

doi : 10.52485/19986173\_2021\_4\_11

УДК 616-006.61: 616-092.4

<sup>1</sup>Ашрафян Л.А., <sup>2</sup>Белокрыницкая Т.Е. <sup>2</sup>Каюкова Е.В.,  
<sup>3</sup>Шолохов Л.Ф., <sup>2</sup>Мудров В.А., <sup>2</sup>Терешков П.П.

## ЛОКАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ БЕЛКОВ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ИММУННОГО ЦИКЛА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4;

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 672000 г. Чита, ул. Горького, 39А;

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», 664003 г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16

Эффективность известных иммунопрепаратов в отношении рака шейки матки (РШМ) невысока. Поиск дополнительных иммунологических мишеней при РШМ является актуальным.

**Цель исследования:** оценить уровень некоторых белков иммунного цикла у больных РШМ (sCD25, 4-1BB, B7.2, TGF- $\beta$ 1, CTLA-4, PD-L1, PD-1, Tim-3, LAG-3, Galectin-9, sCD27, PD-L2) в зависимости от распространения опухолевого процесса.

**Материалы и методы исследования.** В исследование включены пациентки с предраковыми заболеваниями (n=13) и РШМ (n=49). Контрольную группу составили 13 гинекологически здоровых женщин. Материал для исследования – цервикальный эпителий, полученный по стандартной методике путем забора мазка цервикальной щеточкой. Методом проточной цитометрии определяли следующие показатели: sCD25, 4-1BB, B7.2, TGF- $\beta$ 1, CTLA-4, PD-L1, PD-1, Tim-3, LAG-3, Galectin-9. Статистическая обработка данных проводилась методами непараметрической статистики с применением U-критерия Манна–Уитни.

**Результаты исследования.** У больных с предопухолевыми заболеваниями и РШМ выявлено локальное повышение уровней sCD25, 4-1BB, B7.2, PD-L1, Tim-3, sCD27, LAG-3, sCD27, PD-L2 по сравнению с контролем (p<0,05). Новыми являются данные по изучению локальных уровней sCD25, B7.2, sCD27, PD-L2 у больных РШМ. Дифференциальными критериями инвазивного РШМ может быть повышение локальных уровней 4-1BB и PD-L1 в 4 раза по сравнению с контролем (p<0,05). Мы не установили различия по локальным уровням Gal-9, TGF- $\beta$ , CTLA4 в исследуемых группах, что, возможно, связано с их низкой экспрессией опухолевыми клетками. Выявлена тенденция увеличения уровней PD-L1 и PD-1 у больных РШМ с увеличением стадии опухолевого процесса.

**Заключение.** В процессе цервикального канцерогенеза на локальном уровне нарушается экспрессия белков иммунного цикла, играющих ключевую роль в сбалансированных клеточных иммунных ответах.

**Ключевые слова:** рак шейки матки, контрольные точки иммунного цикла, иммунотерапия, противоопухолевый иммунный ответ ген активации лимфоцитов 3.

<sup>1</sup>Ashrafyan L.A., <sup>2</sup>Belokrinitskaya T.E., <sup>2</sup>Kayukova E.V., <sup>3</sup>Sholokhov L.F.,  
<sup>2</sup>Mudrov V.A., <sup>2</sup>Tereshkov P.P.

## THE LOCAL LEVEL CHECKPOINT PROTEINS OF IMMUNE CYCLE IN PATIENTS WITH CERVICAL CANCER

<sup>1</sup> Federal State Institution "Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology",  
 4 Academician Oparin str., Moscow, Russia, 117997;

<sup>2</sup> Chita state medical academy, 39A Gorky str., Chita, Russia, 672000;

<sup>3</sup> Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, 16 Timiryazeva str.,  
 Irkutsk, Russia, 664003

*The efficiency of immuno-oncological drugs in treatment cervical cancer is not high. The research of new immunological targets in cervical cancer is actual.*

**The aim** was to study the local level of checkpoint proteins of immune cycle in patients with cervical cancer of different stages (sCD25, 4-1BB, B7.2, TGF- $\beta$ 1, CTLA-4, PD-L1, PD-1, Tim-3, LAG-3, Galectin-9, sCD27, PD-L2).

**Materials and research methods.** The objects of study were the patients with precancer (n=13) and cervical cancer (n=49). The control group consisted of 13 gynecologically healthy women. The material of study was cervical epithelium obtained by cervical brush. The research method was flow cytometry. Test parameters: sCD25, 4-1BB, B7.2, TGF- $\beta$ 1, CTLA-4, PD-L1, PD-1, Tim-3, LAG-3, Galectin-9, sCD27, PD-L2. Statistical analysis of the data was carried out using nonparametric statistics using the Mann – Whitney U-test.

**The results of the study.** The local levels of sCD25, 4-1BB, B7.2, PD-L1, Tim-3, sCD27, LAG-3, sCD27, PD-L2 were increased in the patients with precancer and cervical cancer ( $p < 0.05$ ). The data on the study of local levels of sCD25, B7.2, sCD27, PD-L2 in cervical cancer patients are new. The differential criterion for invasive cervical cancer may be an increase in the level of 4-1BB and PD-L1 ( $p < 0,05$ ). We did not find differences in the local levels of Gal-9, TGF- $\beta$ , CTLA4 in the studied groups, which may be related to low expression by tumor cells. We found a tendency of increased levels of PD-L1 and PD-1 in patients with cervical cancer with an increase in the tumor stage.

