© Коллектив авторов, 2020

Новиков В.В.^{1,2}, Шумилова С.В.¹, Новиков Д.В.^{1,2}, Алясова А.В.³,
Евсегнеева И.В.⁴, Караулов А.В.⁴

Альтернативные варианты мРНК альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 при раке толстой кишки

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Нижегородский национальный исследовательский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 603950, г. Нижний Новгород, Российская Федерация

² Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 603950, г. Нижний Новгород, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Нижегородский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 603005, г. Нижний Новгород, Российская Федерация

⁴ Федеральное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Альфа-цепь рецептора интерлейкина (ИЛ)-2 кодируется полноразмерной мРНК, имеющей несколько делетированных альтернативных вариантов, функция которых неизвестна. Получение информации о встречаемости альтернативных вариантов мРНК α -цепи IL-2R при раке толстой кишки поможет установить их роль в механизмах противоопухолевого иммунитета.

Цель исследования – определить в крови здоровых лиц и в крови и опухолях пациентов с раком толстой кишки содержание растворимых молекул CD25, полноразмерную форму мРНК IL-2R α (мРНК CD25), кодирующую функционально активную α -цепь рецептора, и формы с делецией 4-го экзона (мРНК CD25Exo4Del) и делецией 4-го и 5-го экзонов (мРНК CD25Exo4-5Del), кодирующие белок, неспособный связывать ИЛ-2 из-за отсутствия 4-го экзона. Сопоставить экспрессию альтернативных вариантов мРНК IL-2R α с экспрессией генов, кодирующих CD38, ICAM-1, Fas и ряд раково-тестикулярных антигенов (MAGEA1-MAGEA6, CT7 (MAGEC1), GAGE1-GAGE8, NY-ESO-1, SSX1,2,4, TRAG3 и XAGE1).

Материал и методы. В работе использованы 49 образцов опухоли и 10 образцов периферической крови пациентов с раком толстой кишки. Исследование проведено методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. Показано, что три альтернативных варианта мРНК IL-2R α присутствуют в крови как здоровых лиц, так и пациентов с раком толстой кишки. В опухолях альтернативные варианты мРНК IL-2R α встречались с различной частотой. Чаще всего обнаруживалась мРНК полноразмерной формы, с промежуточной частотой – мРНК CD25Exo4Del и реже всего – мРНК CD25Exo4-5Del. Наблюдалась тенденция к снижению частоты выявления мРНК CD25Exo4-5Del на поздних стадиях заболевания. Выявлено повышение частоты экспрессии ICAM-1 в опухолях, не содержащих мРНК CD25Exo4-5Del, и увеличение уровня растворимых молекул CD25 в сыворотке крови при отсутствии в опухоли мРНК CD25Exo4Del.

Заключение. Установлена регуляторная роль продуктов делетированных форм мРНК IL-2R α , приводящая к активации регуляторных Т-клеток, усилению иммуносупрессии и прогрессии опухолевого роста.

Ключевые слова: альфа-цепь рецептора интерлейкина-2; альтернативные варианты мРНК; рак толстой кишки; регуляторные Т-клетки

Статья поступила 14.01.2020. Принята в печать 20.02.2020.

Для цитирования: Новиков В.В., Шумилова С.В., Новиков Д.В., Алясова А.В., Евсегнеева И.В., Караулов А.В. Альтернативные варианты мРНК альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 при раке толстой кишки. Иммунология. 2020; 41 (2): 144–153. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-144-153

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Иммунология ■ Том 41 ■ № 2 ■ 2020

Для корреспонденции
Караулов Александр Викторович –
академик РАН,
доктор медицинских наук,
профессор, заведующий кафедрой
клинической иммунологии
и аллергологии
ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова
Минздрава России
(Сеченовский Университет),
Москва, Российская Федерация
E-mail: drkaraulov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

Novikov V.V.^{1,2}, Shumilova S.V.¹, Novikov D.V.^{1,2}, Alyasova A.V.³, Evsegneeveva I.V.⁴,
Karaulov A.V.⁴

Alternative variants of interleukin-2 receptor alpha chain mRNA in colon cancer

¹ Lobachevsky University of Nizhny Novgorod, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, 603950, Nizhny Novgorod, Russian Federation

² I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), 603950, Nizhny Novgorod, Russian Federation

³ Nizhny Novgorod Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 603005, Nizhny Novgorod, Russian Federation

⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 119991, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. The alpha chain of the interleukin-2 receptor is encoded by a full-length mRNA which has several alternatively spliced variants whose function is unknown. Information on the occurrence of alternatives to mRNA alpha chain IL-2R in colon cancer help establish their role in antitumor immunity mechanisms.

