of the control group are presented. The diagnostic significance of the studied proteins was determined. The study showed that the profile of soluble immunity checkpoints differs when malignant ovarian pathology occurs. There was a statistically significant decrease in the content of sPD-L1, sNKG2DL1, sB7-H3, and sHLA-G in the blood plasma of patients compared with the control group. Differences were found in the content of the studied markers depending on the histological type of tumors. Correlations between the soluble forms of some of the studied proteins are shown, indicating the presence of independent mechanisms of immune regulation in ovarian cancer, which may explain the insufficient effectiveness of the existing immunotherapy for this type of tumor. The results obtained will undoubtedly facilitate the development of new effective methods for the diagnostics and therapy of ovarian cancer.*

**Key words:** ovarian cancer; immune checkpoints; sPD-1; sPD-L1; sNKG2D; sNKG2DL1; sB7-H3; sHLA-G.

**For citation:** Kovaleva O.V., Belova T.P., Kushlinsky D.N., Korotkova E.A., Podlesnaya P.A., Gratchev A.N., Zinoviev S.V., Tereshkina I.V., Sokolov N.Yu., Kudlay D.A., Kushlinskii N.E. Soluble forms of immune checkpoints in ovarian cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (2): 80-86 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-2-80-86>

**For correspondence:** Kovaleva O.V., Ph.D., Senior Researcher, Laboratory of regulation of cellular and viral oncogenes; e-mail: [ovkovaleva@gmail.com](mailto:ovkovaleva@gmail.com)

**Information about authors:**

Kovaleva O.V., ORCID 0000-0001-6132-9924;  
Belova T.P., ORCID 0000-0002-4776-0555;  
Kushlinsky D.N., ORCID 0000-0003-1490-8418;  
Podlesnaya P.A., ORCID 0000-0003-2312-5546;  
Gratchev A.N., ORCID 0000-0003-2137-1866;  
Zinoviev S.V., ORCID 0000-0003-1037-2601;  
Tereshkina I.V., ORCID 0000-0003-4427-1374;  
Korotkova E.A., ORCID 0000-0002-2509-5232;  
Sokolov N.Yu., ORCID 0000-0002-0706-9575;  
Kudlay D.A., ORCID 0000-0003-1878-4467;  
Kushlinskii N.E., ORCID 0000-0002-3898-4127.

**Acknowledgment.** *The study was supported by RFBR grant № 20-015-00479.*

**Conflict of interest.** *The authors declare no conflict of interest.*

Received 17.01.2021  
Accepted 30.01.2021

**Введение.** Ежегодно в мире от рака яичников (РЯ) умирает около 140 тыс. женщин и еще у 220 тыс. выявляется это заболевание. Показатели 5-летней выживаемости варьируют от 30 до 50%. Несмотря на успехи в области хирургии и химиотерапии, смертность от РЯ остается высокой. Основными причинами этого, помимо поздней диагностики, являются мозаичность генетических и эпигенетических нарушений в опухолевых клетках и их динамические изменения в ходе лечения, что осложняет выбор химиотерапии. Уникальность набора мутаций и эпигенетических изменений в каждой опухоли определяет индивидуальную чувствительность пациенток к различным схемам лекарственной терапии (в том числе, таргетной), при этом даже в группе больных с обнаруженными мутациями таргетный препарат оказывается эффективным только у 50% пациенток (в частности, дорогостоящий препарат олапариб, который уже внедряется в постоянную клиническую практику в России и назначается больным с мутантными генами *BRCA*, у 70% пациенток оказывается неэффективным) [1]. Это обуславливает необходимость разработки новых терапевтических подходов. В настоящее время в связи с активным развитием иммунотерапии, самые распространенные ингибиторы контрольных точек иммунитета постепенно внедряются в терапию РЯ.

Появление ингибиторов иммунных контрольных точек (ICI), в основном включающих моноклональные антитела (mAb) к PD-1/PD-L1 (рецептор программируемой гибели клеток 1/лиганд 1 программируемой гибели клеток) и CTLA-4 (антицитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген-4) сформировали терапевтический ландшафт некоторых видов злокачественных опухолей. За последние несколько лет опубликовано ряд исследований, посвященных использованию существующей иммунотерапии (анти-CTLA4 и анти PD-1/PD-L1) при РЯ. F.S. Nodi и соавт. [2, 3] впервые продемонстрировали противоопухолевые эффекты ипилимумаба (анти-CTLA-4) у девяти больных РЯ в IV стадии после вакцинации облученными аутологичными опухолевыми клетками, сконструированными для производства гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GVAX). У одного пациента был отмечен объективный ответ, и многократные инфузии антитела анти-CTLA-4 каждые 3-5 мес позволили стабилизировать заболевание на 4 года. Кроме того, у трех пациенток отмечена стабилизация опухолевого процесса на 6, 4 и 2 мес соответственно, что подтверждал уровень CA-125.