**Conclusion.** The expression of immune cycle proteins are changed in cervical carcinogenesis which leads to the changes in the antitumor immune response.

**Key words:** cervical cancer, checkpoint proteins of immune cycle, immunotherapy, antitumor immune response

Невысокая эффективность иммунотерапии у больных с метастатическим раком шейки матки (РШМ) [1], известные трудности объективной оценки экспрессии PD-L1 как предиктора ответа опухоли на иммунотерапию [2] являются предпосылками для продолжения поиска патогенетически обоснованных дополнительных иммунологических мишеней клеток РШМ и опухолевого микроокружения.

В настоящее время известен ряд белков иммунного цикла, регулирующих активность клеток иммунной системы, тем самым влияя на их противоопухолевую активность.

sCD25 является одним из регуляторов иммунных реакций при аутоиммунных, онкологических заболеваниях и критических состояниях у реанимационных больных [3]. Образование sCD25 происходит под действием ряда ферментов (эластаза, ММР-9) в процессе шеддинга, что приводит к инактивации клеток иммунной системы, в частности, к функциональной недостаточности НК-клеток, а также к подавлению противоопухолевой активности Т-клеток, что потенцирует опухолевую прогрессию [3].

Рецептор 4-1BB принадлежит к семейству рецепторов TNF, экспрессируется на CD8, CD4- Т-клетках, В-лимфоцитах, регуляторных Т-лимфоцитах, НК клетках, дендритных, тучных клетках и др. Его физиологическая роль заключается в регуляции активности вышеуказанных клеток путем активации множества сигнальных каскадов (JNK, ERK,  $\beta$ -катенин и АКТ) [4]. В литературе мы не нашли данных по изучению уровня 4-1BB у больных РШМ.

Лиганд B7.2 экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках (АПК), может взаимодействовать с рецептором CD28 Т-лимфоцитов, вызывая их активацию и запуск иммунного ответа, или с рецептором CTLA4 активированных Т-лимфоцитов, блокируя иммунные реакции. В отсутствие костимуляции CD28 Т-клетки, подвергшиеся действию антигена, становятся анергичными. Из-за недостаточной экспрессии B7-2 клетки не способны передавать костимулирующие сигналы, необходимые для эффективной активации Т-клеток, что потенцирует опухолевую прогрессию [5].

TGF- $\beta$ 1 (трансформирующий фактор роста-бета) выступает как один из ключевых регуляторов развития и прогрессирования опухоли. Он влияет на все важные этапы прогрессирования рака, включая миграцию и инвазию. Установлен парадоксальный эффект TGF- $\beta$  в опухолевом процессе. На начальных стадиях развития опухоли он оказывает противоопухолевое действие, а при прогрессировании – коканцерогенное. Такой эффект TGF- $\beta$  объясняют изменением активности микро-РНК, контролирующей активность TGF- $\beta$ ,

полиморфизмом гена TGF- $\beta$ , состоянием эндогенных белков [6]. Установлена патогенетическая роль TGF- $\beta$  в канцерогенезе колоректального рака, злокачественных опухолей мочеполовой системы, рака молочной железы.

CTLA-4 (цитотоксический Т-лимфоцитарно-ассоциированный белок 4) является отрицательным иммунным регулятором, подавляющим как противовирусный, так и противоопухолевый иммунный ответ [7]. CTLA4 интегрируется с костимулирующими молекулами CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2), которые экспрессируются на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК), подавляя функцию Т-лимфоцитов. Данные по изучению экспрессии CTLA4 у больных РШМ немногочисленны. Метаанализ 11 международных исследований среди 3899 случаев РШМ выявил значимую связь возникновения опухоли у носительниц полиморфизма rs5742909 гена CTLA4 среди азиаток [8]. Известна аномальная экспрессия CTLA-4 в Т-лимфоцитах, выделенных из периферической крови больных с генерализованным РШМ, что связывают с генетическими нарушениями в самом гене, кодирующим соответствующий белок, а также низким уровнем его антагониста, обладающего иммуностимулирующим действием, CD28, что обусловлено реципрокным взаимодействием [9].

PD-1 (белок программируемой клеточной смерти-1) представляет собой трансмембранный белок, который экспрессируется Т-лимфоцитами. Одним из его лигандов является PD-L1, который экспрессируется на поверхности опухолевых клеток шейки матки, АПК и Т-лимфоцитах. При взаимодействии PD-1 и PD-L1 происходит подавление противоопухолевого и противовирусного иммунного ответа. Данные об экспрессии PD-1 и PD-L1 многочисленны и противоречивы. Существует предположение о влиянии ВПЧ-инфицирования на экспрессию PD-L1 и PD-1 [10].