The aim of the study was to detect the content of soluble CD25 molecules, a full-length form of IL-2Rα mRNA (CD25 mRNA) encoding a functionally active receptor alpha-chain and a form with 4 exon deletion (CD25Exo4Del mRNA) and 4 and 5 exons deletion (CD25Exo4-5Del mRNA) encoding a protein unable to bind interleukin-2. In the blood of healthy individuals and in the blood and tumors of colon cancer patients and compare the expression of IL-2Rα mRNA alternative forms with an expression of the genes coding CD38, ICAM-1, Fas and several cancer-testicular antigens (MAGEA1-MAGEA6, CT7 (MAGEC1), GAGE1-GAGE8, NY-ESO-1, SSX1, 2, 4, TRAG3 and XAGE1) expression.

Material and methods. 49 tumor samples and 10 peripheral blood samples of colon cancer are used in the work. The study was carried out by a reverse transcription polymerase chain reaction.

Results. It was shown that three alternative forms of mRNA IL-2Rα present in the blood of both healthy individuals and patients with colon cancer. In tumors, alternative mRNAs of IL-2Rα were detected with different frequencies. Full-length mRNA was detected most often, CD25Exo4Del mRNA – with an intermediate frequency and CD25Exo4-5Del mRNA – most rarely. There was a tendency to decrease the frequency of CD25Exo4-5Del mRNA detection in the late stages of the disease. ICAM-1 expression frequency in mRNA CD25Exo4-5Del negative tumors was increased, and soluble CD25 molecules serum level in the absence of CD25Exo4Del mRNA in tumor was also increased.

Conclusion. The regulatory role of IL-2Rα mRNA deleted forms products leading to regulatory T cells activation, immunosuppression increasing and tumor growth progression was established.

Keywords: interleukin-2 receptor alpha-chain; mRNA alternative variants; colon cancer; regulatory T cells

Received 14.01.2020. Accepted 20.02.2020.

For citation: Novikov V.V., Shumilova S.V., Novikov D.V., Alyasova A.V., Evsegneeveva I.V., Karaulov A.V. Alternative variants of interleukin-2 receptor alpha chain mRNA in colon cancer. *Immunologiya*. 2019; 41 (2): 144–53. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-144-153 (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

For correspondence

Alexander V. Karaulov –
Academician of RAS,
MD, Professor,
Head of the Department of Clinical
Immunology and Allergology
of I.M. Sechenov First Moscow State
Medical University,
Ministry of Healthcare of the
Russian Federation
(Sechenov University), Moscow,
Russian Federation
E-mail: drkaraulov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

Введение

Хорошо известно, что канцерогенез характеризуется многочисленными изменениями генома и транскриптома опухолевых клеток. В то же время на развитие опухоли принципиальным образом влияет состояние иммунитета, в частности популяционный состав и функ-

циональная активность клеток иммунной системы, инфильтрирующих опухоль. Присутствующие в опухоли лимфоциты гетерогенны по популяционному составу и функциональной нагрузке. Все большее значение отводится субпопуляции регуляторных Т-клеток (Treg), угнетающих иммунный ответ хозяина на антигены

опухоли. Одним из маркеров Трег служит мембранная молекула CD25, которая является α -цепью рецептора интерлейкина (ИЛ)-2 и с высокой плотностью представлена на поверхности Трег. Кроме этой популяции лимфоцитов, молекула CD25 экспрессируется на мембране других популяций активированных лимфоцитов и моноцитов, но с гораздо меньшей плотностью. Имеются также сообщения о присутствии молекулы CD25 на мембране опухолевых клеток [1].

Рецептор ИЛ-2 (IL-2R), обладающий высокой аффинностью, построен из α -, β - и γ -цепей и при связывании ИЛ-2 передает в клетку сигнал к пролиферации. Показано существование ряда альтернативных форм матричной РНК α -субъединицы IL-2R (CD25) [2, 3]. Полноразмерная форма кодирует α -цепь, связывающуюся с ИЛ-2, формы с делецией 4-го экзона способны кодировать α -цепи, не связывающие ИЛ-2 [4]. Ранее нами были разработаны методы, позволяющие определять полноразмерную мРНК IL-2R α (CD25), форму с делецией 4-го экзона (мРНК CD25Exo4Del) и форму с делецией 4-го и 5-го экзонов (мРНК CD25Exo4-5Del) [5]. В доступной научной литературе отсутствует информация о встречаемости альтернативных вариантов мРНК α -цепи IL-2R в опухолях и роли их продуктов в механизмах противоопухолевого иммунитета, их влиянии на развитие новообразований, в том числе при раке толстой кишки.