Несмотря на большое количество проведенных клинических исследований, результаты лечения РЯ, достигаемые с использованием моноиммунотерапии, не являются столь впечатляющими и многообещающими, как при других новообразованиях. Возможно ли что-то предпринять? Недавние исследования выявили несколько иммунных контрольных точек, таких как NKG2D, B7-H3, HLA-G и др., которые можно использовать в качестве потенциальных мишеней для иммунотерапии опухолей.

B7-H3, также называемый CD276, представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа, который кодируется геном на 15-й хромосоме у человека [4]. Первоначальное исследование описало его как положительный костимулятор, так как он может стимулировать Т-клеточный ответ и продукцию IFN- $\gamma$  [4]. Однако недавние исследования показали, что B7-H3 участвует в ингибировании Т-клеток [5, 6]. Рецептор для B7-H3 еще не идентифицирован, и это может объяснить сложную иммуномодулирующую активность B7-H3, поскольку он может иметь более одного партнера по связыванию с различными функциями [7]. Экспрессию белка B7-H3 можно обнаружить на активированных иммунных клетках, таких как Т-клетки, НК-клетки и APC. Интересно, что B7-H3 гиперэкспрессирован в широком спектре опухолевых клеток и связан с прогрессией заболевания и прогнозом [8].

NKG2D, он же CD314 – трансмембранный белок II типа, принадлежащий к суперсемейству лектинов типа C, кодируется геном *KLRK1* (лектин-подобный рецептор киллерных клеток K1), расположенном на 12-й хромосоме у человека [9]. NKG2D – это активирующий рецептор, экспрессирующийся на поверхности всех НК-клеток,  $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитах и CD8 $^+$  $\alpha\beta$  Т-клетках [10]. Таким образом, NKG2D обеспечивает формирование иммунного ответа посредством активации Т-лимфоцитов и НК-клеток, благодаря чему этот белок и его лиганды потенциально могут служить терапевтическими мишенями для лечения иммунных и онкологических заболеваний [11].

Одним из лигандов NKG2D является белок, известный как связывающий гликопротеин UL-16 – белок ULBP1 (NKG2DL1). Известно, что связывание этого белка с рецептором NKG2D приводит к активации сигнальных путей JAK/STAT и PI3K/Akt/ERK и, как следствие, активации цитотоксичности НК и Т-клеток. Уход опухолевых клеток от иммунного над-

зора может осуществляться путем инактивации NKG-2DL1 [12]. Прогностическая роль NKG2DL1 при различных онкологических заболеваниях неоднозначна. Так R.W.McGilvray et al. показали, что высокая экспрессия ULBP1 ассоциирована с худшей выживаемостью больных при РЯ [13], в то время как для колоректального рака она ассоциирована с благоприятным прогнозом [14].

Человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), также является лигандом многих рецепторов, например NKG2A и NKG2D. В отличие от NKG2DL1 данный лиганд изучен достаточно хорошо. Накопленные данные свидетельствуют о том, что HLA-G способствует иммуносупрессии. Так, взаимодействие лиганда с рецептором CD8 на поверхности Т-лимфоцитов и NK-клеток стимулирует FasL-опосредованный апоптоз иммунных клеток. Взаимодействие HLA-G с макрофагами через рецепторы ILT2 и ILT4 приводит к ингибированию цитотоксичности последних и формированию незрелого фенотипа, отличающегося сниженной экспрессией CD80/86 и главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) на поверхности мембран.

HLA-G в некоторых наблюдениях ассоциирован с плохим прогнозом РЯ. Так, в обзоре результатов анализа экспрессии HLA-G при РЯ с акцентом на его биологическое и клиническое значение показано, что данный белок участвует в механизмах, обеспечивающих уход от иммунного надзора злокачественной опухоли, а его повышенная экспрессия связана со степенью тяжести заболевания. Авторы отмечают, что не только экспрессия HLA-G в опухоли, но и уровень его растворимой формы в крови может потенциально использоваться в качестве маркера для раннего выявления РЯ у пациенток из группы высокого риска. Более того, sHLA-G в асцитической жидкости может быть использован для дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных новообразований яичников. Также авторы указали на возможность использования иммунотерапии анти-HLA-G в сочетании с химиотерапией у больных РЯ [15]. Существуют данные о том, что уровень HLA-G в асцитической жидкости положительно коррелирует с экспрессией регуляторных Т-клеток и отрицательно с экспрессией NK и клеток памяти в опухолевой строме [16].

Цель настоящего исследования - сравнительный анализ содержания sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G в плазме крови пациенток с различными гистологическими формами эпителиального РЯ и контрольной группы здоровых доноров.