Tim-3 (Т-клеточный иммуноглобулин-3) является белком, который экспрессируется на Т-лимфоцитах, а также опухолевых клетках, взаимодействует с лигандом – Galectin 9 и ингибирует противоопухолевый иммунный ответ. Tim-3 рассматривается как ингибирующая регуляторная молекула, важная для создания иммунной толерантности в опухолевом микроокружении. Экспрессия Tim-3 и лиганда PD-1 в Т-клетках приводит к истощению Т-клеточного звена и опухолевому росту [12].

LAG-3 (ген активации лимфоцитов 3) является еще одним из белков, относящихся к классу ингибиторов иммунного ответа. LAG-3 экспрессируется на клеточных мембранах ТИЛ, активированных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а также регуляторных Т-клеток, НК, В-лимфоцитах, дендритных клетках. LAG-3 связывается с главным комплексом гистосовместимости-II (МНС-II) на АПК, препятствуя противоопухолевому иммунному ответу [13].

Galectin 9 (Gal-9) относится к семейству  $\beta$ -галактозид связывающих белков. Его патофизиологическая роль в канцерогенезе сложна. Известно, что Gal-9 проявляет проапоптотический эффект путем активации НК и p38-МАРК путей, каспаз 3, -8, -9, что было показано на клетках миеломы. Gal-9 ингибирует инвазию и метастазирование опухолевых клеток меланомы и гепатокарциномы путем влияния на эпителиально-мезенхимальный переход. Рецептором для Gal-9 на клетках иммунной системы является Tim-3. Их взаимодействие приводит к снижению противоопухолевой активности клеток иммунной системы [14].

sCD27 представляет собой растворенную форму трансмембранного белка CD27 (рецептор Т-лимфоцитов), выполняющий роль костимулятора иммунных реакций. Его лигандом является CD70, расположенный на клетках иммунной системы. Их взаимодействие провоцирует стимуляцию иммунного ответа. Установлена патогенетическая роль sCD27 в течение аутоиммунных (системная красная волчанка), вирусных (ВИЧ-инфекция) и некоторых онкологических заболеваниях (лимфома Ходжкина, рак предстательной железы, рак легких, молочной железы, толстой кишки, глиобластоме и др.) [15]. В литературе мы не нашли сведения об изучении sCD27 у больных РШМ.

PD-L2 представляет собой второй лиганд для PD-1 рецептора. Он экспрессируется на АПК, фибробластах. Экспрессия PD-L2, как и PD-L1, в нормальных тканях ограничена. Однако в процессе канцерогенеза активация пути PD-L2 / PD-1 приводит к торможению противоопухолевого иммунного ответа, что потенцирует рост рака [16]. Участие PD-L2 / PD-1 в канцерогенезе практически не исследовано [16]. Известна роль PD-L2 в потенцировании прогрессирования рака (путем активации RhoA-ROCK-LIMK2, PI3K / AKT / mTOR путей), формировании химиорезистентности опухоли.

**Цель исследования:** оценить уровень некоторых белков контрольных точек иммунного цикла у больных РШМ (sCD25, 4-1BB, B7.2, TGF-b1, CTLA-4, PD-L1, PD-1, Tim-3, LAG-3, Galectin-9, sCD27, PD-L2) в зависимости от распространения опухолевого процесса.

**Материалы и методы исследования.** Выполнено нерандомизированное проспективное контролируемое исследование среди пациенток, имеющих предопухолевые состояния, РШМ. Исследуемые группы, сопоставимые по возрасту и сопутствующим заболеваниям (средний возраст составил 39±9,8 лет):

I клиническая группа – пациентки с предопухолевыми заболеваниями шейки матки – цервикальной интраэпителиальной неоплазией III степени (n=13).

II группа – первичные нелеченные больные плоскоклеточным РШМ I-IV стадий (n=49), из них пациентки с неинвазивным (НИ) n=8, инвазивно локализованным (ИЛ) n=18, местнораспространенным (МР) n=19, генерализованным (Г) РШМ n=4.

В контрольную группу вошли 13 гинекологически здоровых женщин-добровольцев, ознакомленных с дизайном исследования и давших информированное согласие на участие в нем (средний возраст – 30,0±4,4 лет). Исследование проведено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki, 1964, 2013 ред.) с согласия Локального этического комитета при ФГБОУ ВО Читинской государственной медицинской академии Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 44 от 09.11.2012).

В качестве материала для исследования использован цервикальный эпителий, полученный по стандартной методике путем забора мазка цервикальной щеточкой с зоны стыка эпителиев. Методом проточной цитометрии FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием набора реагентов, входящих в состав панели HU Immune Checkpoint Panel 1 - S/P (10-plex) w/FP (Канада), определяли следующие показатели: sCD25, 4-1BB, B7.2, TGF-b1, CTLA-4, PD-L1, PD-1, Tim-3, LAG-3, Galectin-9, sCD27, PD-L2.