Целью настоящей работы является изучение роли альтернативных вариантов мРНК α -субъединицы IL-2R в патогенетических механизмах развития рака толстой кишки.

Материал и методы

В исследование были включены 49 образцов опухоли и 10 образцов периферической крови пациентов с раком толстой кишки в возрасте от 45 до 84 лет, проходивших лечение в хирургическом отделении ГБУЗ Нижегородской области «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко», а также 10 образцов пери-

ферической крови сопоставимых по возрасту здоровых добровольцев, полученных в клинических лабораториях городских больниц №34 и №5 (Нижний Новгород). Исследования проводились в соответствии с этическими нормами, с письменного информированного согласия пациентов и добровольцев, выполнялись строго в рамках Хельсинкской декларации ВМА 2000 г. и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Группы пациентов формировали после постановки диагноза на основании клинического, морфологического, эндоскопического, рентгенологического обследования и по результатам оперативного вмешательства. Пациенты были разделены на группы в соответствии со стадией заболевания, локализацией опухоли, степенью дифференцировки клеток опухоли, наличием или отсутствием метастазов (табл. 1).

Работа с кровью и образцами опухолей проводилась по международным правилам работы с биологическим материалом. Кровь брали натощак утром в день операции. Кусочки опухоли размером 2,0 × 2,0 × 2,0 мм иссекали в ходе плановых операций, промывали в физиологическом растворе, помещали в микропробирки, содержащие 500 мкл лизирующего буферного раствора (6 М гуанидинизотиония, 1 % Тритон X-100, 100 мМ ацетат Na, pH 7,0) и хранили при температуре -20 °C до использования. Исследовали также образцы периферической крови, смешанные с лизирующим буферным раствором в соотношении 1 : 1.

Сывороточный уровень суммарной и мономерной фракций растворимых молекул CD25 определяли в соответствии с предложенными ранее методами [6, 7].

Суммарную РНК из клеток выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с последующей преципитацией спиртами [8]. При анализе мРНК IL-2R α синтез кДНК на матрице мРНК и детекцию вариантов сплайсинга мРНК проводили с использованием разработанных ранее праймеров [5]. В качестве стандартных параметров полимеразной цепной реакции (ПЦР) были приняты следующие условия. Первоначальный прогрев

Таблица 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Клинико-морфологический параметр		Количество образцов (n = 49)
Стадия заболевания	I	10 (20 %)
	II	25 (51 %)
	III	9 (18 %)
	IV	5 (10 %)
Локализация опухоли	Восходящая, поперечная и нисходящая ободочная кишка	10 (20 %)
	Сигмовидная кишка	6 (12 %)
	Ректосигмоидный отдел	7 (14 %)
	Прямая кишка	21 (43 %)
Степень дифференцировки опухоли	Не установлена	5 (14 %)
	Высокая	6 (12 %)
	Умеренная	35 (71 %)
	Низкая	4 (8 %)
Метастазы	Не установлена	4 (8 %)
	Присутствуют	16 (33 %)
	Отсутствуют	33 (67 %)

смеси проводили 1 мин при 94 °С, денатурацию ДНК – 30 сек при 94 °С, элонгацию – 45 сек при 72 °С, окончательную достройку цепей – 5 мин при 72 °С. Количество циклов для первого раунда ПЦР составило 40, для второго – 30. Электрофорез продуктов амплификации проводили в агарозном геле. Учет результатов осуществляли с помощью системы видеодокументирования Vilber Lourmat (Франция).