**Материал и методы.** В исследование включены 75 больных эпителиальным РЯ (средний возраст 54,6 года) и 20 здоровых доноров (средний возраст 44,1 года), проходивших обследование и лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием больных и здоровых доноров, соответствуют этическим стандартам этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участника получено информированное добровольное согласие. Клинический диагноз у всех пациенток подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации. В исследование включены пациентки с эпителиальным РЯ трех гистологических

типов: серозным (52), эндометриоидным (13) и муцинозным (10).

Концентрацию исследуемых белков sPD-L1, sPD-1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G определяли в плазме крови, полученной по стандартной методике с использованием ЭДТА до начала специфического лечения, с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа: Human PD-L1 Platinum ELISA, Human PD-1 ELISA kit (Affimetrix, eBioscience, США), Human B7-H3 Quantikine ELISA Kit (Cat # DB7H30, R&D), Human NKG2D ELISA Kit (Catalog # LS-F50251, LifeSpan BioSciences), Human soluble NKG2D ligands ELISA Kit (Catalog MBS744276, MyBiosource), HLA-G ELISA Kit (Catalog # LS-F5033, LifeSpan BioSciences) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе BEP 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Содержание маркеров выражали в пикограммах (пг), нанограммах (нг) или условных единицах (Ед) на 1 мл плазмы крови.

Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prizm 9.0. При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса, коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Различия и корреляции считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Проведен анализ концентраций растворимых форм рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1, а также sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G в плазме крови 75 первичных больных РЯ и 20 здоровых доноров. Среднее содержание sPD-1 в плазме крови здоровых доноров составило 41,5 (19,0-66,4) пг/мл, а в группе больных РЯ - 51,0 (11,7-213,2) пг/мл. Среднее содержание sPD-L1 в плазме крови в группе контроля составило 70,8 (9,0-149,5) пг/мл, что статистически значимо выше, чем у больных РЯ 38,99 (0,000-113,2) пг/мл ( $p=0,0034$ ). Среднее содержание sNKG2D в плазме крови здоровых доноров составило 4,36 (0-32,63) нг/мл и было статистически значимо ниже, чем у больных РЯ 12,8 (0-289,1) нг/мл ( $p=0,1083$ ). Для лиганда sNKG2DL1, аналогично с sPD-L1, характерно его снижение в плазме крови больных РЯ. Так, среднее содержание sNKG2DL1 в плазме крови здоровых доноров составило 3,8 (0-28,8) нг/мл, а в группе пациенток 1,7 (0-28,7) нг/мл ( $p=0,028$ ). Однако необходимо отметить, что для данной пары белков наблюдали достаточно большое количество образцов, в которых содержание маркеров не выявлено. Так, в контрольной группе sNKG2D не обнаружены в 15% образцов (3 из 20), а его лиганд - sNKG2DL1 в 20% образцов (4 из 20). В случае РЯ sNKG2D отсутствовал в 44% образцов (33 из 75), а sNKG2DL1 в 56% (42 из 75). Уровни HLA-G были статистически значимо выше в плазме крови здоровых доноров 545,7 (90,8-2173) Ед/мл по сравнению с больными РЯ 225,7 (29,9-4421) Ед/мл. Результаты среднего содержания исследованных белков представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Как видно из представленных данных, для четырех исследованных белков наблюдается значимое снижение их содержания в плазме крови больных эпителиальным РЯ.

Далее провели анализ информативности диагностического метода с помощью оценки его чувствительности и специфичности с помощью построения ROC-кривых и вычисления площади под ними (AUC). Результаты представлены на рис. 1, А-Г.

На следующем этапе исследования провели анализ содержания sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и