Статистическая обработка данных проводилась компьютеризованно с использованием пакета программ «IBM SPSS Statistics Version 25.0» (International Business Machines Corporation, license No. Z125-3301-14, США) методами непараметрической статистики с расчетом критерия Краскела-Уоллиса с определением критерия значимости p. Подгрупповой анализ проводился путем попарного сравнения исследуемых показателей с применением U-критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при p<0,05.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Результаты межгруппового анализа приведены в таблице 1. У больных II клинической группы уровень Tim-3 был в 5 [1,1; 2,6] раз выше (p=0,001), чем контрольная величина, однако достоверно не отличался от показателя в I группе (таблица 1). Величины sCD27 и PD-L2 были максимальны во II группе и превышали контрольные показатели в 4,3 [2,8; 3,6] раза (p=0,01) и 3,0 [2,2; 2,4] раза (p=0,02), соответственно, и также превышали соответствующие показатели в I группе в 1,5 раза для каждой из них (p<0,05). Таким образом, повышение величин Tim-3, sCD27 и PD-L2 в цервикальном эпителии является критерием онкологической патологии шейки матки. Высокие локальные уровни sCD27 и PD-L2 могут быть критериями дифференциальной диагностики предрака и РШМ.

Таблица 1

Уровень белков иммунного цикла в цервикальной слизи  
в зависимости от поражения шейки матки (Me (Q1; Q2)), пг/мл

группа показатель	контроль (n=13)	I группа предрак (n=13)	II группа РШМ (n=49)	H-критерий Краскела- Уоллиса
sCD25	2,83 [3,92; 8,33]	14,13 [5,29; 16,5]	9,58 [8,31; 10,86]	H=5,763 p=0,56
4-1BB	13,11 [17,03; 41,87]	22,11 [11,2; 98,7]	18,9 [7,62; 60,9]	H=1,047 p=0,592
B7.2	9,08 [12,54; 26,36]	27,94 [15,7; 45,12]	26,73 [22,40; 31,06]	H=5,006 p=0,82
TGF-b1	5,85 [13,35; 47,92]	13,29 [6,45; 69,0]	33,45 [26,74; 40,15]	H=1,111 p=0,574
CTLA-4	2,86 [8,01; 26,96]	11,65 [8,37; 15,8]	17,88 [14,16; 21,59]	H=1,347 P=0,510
PD-L1	5,27 [24,00; 12,39]	33,18 [6,71; 63,18]	22,63 [17,55; 20,77]	H=4,102 p=0,129
PD-1	17,99 [24,13; 64,82]	47,40 [6,34; 176,5]	55,8 [43,21; 68,39]	H=0,603 p=0,740
Tim-3	<b>14,67</b> <b>[23,34; 75,30]</b>	<b>47,40</b> <b>[23,9; 243,7]</b>	<b>72,27</b> <b>[59,92; 84,61]</b>	<b>H=6,083</b> <b>p=0,048</b>
LAG-3	26,0 [25,24; 57,69]	146,9 [16,2; 41,2]	78,7 [56,23; 101,17]	H=2,238 p=0,327
Galectin-9	1510,11 [1384,49; 2710,45]	1329,9 [1060,3; 4258,4]	2259,75 [2009,26; 2510,25]	H=1,810 p=0,405
sCD27	<b>8,13</b> <b>[8,13; 14,17]</b>	<b>23,9</b> <b>[15,2; 48,0]</b>	<b>35,09</b> <b>[29,36; 40,83]</b>	<b>H=14,49</b> <b>p=0,01</b>
PD-L2	<b>13,88</b> <b>[11,64; 22,02]</b>	<b>33,4</b> <b>[15,3; 52,8]</b>	<b>42,34</b> <b>[32,09; 52,59]</b>	<b>H=7,654</b> <b>p=0,022</b>

Примечание: жирным цветом выделены статистически значимые различия

Уровень sCD25 был повышен у больных ИЛ почти в 5 раз по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) (таблица 2). Следует отметить, что мы не нашли данных по изучению уровня sCD25 у больных РШМ. Однако полученные результаты согласуются с выводами других исследований при неоплазиях [3]. Высокий сывороточный уровень sCD25 является индикатором худшей выживаемости и невосприимчивости к иммунотерапии у больных с меланомой. Abdelfattah Sh. и соавт. предложили использовать определение уровня sCD25 в сыровотке крови как маркер гепатоцеллюлярного рака, учитывая выявленную зависимость между его количественным значением и стадией заболевания. Таким образом, полученные нами данные впервые указывают на активное участие sCD25 в процессах злокачественной трансформации цервикального эпителия.

Таблица 2

Уровень белков иммунного цикла в зависимости от поражения шейки матки  
(Me (Q1; Q2)), пг/мл

группа показатель	Контроль (n=13)	НИ РШМ (n=8)	ИЛ РШМ (n=22)	МР РШМ (n=21)	Г РШМ (n=4)
sCD25	2,83 [2,25; 5,16]	6,85 [2,76; 13,3] p1=0,289 p2=0,949	11,2 [4,57; 15,3] <b>p1=0,030</b> p3=0,092	13,8 [3,0; 12,2] p1=0,443 p4=0,956	9,8 [2,29; 9,8] p1=0,752