Для детекции мРНК Fas в реакции обратной транскрипции в качестве затравки использовали олигонуклеотид GR-20 (табл. 2). Детекцию вариантов сплайсинга мРНК Fas проводили методом ПЦР в два раунда. В первом раунде ПЦР использовали праймеры 1F и GR-20 и следующие условия: 35 × (94 °С – 30 сек, 55 °С – 30 сек, 72 °С – 45 сек). При детекции мРНК mFas, Fas del 5, Fas del 4, Fas del 3,4 второй раунд ПЦР проводили с комбинацией праймеров 1F и А. Для обнаружения мРНК sFas, Fas del 4,6, Fas del 3,4,6 во втором раунде ПЦР применяли праймеры 1F и Б. Условия второго раунда ПЦР: 25 × (94 °С – 30 сек, 60 °С – 30 сек, 72 °С – 45 сек).

Обратную транскрипцию мРНК CD38 проводили с использованием праймера CD38-R1. Полученную кДНК амплифицировали в двухраундовой ПЦР. В первом раунде ПЦР использовали праймеры CD38-F1 и CD38-R1 и следующие температурные условия: 94 °С – 30 сек, (94 °С – 30 сек, 57 °С – 30 сек, 72 °С – 45 сек) × 35, 72 °С – 5 мин. Второй раунд ПЦР для одновременной детекции двух форм мРНК CD38 (CD38 и CD38Exo3Del) проводили с праймерами CD38-F2 и CD38-R2 при следующих температурных условиях: 94 °С – 30 сек, (94 °С – 30 сек, 62 °С – 30 сек, 72 °С – 45 сек) × 25, 72 °С – 5 мин.

Синтез кДНК ICAM-1 проводили в реакции обратной транскрипции с праймером R1700. Две альтернативные формы мРНК ICAM-1 определяли с использованием общего прямого праймера F1220. Обратный праймер для детекции мРНК мембранной формы ICAM-1 – R22, для детекции мРНК растворимой формы sICAM-1 – TMR. Детекцию матричной РНК осуществляли в ПЦР при следующих условиях: 94 °С – 30 сек, (94 °С – 30 сек, 66 °С – 45 сек, 72 °С – 60 сек) × 50, 72 °С – 5 мин.

При детекции мРНК раково-тестикулярных генов в качестве затравки в реакции обратной транскрипции применяли смесь олигонуклеотидов, специфичных для мРНК MAGEA1-MAGEA6, CT7 (MAGEC1), GAGE1-GAGE8, NY-ESO-1, SSX1,2,4 и XAGE1, обозначенных R1 (табл. 2). Полученные образцы кДНК амплифицировали, используя метод ПЦР в два раунда для раздельного выявления мРНК каждого из семейств исследуемых белков. Для каждой из тестируемых мРНК проводили 35 циклов первой и 25 циклов второй ПЦР при следующих условиях: 94 °С – 30 сек, 55 °С – 30 сек, 72 °С – 30 сек. Для обнаружения мРНК PAGE1 в первом раунде ПЦР использовали праймеры P-F1 и G-R1, во втором – G-F2 и G-R2. При детекции мРНК TRAG3 в обоих раундах ПЦР применяли прямой праймер T-F [9–11].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica v. 8.0. Анализ

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры для детекции мРНК генов дифференцировочных молекул и раково-тестикулярных генов

Ген	Первичная структура праймеров (5' - 3')
Fas	GR-20: GGATTTAAGGTTGGAGATTCA
	1F: ATCCTGGGCATCTGGACCCT
	A: TTCCTTTCTCTTCACCCAA
	Б: TTCCTTTCTCTTCACTTCC
CD38	CD38-R1: AAGAAACTTgTCAgTCTgT
	CD38-F1: CTATGGCCAACTGCGAGTTC
	CD38-F2: ATGAGACATGTAGACTGCCA
	CD38-R2: ATCCATTGAGCATCACATGG
ICAM-1	R1700: TGTTCAGTGTGGCACCCTG
	F1220: GAGCTTCGTGTCCTGTATGG
	R22: CTCATACCGGGGGGAGAGCA
	TMR: CTCATACCGGGGGGCTCGCG
MAGEA1-6	MMRP1: ACTGAAGGAGAAGATCTGCC
	MA-R1: GTGCTTGGCCCCCTCTCTTC
	MA-F2: AGGAGAAGATCTGCCWGTGG*
	MA-R2: CTGGAGGCTCCCTGAGGACT
SSX1, 2, 4	SSX-F1: GAGAAGTCCGAAAGGCCTT
	SSX-R1: TTCTTGGGCATGATCTTCGGG
	SSX-F2: AGGTTATGACTAACTAGGT
	SSX-R2: AAGTCATCTGAGGACGTTCA
XAGE1	X-F1: CTACTGAGACACGGCGGACA
	X-R1: TTGTTTCAGCTTGCTTTCAT
	X-F2: ATACAGCTGAGATCCCAGTG
	X-R2: TTGTGGTTGCTCTTCACCTG
NY-ESO-1	NY-F1: AGAGCCGCCTGCTTGAGTTC
	NY-R1: TCTGCAGCAGTCAGTCGGAT
	NY-F2: CCTGCTTGAGTTCTACCTCG
	NY-R2: GCAGTCAGTCGGATAGTCAG
GAGE1-8	G-F1: ATTGGGCCTATGCGGCCCGA
	G-R1: TCCAACAYAGGAGCAGCCTG*
	G-F2: AGCATCTGCAGSTCAAGGGC*
	G-R2: TCTTTTAACTGTGATTGC
PAGE1	P-F1: CGTAGACCAATGATCTATGT
CT7	C-F1: CCTATCCAGTCTTCAAGGTG
	C-R1: CAGGACAACCTCTGAGGACTC
	C-F2: AGTGCCAGGAGTCAAGGTTTC
	C-R2: GCATATCCTTGTCCCCCATG
TRAG3	T-F: AGAAGCCCTATCAAAGTTCC
	T-R1: TTGTGGTCCCGCTATGGCTC
	T-R2: TCGTTCCGGCTGGTCAGAGTG