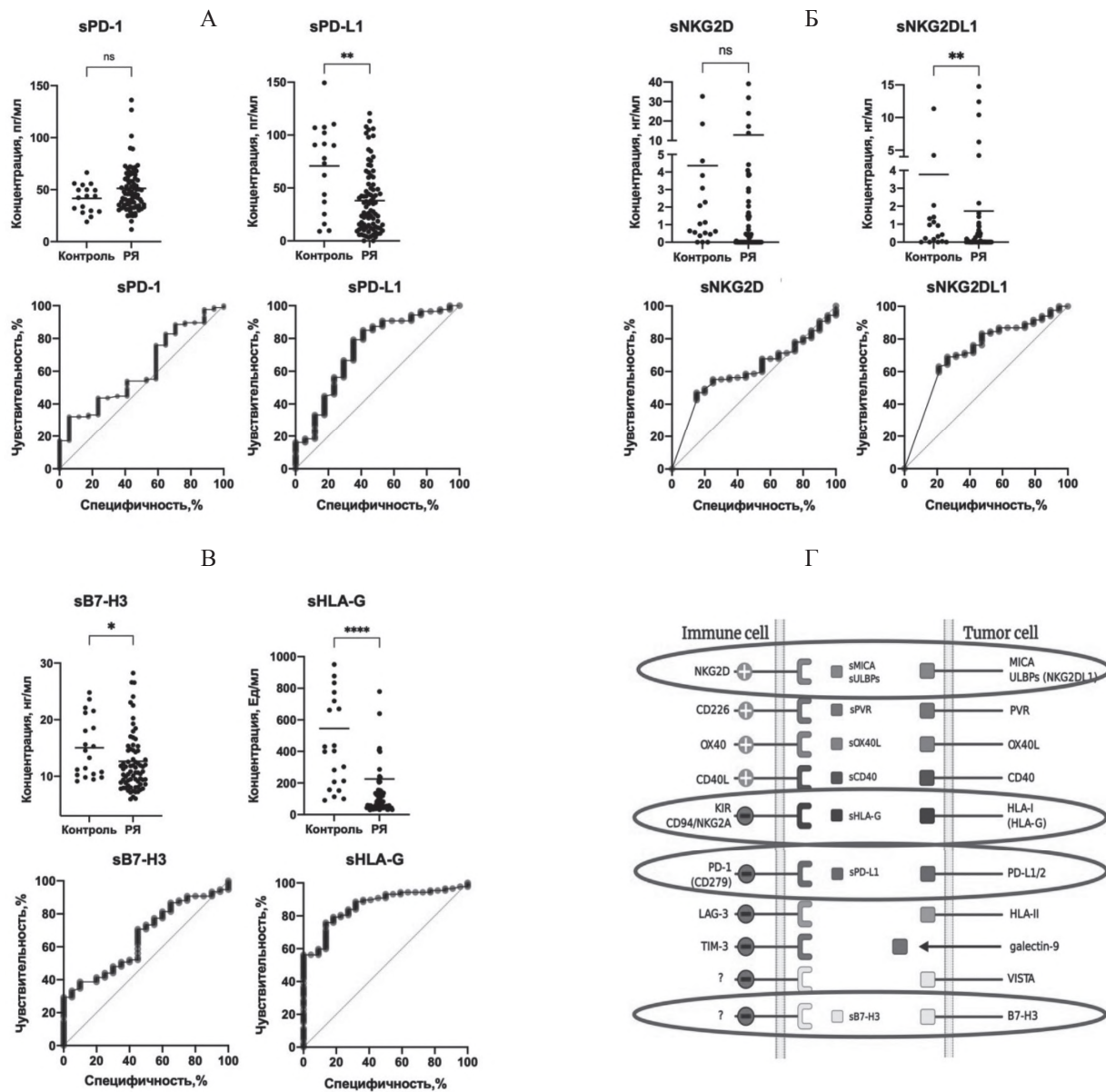


Рис. 1. Сравнительный анализ уровней содержания sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3, sHLA-G у больных РЯ и здоровых доноров.

А – сравнительный анализ уровня содержания sPD-1 и sPD-L1 у больных РЯ и здоровых доноров. ROC-анализ для sPD1 и sPD-L1 у больных РЯ: площадь под ROC-кривой составляет 0,609 ( $p=0,1620$ ) для sPD1 и 0,724 ( $p=0,0040$ ) для sPD-L1;

Б – сравнительный анализ уровня содержания sNKG2D и sNKG2DL1 у больных РЯ и здоровых доноров. ROC-анализ для sNKG2D и sNKG2DL1 у больных РЯ: площадь под ROC-кривой составляет 0,614 ( $p=0,1174$ ) для sNKG2D и 0,706 ( $p=0,0059$ ) для sNKG2DL1;

В – сравнительный анализ уровней sB7-H3 и sHLA-G в плазме крови больных РЯ и здоровых доноров. ROC-анализ для sB7-H3 и sHLA-G у больных РЯ: площадь под ROC-кривой составляет 0,657 ( $p=0,0316$ ) для sB7-H3 и 0,875 ( $p<0,0001$ ) для sHLA-G;

Г – растворимые и мембраносвязанные факторы, подавляющие противоопухолевую активность иммунных клеток.

Таблица 1

Среднее содержание исследуемых белков в плазме крови больных РЯ и в контроле

Маркеры	Контроль (среднее, мин.-макс.)	РЯ (среднее, мин.-макс.)	<i>p</i>
sPD-1, пг/мл	41,5 (19,0-66,4)	51,0 (11,7 -213,2)	0,1641
sPD-L1, пг/мл	70,8 (9,0-149,5)	38,9 (0-113,2)	0,0034*
sNKG2D, нг/мл	4,4 (0-32,6)	12,8 (0-289,1)	0,1083
sNKG2DL1, нг/мл	3,8 (0-28,8)	1,7 (0-28,7)	0,0028*
sB7-H3, нг/мл	15,0 (9,1-24,8)	12,7 (5,9-40,3)	0,0310*
sHLA-G, Ед/мл	545,7 (90,8-2173)	225,7 (29,9-4421)	<0,0001*