4-1BB	13,11 [7,03; 27,3]	27,3 [15,1; 46,1] p1=0,253 p2=0,331	56,0 [11,3; 81,6] <b>p1=0,01</b> p3=0,260	15,5 [7,57; 19,9] p1=0,080 <b>p4=0,001</b>	169,9 [103,4; 266,8] p1=0,07
B7.2	9,08 [7,8; 0,3]	13,6 [8,57; 16,1] p1=0,469 <b>p2=0,037</b>	22,6 [8,28; 55,0] p1=0,131 p3=0,056	16,4 [8,08; 24,1] p1=0,617 p4=0,082	23,5 [18,1; 33,7] p1=0,861
TGF-b1	5,85 [3,53; 18,3]	14,7 [3,44; 34,5] p1=0,076 p2=0,183	44,0 [12,5; 64,8] p1=0,299 p3=0,405	18,6 [3,20; 27,1] p1=0,085 p4=0,322	33,1 [28,9; 58,8] p1=0,645
CTLA-4	2,86 [1,95; 17,2]	13,65 [3,53; 36,3] p1=0,774 p2=0,109	17,8 [5,52; 37,7] p1=0,755 p3=0,140	21,4 [1,79; 18,4] p1=0,119 <b>p4=0,008</b>	2,27 [2,27; 2,93] p1=0,129
PD-L1	5,27 [1,53; 12,0]	15,0 [3,44; 28,9] p1=0,385 p2=0,137	22,5 [5,25; 37,2] <b>p1=0,04</b> p3=0,168	25,6 [2,37; 23,4] p1=0,067 <b>p4=0,001</b>	48,6 [26,8; 72,1] p1=0,331
PD-1	17,99 [1,92; 60,1]	58,3 [19,8; 105,5] <b>p1=0,020</b> <b>p2=0,876</b>	73,0 [9,87; 109,1] <b>p1=0,40</b> <b>p3=0,163</b>	34,7 [1,85; 28,2] <b>p1=0,004</b> <b>p4=0,001</b>	193,9 [142,0; 332,0] <b>p1=0,007</b>
Tim-3	14,7 [11,6; 24,3]	75,6 [19,8; 140,1] p1=0,202 p2=0,376	74,6 [37,6; 147,8] p1=0,145 p3=0,179	59,2 [14,4; 59,2] <b>p1=0,029</b> p4=0,451	52,8 [44,6; 65,5] p1=0,239
LAG-3	26,15 [12,05; 39,3]	34,3 [21,1; 58,6] p1=0,177 <b>p2=0,024</b>	58,9 [27,5; 95,7] <b>p1=0,760</b> <b>p3=0,034</b>	541,2 [11,3; 42,8] p1=0,217 p4=0,001	377,3 [377,3; 739,5] p1=0,05
Galectin-9	1646,8 [937,2; 3087,1]	1724,0 [1347,8; 1818,8] p1=0,273 p2=0,064	2003,0 [1153,7; 3148,6] p1=0,076 p3=0,281	1997,1 [1428,6; 3673,9] p1=0,511 p4=0,263	1313,7 [1129,8; 1413,9] p1=0,197
sCD27	7,17 [3,78; 24,9]	18,6 [11,9; 24,9] <b>p1=0,032</b> p2=0,293	20,4 [17,2; 26,5] <b>p1=0,037</b> p3=0,309	31,6 [17,5; 52,5] <b>p1=0,022</b> <b>p4=0,013</b>	97,6 [66,8; 128,4] <b>p1=0,001</b>
PD-L2	11,7 [4,04; 18,3]	15,9 [11,3; 36,0] p1=0,196 p2=0,223	28,9 [19,8; 36,6] <b>p1=0,021</b> p3=0,462	29,2 [17,5; 57,5] p1=0,506 p4=0,530	66,9 [58,5; 75,4] p1=0,654

Примечание: p1 – статистически значимые различия по сравнению с контролем; p2 – статистически значимые различия между подгруппами НИ и ИЛ; p3 – статистически значимые различия между подгруппами ИЛ и МР; p4 – статистически значимые различия между подгруппами МР и Г

У больных РШМ изменения величин 4-1BB и PD-L1 были выявлены только в подгруппе ИЛ РШМ: увеличение в 4,3 раза, по сравнению с контролем, для каждой из них ( $p < 0,05$ ) (таблица 2). При этом при межгрупповом анализе ИЛ РШМ и I группа выявлены

статистически значимые отличия по значениям 4-1BB и PD-L1, что может быть использовано в качестве дифференциальных критериев. Полученные нами данные о локальном уровне PD-1 согласуются с результатами работы Mezache L. и соавт: экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках была меньше при плоскоклеточном РШМ (51%) по сравнению с поражениями CIN 1-2 (95%) [11]. 4-1BB способствует выживанию Т-клеток, участвует в механизмах формирования иммунологической памяти за счет активации антиапоптотических генов Bcl-2, Bcl-x1, и Bfl-1, индуцирует пролиферацию Т-клеток и усиление их эффекторной функции. Активация 4-1BB приводит к созреванию дендритных клеток, увеличивает их выживаемость и продукцию цитокинов IL-6, IL-12 и IL-27. Двойная способность 4-1BB стимулировать реакции эффекторных Т-клеток на патогены при одновременном ограничении аутоиммунных реакций сделала этот рецептор привлекательной мишенью для иммунотерапии рака [17]. Наши результаты указывают на напряженную активацию одного из звеньев противоопухолевого иммунного ответа.