Примечание. * – для обозначения вырожденных оснований использован общепринятый код: S – C/G, W – T/A, Y – T/C.

различий относительных частот обнаружения мРНК в группах проводили с использованием статистического критерия сравнения пропорций. Для представления исследованных количественных показателей были использованы медиана, 25 и 75 процентиля. Межгрупповой анализ количественных показателей проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. При анализе качественных и количественных признаков различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Рис. 1. Частота выявления альтернативных форм мРНК IL-2Rα в образцах опухолевых очагов пациентов с раком толстой кишки

* – статистически значимые различия по сравнению с частотой выявления мРНК CD25 ($p = 0,002$); ** – статистически значимые различия по сравнению с частотой выявления мРНК CD25Exo4Del ($p = 0,032$).

Результаты

Во всех тестируемых образцах периферической крови здоровых доноров и пациентов с раком толстой кишки были обнаружены три альтернативных варианта мРНК α-цепи рецептора ИЛ-2: полноразмерная форма (мРНК CD25), форма с делецией 4-го экзона (мРНК CD25Exo4Del) и форма с делецией 4-го и 5-го экзонов (мРНК CD25Exo4-5Del). Результаты соответствуют литературным данным, полученным ранее при исследовании клеток крови здоровых лиц [12]. При анализе образцов опухолей пациентов с раком толстой кишки обнаружена другая картина. Полноразмерная форма мРНК CD25 была выявлена в 98 % случаев (48 из 49 пациентов) (рис. 1). У пациента без данной формы мРНК CD25 была диагностирована умереннодифференцированная аденокарцинома сигмовидной кишки II стадии.

В одном из тестируемых образцов опухолевых очагов пациентов с раком толстой кишки присутствовала только полноразмерная форма мРНК CD25. У данного пациента была диагностирована низкодифференцированная аденокарцинома восходящего отдела ободочной кишки III стадии развития, обнаружено метастазирование. Матричная РНК с делецией 4-го экзона была детектирована в 92 % тестируемых образцов (45 из 49 пациентов) (см. рис. 1). Четыре пациента, в опухолевых очагах которых не была выявлена мРНК CD25Exo4Del, характеризовались различной локализацией опухолевого процесса (рак прямой кишки, рак сигмовидной кишки, рак восходящего отдела ободочной кишки), степенью дифференцировки опухоли – от низкой до высокой, и стадиями заболевания – от I до III. Три пациента из четырех подверглись операции Гартмана. К моменту операции у них не было обнаружено метастазов. У одного пациента без мРНК CD25Exo4Del были детектированы метастазы. Вариант сплайсинга мРНК IL-2Rα без экзонов 4 и 5 в исследуемых образцах обнаружен в 76 % случаев (37 из 49 пациентов). Частота детекции

этого варианта мРНК статистически значимо ниже, чем частота детекции полноразмерной формы мРНК ($p = 0,002$) и формы мРНК CD25Exo4Del ($p = 0,032$).