sHLA-G в образцах плазмы крови больных РЯ в зависимости от гистологического типа опухоли. В исследование включены 13 эндометриодных, 52 серозных и 10 муцинозных опухолей. Особо необходимо упомянуть о системе sNKG2D/sNKG2DL1. Как было указано ранее, данные белки не обнаружены почти в половине исследованных образцов крови. Так, для муцинозных опухолей яичников характерно выявление растворимой формы рецептора sNKG2D в 80% образцов (8 из 10), а лиганда в 50% образцов (5 из 10). Для серозных опухолей яичников уровни рецептора sNKG2D обнаружены в 50% образцов (26 из 52), а лиганда в 37% образцов (19 из 52). При эндометриодных опухолях яичников уровни sNKG2D и sNKG2DL1 обнаружены в 62% образцов (8 из 13). Таким образом, sNKG2D чаще выявляли в плазме крови пациенток с муцинозным РЯ, в то время как sNKG2DL1 - в плазме крови пациенток с эндо-

метриодным РЯ. Результаты анализа содержания растворимых форм всех исследованных маркеров в зависимости от гистологического типа опухоли представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 следует, что снижение содержания sPD-L1, sNKG2DL1 и sB7-H3 характерно для серозного РЯ. Для HLA-G отмечено статистически значимое снижение концентрации маркера в плазме крови больных при всех гистологических типах РЯ.

**Корреляционная связь между растворимыми формами sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G.** Провели корреляционный анализ экспрессии исследуемых белков с помощью определения коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты представлены на рис. 2.

Показано, что уровни растворимых форм рецептора sPD-1 и лиганда sPD-L1 статистически значимо

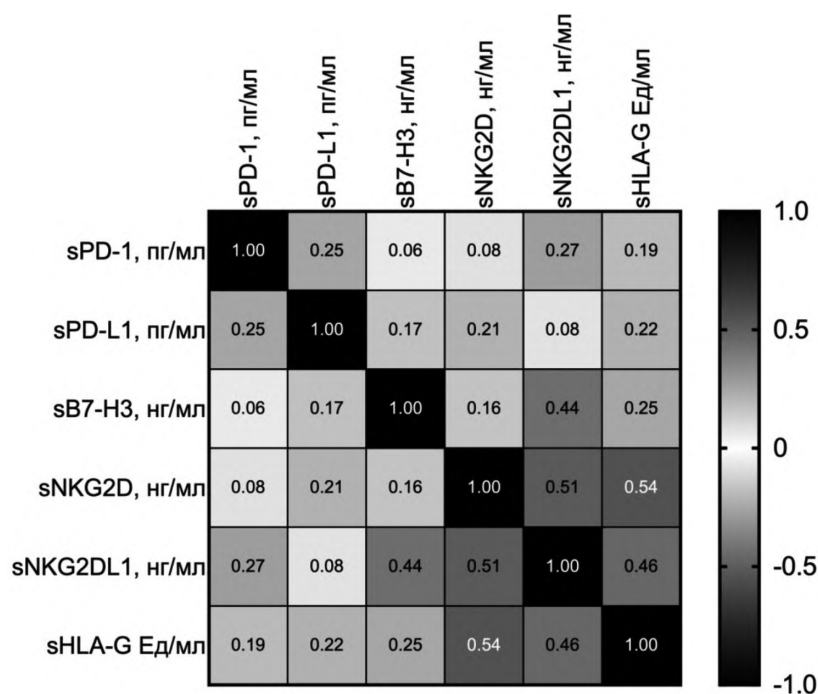


Рис. 2. Корреляционный анализ между содержанием sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G в плазме крови больных раком яичников (коэффициент корреляции Спирмена).

Таблица 2

Среднее содержание исследуемых белков в плазме крови больных раком яичников в зависимости от морфологического типа опухоли (среднее, мин.-макс.)

Маркеры	Контроль (n=20)	Рак яичников			Kruskal-Wallis test, p		
		муцинозная (n=10)	серозная (n=52)	эндометриодная (n=13)	контроль vs муцинозная	контроль vs серозная	контроль vs эндометриодная
sPD-1, пг/мл	41,5 (19,0-66,4)	43,0 (30,4-60,3)	52,0 (11,6-213,2)	53,2 (24,6-89,9)	>0,9999	0,5563	0,2932
sPD-L1, пг/мл	70,8 (9,0-149,5)	42,2 (10,8-105,1)	37,1 (0-113,3)	43,9 (5,7-107,9)	0,2683	0,0077*	0,3692
sNKG2D, нг/мл	4,4 (0-32,6)	1,8 (0-6,3)	15,1 (0-289,1)	12,1 (0-79,3)	>0,9999	0,1925	>0,9999
sNKG2DL1, нг/мл	3,8 (0-28,8)	0,4 (0-1,6)	2,0 (0-28,7)	1,6 (0-14,7)	0,2740	0,0053*	0,4753
sB7-H3, нг/мл	15,0 (9,1-24,8)	15,5 (7,9-26,5)	12,3 (5,9-40,2)	11,6 (6,0-16,6)	>0,9999	0,0349*	0,3247
sHLA-G, Ед/мл	545,7 (90,8-2173)	132,0 (41,8-398,4)	256,7 (29,8-4421)	173,9 (41,8-639,7)	0,0118*	<0,0001*	0,0053*