В проведенном нами исследовании статистически значимых различий по величине TGF- $\beta$  среди исследуемых групп получено не было, как и по уровню CTLA4. Возможно, это связано с низкой экспрессией CTLA4 опухолевыми клетками [18].

Мы выявили тенденцию увеличения уровней PD-L1 и PD-1 у больных с РШМ с возрастанием стадии опухолевого процесса, что согласуется с результатами Meng Y. и соавт., указавшими о существовании корреляции между экспрессией PD-L1 у больных РШМ с клиническими признаками прогрессирования заболевания и неблагоприятными морфологическими факторами прогноза [10].

Значение Tim-3 у больных с МР РШМ превышало величину контроля в 4 раза ( $p < 0,05$ ), что согласуется с выводами Cao Y. и соавт. Авторы установили наличие корреляционных связей между высоким уровнем Tim-3 и стадией опухолевого процесса, худшей общей выживаемостью, метастатическим потенциалом опухоли [19]. Исследования Zhang L. и соавт. установили эпигенетическую регуляцию экспрессии Tim-3 при РШМ под влиянием белков E6 и E7 ВПЧ [20].

Выявлена тенденция увеличения уровня LAG-3 с увеличением стадии опухолевого процесса (таблица 2). В литературе мы нашли ссылку только на одно исследование, указавшее на сверхэкспрессию LAG-3 в ВПЧ-инфицированных клетках РШМ [13].

Мы не установили различия по локальному уровню Gal-9 в исследуемых группах, что соответствует опубликованным ранее результатам о низкой экспрессии Gal-9 опухолевыми клетками РШМ [14].

Уровни sCD27 в подгруппах НИ, ИЛ и МР РШМ превышали соответствующую величину контроля в 2,6; 2,8 и 4,4 раза соответственно ( $p < 0,05$ , что указывают на активацию одного из звеньев противоопухолевого иммунного ответа. Однако, сопоставляя это с клиническими сведениями, можно сделать вывод, что активация sCD27 недостаточна для подавления прогрессирования РШМ.

Уровень PD-L2 у больных с ИЛ РШМ превышал контрольный показатель в 2,5 раза ( $p = 0,021$ ) (таблица 2).

**Заключение.** В процессе цервикального канцерогенеза на локальном уровне нарушается экспрессия белков иммунного цикла, играющих ключевую роль в сбалансированных клеточных иммунных ответах. Возможно, выявленные изменения носят прогностический характер в отношении течения заболевания и имеют предиктивное значение для эффективности иммунотерапии у больных РШМ, что диктует необходимость дальнейшего изучения.

**Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.**

Работа выполнена в рамках государственного задания на научные исследования и разработки на 2018-2020 гг. (№АААА-А17-117030310232-5).

**Сведения о вкладе каждого автора в работу.**

Каюкова Е.В. – участие во всех этапах исследования (50%).

Ашрафян Л.А. – дизайн исследования (10%).  
 Белокриницкая Т.Е. – обзор литературы (10%).  
 Шолохов Л.Ф. – анализ полученных данных (10%).  
 Мудров В.А. – статистический анализ (10%).  
 Терешков П.П. – лабораторная часть исследования (10%).

### Список литературы:

1. Хохлова С.В. Иммуноterapia больных раком шейки матки. Эффективная фармакотерапия. 2015. 15(24). 20-26. <https://doi.org/10.33978/2307-3586-2019-15-24-20-26>.
2. Янус Г.А., Иевлева А.Г., Суспицын Е.Н., Тюрин В.И., Бизин И.В., Горустович О.А., Ни В.И., Холматов М.М., Лайдус Т.А., Чуйнышена С.А., Алексахина С.Н., Имянитов Е.Н. Предикивные маркеры ответа на блокаторы контрольных точек иммунного ответа. Сибирский онкологический журнал. 2020. 19(4). 123-131. <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2020-19-4-123-131>.
3. Abdelfattah Sh., Haseeb A., Tawfik M., Khalil D., Attia D. Soluble CD25 as a predictor of hepatocellular carcinoma compared with alpha-fetoprotein. Clin Exp Hepatol. 2019. 5(2). 140–146. <https://doi.org/10.5114/ceh.2019.85165>.
4. Kim J.O., Kim H.W., Baek K.M., Kang C.Y. NF-kappaB and AP-1 regulate activation-dependent CD137 (4-1BB) expression in T cells. FEBS Lett. 2003. 541(1). 163-170. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00326-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00326-0)
5. Seliger B., Marincola F., Ferrone S., Abken H. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. Trends Mol Med. 2008. 14(12). 550–559. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.09.010>.
6. Boguslawska J., Krys P., Poletajew S., Piekietko-Witkowska A. TGF-β and microRNA Interplay in Genitourinary Cancers. Cells. 2016. 8(12). 1619. <https://doi.org/10.3390/cells8121619>.
7. Четверяков А.В., Цепелев В.Л. Роль мембранного белка Т-лимфоцитов CTLA-4 в регуляции иммунитета иммунотерапии опухолей. Забайкальский медицинский вестник. 2020. 4. 206-214. Доступно: <http://zabmedvestnik.ru/arhiv-nomerov/nomer-4-za-2020-god/rol-membrannogo-belka-t-limfocitovctla-4v-reguljacii-immuniteta-iimmunoterapii-opuholej>.
8. Hu Sh., Pu D., Xia X., Guo B., Zhang Ch. CTLA-4 rs5742909 polymorphism and cervical cancer risk. A meta-analysis [Internet]. Medicine (Baltimore). 2020. 99(11). e19433. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000019433>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32176070/>
9. Kosmaczewska A., Bocko D., Ciszak L., Wlodarska-Polinska I., Kornafel J., Szeblich A., Masternak A., Frydecka I. Dysregulated Expression of Both the Costimulatory CD28 and Inhibitory CTLA-4 Molecules in PB T Cells of Advanced Cervical Cancer Patients Suggests Systemic Immunosuppression Related to Disease Progression. Pathol Oncol Res. 2012. 18(2). 479–489. <https://doi.org/10.1007/s12253-011-9471-y>.
10. Meng Y., Liang H., Hu J., Liu Sh., Hao X., Wong M., Li X., Hu L. PD-L1 Expression Correlates With Tumor Infiltrating Lymphocytes And Response To Neoadjuvant Chemotherapy In Cervical Cancer. J Cancer. 2018. 9(16). 2938-2945. <https://doi.org/10.7150/jca.22532>
11. Mezache L., Paniccia B., Nyinawabera A., Nuovo G. Enhanced expression of PD L1 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancers. Modern Pathology. 2015. 28(12). 1594–1602. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.108>.
12. Yan J., Zhang Y., Zhang J., Liang J., Li L., Zheng L. Tim-3 Expression Defines Regulatory T Cells in Human Tumors. PLoS One. 2013. 8(3). e58006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058006>. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3589491>.

13. Panda A., Rosenfeld J., Singer A., Bhanot G, Ganesan Sh. Genomic and immunologic correlates of LAG-3 expression in cancer. *Oncoimmunology*. 2020. 9(1). e1756116. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1756116>. Available from:
14. Wang L., Zhao Y., Wang Y., Wu X. The Role of Galectins in Cervical Cancer Biology and Progression. *Biomed Res Int*. 2018. 2018. e2175927. <https://doi.org/10.1155/2018/2175927>.
15. Starzer A., Berghoff A. New emerging targets in cancer immunotherapy: CD27 (TNFRSF7). *ESMO Open*. 2019; 4 (3): e000629. <https://doi.org/10.1136/esmooopen-2019-000629>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32152062>.
16. Marinelli O., Annibali D., Morelli M., Zeppa L., Tuyaerts S., Aguzzi C., Amantini C., Maggi F., Ferrett B., Santoni G., Amant F., Nabissi M. Biological Function of PD-L2 and Correlation With Overall Survival in Type II Endometrial Cancer. *Front Oncol*. 2020. 10. 538064. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.538064>
17. Bartkowiak T., Curran M. 4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity. *Front Oncol*. 2015. 5(117): e 2015. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00117>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26106583>.
18. Gutiérrez-Hoya A., Zerecero-Carreón O., Valle-Mendiola A. [et al.] Cervical Cancer Cells Express Markers Associated with Immunosurveillance. *J Immunol Res*. 2019. e1242979. <https://doi.org/10.1155/2019/1242979>. Available from:
19. Cao Y., Zhou X., Huang X., Moreno-Lafont M., López-Santiago R., Weiss-Steider B., Soto-Cruz I. Tim-3 Expression in Cervical Cancer Promotes Tumor Metastasis. *PLoS One*. 2013. 8(1). e53834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053834>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31198791>.
20. Zhang L., Tian S., Zhao M., Yang T., Quan Sh., Yang Q., Song L., Yang X. SUV39H1-DNMT3A-mediated epigenetic regulation of Tim-3 and galectin-9 in the cervical cancer. *Cancer Cell Int*. 2020. 20(325). <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01380-y>. Available from: <https://cancerbiomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-020-01380-y>.