коррелируют между собой ( $r=0,25$ ;  $p=0,028$ ). Также выявили корреляционную связь между уровнями sPD-1 и sNKG2DL1 ( $r=0,27$ ;  $p=0,019$ ) и sB7-H3 и sNKG2DL1 ( $r=0,44$ ;  $p<0,001$ ). Кроме того, выявили сильную корреляционную связь между концентрациями sHLA-G и sNKG2D, sHLA-G и sNKG2DL1 ( $r=0,54$ ;  $p<0,001$  и  $r=0,46$ ;  $p<0,001$  соответственно).

Контрольные точки иммунитета играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза посредством стимуляции или подавления сигналов в иммунных клетках и регулирования их функций. В иммунной системе контрольные точки можно разделить на две группы: стимулирующие молекулы, такие как TCR/MHC, и ингибирующие молекулы, такие как CTLA-4/CD80 или CD86 и PD-1/PD-L1 (см.рис.1, Г). За последние годы в иммунной системе выявлено и описано большое количество новых рецепторов и их лигандов. В дополнение к рецепторам и лигандам на клеточной мембране, выявлен ряд растворимых форм иммунных контрольных точек, которые могут быть обнаружены в кровотоке. Эти молекулы играют важную роль в иммунной регуляции, могут участвовать в развитии различных патологических состояний и считаются потенциальными маркерами и/или терапевтическими мишенями.

В данном исследовании впервые проведен комплексный анализ содержания растворимых форм белков sPD-1, sPD-L1, sNKG2D, sNKG2DL1, sB7-H3 и sHLA-G в плазме крови 75 первичных больных эпителиальным РЯ и 20 здоровых доноров.

На первом этапе исследования оценили уровень содержания растворимых форм sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных РЯ и в группе контроля. Проведенный анализ показал, что содержание лиганда sPD-L1 статистически значимо снижается в плазме крови при развитии опухолевого процесса ( $p=0,0034$ ). Причем это снижение характерно только для серозного РЯ ( $p=0,0077$ ). Для других гистологических типов РЯ таких закономерностей не наблюдали. Для рецептора sPD-1 не выявлено изменений в содержании у больных РЯ. Литературные данные относительно содержания растворимых форм sPD-1 и sPD-L1 достаточно противоречивы. Известно, что концентрация sPD-L1 повышается у пациентов с возрастом и при некоторых типах опухолей, например при раке почки [17]. Однако для рака желудка таких закономерностей не выявлено. Наоборот, для опухолей желудка характерно снижение концентрации sPD-1 в крови пациентов [18].

Нами впервые проведен анализ содержания растворимых форм рецептора sNKG2D и одного из его лигандов sNKG2DL1. Роль NKG2D в патогенезе РЯ весьма противоречива. Современная иммунотерапия направлена на стимуляцию функции NKG2D с целью повышения иммунного ответа посредством активации Т-лимфоцитов и NK-клеток, однако представлены исследования, определяющие NKG2D как фактор злокачественности опухоли. Так, на модели РЯ продемонстрировано, что NKG2D+ клетки обладали повышенной способностью к колониеобразованию *in vitro* и инициации развития опухолей *in vivo* у иммунодефицитных мышей [11]. Для данной пары белков результаты были аналогичны маркерам sPD-1 и sPD-L1, а именно содержание рецептора sNKG2D значимо не менялось при наличии опухолевой патологии, в то время как содержание sNKG2DL1 значимо снижалось по сравнению с контрольной группой. Также как и для sPD-L1, снижение наблюдали

только в группе пациенток с серозными опухолями яичников. Необходимо отметить, что приблизительно у половины обследованных больных РЯ в плазме крови белки sNKG2D и sNKG2DL1 не выявлены. Литературных данных относительно содержания данных белков в крови при различных заболеваниях достаточно мало. Показано, что содержание одного из растворимых лигандов sNKG2D в крови пациентов с множественной миеломой выше, чем в контрольной группе [19]. Для РЯ показано, что повышенный уровень двух других лигандов NKG2D - sMICA and sULBP2 в асцитах, ассоциирован с худшим прогнозом [20]. Исследований растворимой формы лиганда sNKG2DL1 при РЯ ранее не проводили.

Кроме того, нами показано значимое снижение содержания sB7-H3 ( $p=0,0310$ ) и sHLA-G ( $p<0,0001$ ) у больных РЯ. Литературные данные, посвященные sB7-H3, чаще ассоциируют его экспрессию с плохим прогнозом различных заболеваний, например, при гепатоцеллюлярной карциноме [21]. В проведенном нами исследовании показано статистически значимое снижение обоих лигандов в группе больных РЯ по сравнению с контролем. Необходимо отметить, что статистически значимое снижение B7-H3 выявлено в группе больных серозным РЯ ( $p=0,0349$ ), в то время как содержание HLA-G было статистически значимо ниже при всех гистологических типах опухолей по сравнению с контролем. Также необходимо отметить, что экспрессия HLA-G при РЯ ассоциирована с благоприятным прогнозом [22].

Проведенное исследование показало, что для различных морфологических типов эпителиального РЯ содержание растворимых форм исследованных белков статистически значимо отличается. Из литературных данных известно, что муцинозные и эндометриодные опухоли РЯ более благоприятны с прогностической точки зрения, по сравнению с серозным вариантом [23, 24]. Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что именно серозные опухоли являются более иммуногенными по сравнению с другими исследованными морфологическими типами РЯ и имеют перспективу для проведения иммунотерапии. На сегодняшний день эффективность иммунотерапии эпителиальных опухолей яичников составляет приблизительно 10-15% независимо от их гистологического варианта [25]. Возможно, для повышения ее эффективности необходимо учитывать данный параметр.

**Заключение.** Несмотря на накопленное достаточно большое количество данных в области иммунологии опухолей, многие аспекты опухолевой иммуносупрессии и толерантности еще до конца не ясны. Результаты исследований, посвященные контрольным точкам иммунитета в сыворотке и плазме крови, опубликованные за последние годы, свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения роли данных маркеров при опухолях различных локализаций. В настоящее время понятно, что существует большое количество взаиморегулирующих и компенсаторных механизмов, позволяющих опухоли избегать иммунного ответа. Результаты, полученные в данном исследовании это также подтверждают. Изучение взаимодействия и динамики изменения содержания растворимых форм белков контрольных точек иммунитета, а также более строгие критерии отбора больных РЯ для иммунотерапии, помогут повысить эффективность существующего лечения.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-015-00479).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-16, 19-25 см. REFERENCES)

17. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Горячева И.О., Морозов А.А., Алферов А.А., Бежанова С.Д., Казанцева И.А., Базаев В.В., Матвеев В.Б. Растворимые формы рецептора контрольной точки иммунитета PD-1 и его лиганда PD-L1 в сыворотке крови больных почечно-клеточным раком: клинико-морфологические корреляции. *Онкоурология*. 2019;15(1):15-22.
18. Герштейн Е.С., Огнерубов Н.А., Чанг В.Л., Делекторская В.В., Короткова Е.А., Соколов Н.Ю., Поликарпова С.Б., Стилиди И.С., Кушлинский Н.Е. Растворимые формы PD-1 и PD-L1 в плазме крови больных раком желудка и их связь с клиническими и морфологическими характеристиками заболевания. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (6): 347-52.

REFERENCES

1. Tomao F., Voccia S.M., Sassu C.M., Chirra M., Palaia I., Petrella M.C. et al. First-Line Treatment with Olaparib for Early Stage BRCA-Positive Ovarian Cancer: May It Be Possible? Hypothesis Potentially Generating a Line of Research. *Cancer Manag. Res.* 2020;12:5479-89.
2. Hodi F.S., Mihm M.C., Soiffer R.J., Haluska F.G., Butler M., Seiden M.V. et al. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100(8):4712-7.
3. Hodi F.S., Butler M., Oble D.A., Seiden M.V., Haluska F.G., Kruse A. et al. Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(8):3005-10.
4. Chapoval A.I., Ni J., Lau J.S., Wilcox R.A., Flies D.B., Liu D. et al. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat. Immunol.* 2001;2(3):269-74.
5. Prasad D.V., Nguyen T., Li Z., Yang Y., Duong J., Wang Y., Dong C. Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. *J. Immunol.* 2004;173(4):2500-6.
6. Suh W.K., Gajewska B.U., Okada H., Gronski M.A., Bertram E.M., Dawicki W. et al. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat. Immunol.* 2003;4(9):899-906.
7. Janakiram M., Shah U.A., Liu W., Zhao A., Schoenberg M.P., Zang X. The third group of the B7-CD28 immune checkpoint family: HHLA2, TMIGD2, B7x, and B7-H3. *Immunol. Rev.* 2017;276(1):26-39.
8. Castellanos J.R., Purvis I.J., Labak C.M., Guda M.R., Tsung A.J., Velpula K.K., Asuthkar S. B7-H3 role in the immune landscape of cancer. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 2017;6(4):66-75.
9. Yabe T., McSherry C., Bach F.H., Fisch P., Schall R.P., Sondel P.M., Houchins J.P. A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins. *Immunogenetics.* 1993;37(6):455-60.
10. Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L., Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999;285(5428):727-9.
11. Cai X., Caballero-Benitez A., Gewe M.M., Jenkins I.C., Drescher C.W., Strong R.K. et al. Control of Tumor Initiation by NKG2D Naturally Expressed on Ovarian Cancer Cells. *Neoplasia.* 2017;19(6):471-82.