### References:

1. Hohlova S.V. Immunotherapy for patients with cervical cancer. *Jeffektivnaja farmakoterapija*. 2015. 15(24). 20–26. <https://doi.org/10.33978/2307-3586-2019-15-24-20-26>. in Russian.
2. Janus G.A., Ievleva A.G., Suspitsyn E.N., Tyurin V.I., Bizin I.V., Gorustovich O.A., Ni V.I., Kholmatov M.M., Laidus T.A., Chuynyshena S.A., Aleksakhina S.N., Imyanitov E.N. PREDICTIVE RESPONSE MARKERS FOR IMMUNE RESPONSE BLOCKS. *Siberian journal of oncology*. 2020.19(4).123-131. <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2020-19-4-123-131>. in Russian.
3. Abdelfattah Sh., Haseeb A., Tawfik M., Khalil D., Attia D. Soluble CD25 as a predictor of hepatocellular carcinoma compared with alpha-fetoprotein. *Clin Exp Hepatol*. 2019. 5(2). 140–146. <https://doi.org/10.5114/ceh.2019.85165>.
4. Kim J.O., Kim H.W., Baek K.M., Kang C.Y. NF-kappaB and AP-1 regulate activation-dependent CD137 (4-1BB) expression in T cells. *FEBS Lett*. 2003. 541(1). 163-170. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00326-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00326-0)
5. Seliger B., Marincola F., Ferrone S., Abken H. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. *Trends Mol Med*. 2008. 14(12). 550–559. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.09.010>.
6. Boguslawska J., Krys P., Poletajew S., Piekielko-Witkowska A. TGF-β and microRNA Interplay in Genitourinary Cancers. *Cells*. 2016. 8(12). 1619. <https://doi.org/10.3390/cells8121619>.
7. Chetveryakov A.V., Tsepelev V.L. Role of the T-lymphocyte membrane protein CTLA-4 in regulating immunity and immunotherapy of tumor. *Zabajkal'skij medicinskij vestnik*. 2020. 4. 206-214. Available from: <http://zabmedvestnik.ru/arhiv-nomerov/nomer-4-za-2020-god/rol-membrannogo-belka-t-limfocitovctla-4v-reguljicii-immuniteta-iimmunoterapii-opuholej>. in Russian.

8. Hu Sh., Pu D., Xia X., Guo B., Zhang Ch. CTLA-4 rs5742909 polymorphism and cervical cancer risk. A meta-analysis [Internet]. *Medicine (Baltimore)*. 2020. 99(11). e19433. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000019433>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32176070/>
9. Kosmaczewska A., Bocko D., Ciszak L., Wlodarska-Polinska I., Kornafel J., Szteblich A., Masternak A., Frydecka I. Dysregulated Expression of Both the Costimulatory CD28 and Inhibitory CTLA-4 Molecules in PB T Cells of Advanced Cervical Cancer Patients Suggests Systemic Immunosuppression Related to Disease Progression. *Pathol Oncol Res*. 2012. 18(2). 479–489. <https://doi.org/10.1007/s12253-011-9471-y>.
10. Meng Y., Liang H., Hu J., Liu Sh., Hao X., Wong M., Li X., Hu L. PD-L1 Expression Correlates With Tumor Infiltrating Lymphocytes And Response To Neoadjuvant Chemotherapy In Cervical Cancer. *J Cancer*. 2018. 9(16). 2938-2945. <https://doi.org/0.7150/jca.22532>
11. Mezache L., Paniccia B., Nyinawabera A., Nuovo G. Enhanced expression of PD L1 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancers. *Modern Pathology*. 2015. 28(12). 1594–1602. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.108>.
12. Yan J., Zhang Y., Zhang J., Liang J., Li L., Zheng L. Tim-3 Expression Defines Regulatory T Cells in Human Tumors. *PLoS One*. 2013. 8(3). e58006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058006>. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3589491>.
13. Panda A., Rosenfeld J., Singer A., Bhanot G, Ganesan Sh. Genomic and immunologic correlates of LAG-3 expression in cancer. *Oncoimmunology*. 2020. 9(1). e1756116. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1756116>. Available from:
14. Wang L., Zhao Y., Wang Y., Wu X. The Role of Galectins in Cervical Cancer Biology and Progression. *Biomed Res Int*. 2018. 2018. e2175927. <https://doi.org/10.1155/2018/2175927>.
15. Starzer A., Berghoff A. New emerging targets in cancer immunotherapy: CD27 (TNFRSF7). *ESMO Open*. 2019; 4 (3): e000629. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2019-000629>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32152062>.
16. Marinelli O., Annibali D., Morelli M., Zeppa L., Tuyaeerts S., Aguzzi C., Amantini C., Maggi F., Ferrett B., Santoni G., Amant F., Nabissi M. Biological Function of PD-L2 and Correlation With Overall Survival in Type II Endometrial Cancer. *Front Oncol*. 2020. 10. 538064. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.538064>
17. Bartkowiak T., Curran M. 4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity. *Front Oncol*. 2015. 5(117): e 2015. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00117>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26106583>.
18. Gutiérrez-Hoya A., Zerecero-Carreón O., Valle-Mendiola A. [et al.] Cervical Cancer Cells Express Markers Associated with Immunosurveillance. *J Immunol Res*. 2019. e1242979. <https://doi.org/10.1155/2019/1242979>. Available from:
19. Cao Y., Zhou X., Huang X., Moreno-Lafont M., López-Santiago R., Weiss-Steider B., Soto-Cruz I. Tim-3 Expression in Cervical Cancer Promotes Tumor Metastasis. *PLoS One*. 2013. 8(1). e53834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053834>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31198791>.
20. Zhang L., Tian S., Zhao M., Yang T., Quan Sh., Yang Q., Song L., Yang X. SUV39H1-DNMT3A-mediated epigenetic regulation of Tim-3 and galectin-9 in the cervical cancer. *Cancer Cell Int*. 2020. 20(325). <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01380-y>. Available from: <https://cancerbiomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-020-01380-y>.