12. Molfetta R., Zingoni A., Santoni A., Paolini R. Post-translational Mechanisms Regulating NK Cell Activating Receptors and Their Ligands in Cancer: Potential Targets for Therapeutic Intervention. *Front Immunol.* 2019;10:2557.
13. McGilvray R.W., Eagle R.A., Rolland P., Jafferji I., Trowsdale J., Durrant L.G. ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients. *Int. J. Cancer.* 2010;127(6):1412-20.
14. McGilvray R.W., Eagle R.A., Watson N.F., Al-Attar A., Ball G., Jafferji I., Trowsdale J., Durrant L.G. NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoeediting. *Clin. Cancer Res.* 2009;15(22):6993-7002.
15. Sheu J.J., Shih IeM. Clinical and biological significance of HLA-G expression in ovarian cancer. *Semin Cancer Biol.* 2007;17(6):436-43.
16. Ullah M., Azazzen D., Kaci R., Benabbou N., Pujade Lauraine E., Pocard M., Mirshahi M. High Expression of HLA-G in Ovarian Carcinomas: The Role of Interleukin-1 $\beta$ . *Neoplasia.* 2019;21(3):331-342.
17. Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Goryatcheva I.O., Morozov A.A., Alferov A.A., Bezhanova S.D., Kazantseva I.A., BazaeV V.V., Matveev V.B. Soluble forms of the immune check-point receptor PD-1 and its ligand PD-L1 in blood serum of patients with renal cell carcinoma: clinical and pathologic correlations. *Onkourologiya.* 2019;15(1):15-22. (in Russian)
18. Gershtein E.S., Ognеrubov N.A., Chang V.L., Delektorskaya V.V., Korotkova E.A., Sokolov N.Yu., Polikarpova S.B., Stiliidi I.S., Kushlinskii N.E. The content of the soluble forms PD-1 and PD-L1 in blood serum of patients with gastric cancer and their relationship with clinical and morphological characteristics of the disease. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2020;65(6):347-52. (in Russian)
19. von Lilienfeld-Toal M., Frank S., Leyendecker C., Feyler S., Jarmin S., Morgan R. et al. Reduced immune effector cell NKG2D expression and increased levels of soluble NKG2D ligands in multiple myeloma may not be causally linked. *Cancer Immunol. Immunother.* 2010;59(6):829-39.
20. Vyas M., Reinartz S., Hoffmann N., Reiners K.S., Lieber S., Jansen J.M., Wagner U., Müller R., von Strandmann E.P. Soluble NKG2D ligands in the ovarian cancer microenvironment are associated with an adverse clinical outcome and decreased memory effector T cells independent of NKG2D downregulation. *Oncimmunology.* 2017;6(9):e1339854.
21. Zhao L., Xie C., Liu D., Li T., Zhang Y., Wan C. Early detection of hepatocellular carcinoma in patients with hepatocirrhosis by soluble B7-H3. *J. Gastrointest. Surg.* 2017;21:807-12.
22. Rutten M.J., Dijk F., Savci-Heijink C.D., Buist M.R., Kenter G.G., van de Vijver M.J., Jordanova E.S. HLA-G Expression Is an Independent Predictor for Improved Survival in High Grade Ovarian Carcinomas. *J. Immunol. Res.* 2014;2014:274584.
23. Peres L.C., Cushing-Haugen K.L., Köbel M., Harris H.R., Berchuck A., Rossing M.A., Schildkraut J.M., Doherty J.A. Invasive Epithelial Ovarian Cancer Survival by Histotype and Disease Stage. *J. Natl. Cancer Inst.* 2019;111(1):60-8.
24. Irodi A., Rye T., Herbert K., Churchman M., Bartos C., Mackean M. et al. Patterns of clinicopathological features and outcome in epithelial ovarian cancer patients: 35 years of prospectively collected data. *BJOG.* 2020;127(11):1409-20.
25. Palaia I., Tomao F., Sassu C.M., Musacchio L., Benedetti Panici P. Immunotherapy For Ovarian Cancer: Recent Advances And Combination Therapeutic Approaches. *Onco Targets Ther.* 2020;13:6109-29.

Поступила 17.01.21

Принята к печати 30.01.21