Три тестируемые альтернативные формы мРНК IL-2Rα встречались в опухолях пациентов с раком толстой кишки на всех четырех стадиях заболевания (табл. 3). Полноразмерная форма мРНК CD25 в 100 % случаев выявлена в клетках опухолевых очагов на I, III и IV стадиях. В группе пациента со II стадией рака толстой кишки у одного пациента полноразмерная мРНК отсутствовала. Сплайсинговый вариант мРНК с делецией 4-го экзона в 100 % случаев обнаружен только у пациентов с раком толстой кишки IV стадии. На первых трех стадиях этот вариант мРНК выявлен в 89–92 % случаев. На всех стадиях рака толстой кишки мРНК CD25Exo4-5Del обнаружена с меньшей частотой. На первых трех стадиях частота ее выявления варьировала от 70 до 89 %, а на IV стадии эта форма была определена лишь у двух из пяти тестируемых пациентов (40 %). Различия в частоте обнаружения данной формы мРНК в сравнении с другими на каждой из стадий были статистически недостоверны, что, вероятно, связано с небольшим числом тестируемых пациентов. Тем не менее, наблюдалась выраженная тенденция к уменьшению частоты выявления мРНК CD25Exo4-5Del по сравнению с мРНК CD25 и мРНК CD25Exo4Del на каждой стадии заболевания.

Различия в локализации первичного опухолевого узла и гистологическом типе опухоли не сопровождались изменениями частоты встречаемости альтернативных форм мРНК CD25 и CD25Exo4Del (табл. 3). Однако наблюдались статистически значимые различия в частоте обнаружения мРНК CD25Exo4-5Del. Она чаще встречалась в опухолевых очагах, локализованных в прямой кишке, чем в ректосигмоидном отделе ($p = 0,012$) и сигмовидной кишке ($p = 0,037$).

При сравнении встречаемости трех форм мРНК IL-2Rα в клетках опухолевых очагов между группами пациентов с наличием и отсутствием метастазов статистически значимых различий не обнаружено. Однако наблюдалась тенденция к уменьшению частоты обнаружения мРНК в ряду «CD25 – CD25Exo4Del – CD25Exo4-5Del» у пациентов как с метастазами, так и без них. Частота выявления полноразмерной формы мРНК CD25 была статистически значимо выше, чем частота обнаружения формы мРНК с делецией экзонов 4 и 5 ($p = 0,041$ и $p = 0,015$ соответственно) (см. табл. 3).

Хорошо известно, что ген, кодирующий IL-2Rα, является активационным, т.е. его экспрессия значительно повышается в активированных клетках, потенциально способных к пролиферации. Сходным образом ведут себя гены, кодирующие молекулы CD38, ICAM-1 и Fas [13–15]. Для изучения связи между экспрессией гена IL-2RA и генов дифференцировочных молекул CD38, ICAM-1 и Fas была проанализирована экспрессия данных генов в опухолях пациентов, содержащих и не содержащих мРНК CD25Exo4-5Del. В анализ были взяты не только полноразмерные формы мРНК CD38

Таблица 3. Частота обнаружения альтернативных форм мРНК IL-2Ra в опухолях пациентов раком толстой кишки

Характеристика заболевания		мРНК					
		CD25		CD25Exo4Del		CD25Exo4-5Del	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Стадия заболевания	I	10/10	100	9/10	90	7/10	70
	II	24/25	96	23/25	92	20/25	80
	III	9/9	100	8/9	89	8/9	89
	IV	5/5	100	5/5	100	2/5	40
Локализация опухоли	Восходящая, поперечная и нисходящая ободочная кишка	10/10	100	8/10	80	7/10	70
	Сигмовидная кишка	5/6*	83	5/6*	83	3/6	50
	Ректосигмоидный отдел	7/7*	100	7/7*	100	5/7	41
	Прямая кишка	21/21	100	19/21	90	19/21	90
Гистологическая форма	Высокодифференцированная	6/6	100	5/6	83	4/6	67
	Умеренно-дифференцированная	34/35*	97	33/35*	94	27/35	77
	Низкодифференцированная	4/4	100	3/4	75	3/4	75
Метастазы	Есть	16/16 *	100	15/16	94	12/16	75
	Нет	32/33*	97	30/33	91	25/33	76

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с частотой выявления мРНК CD25Exo4-5Del ($p < 0,05$).

и ICAM-1 и Fas, но и делетированные варианты мРНК их генов, представленные в табл. 4 [16–19].

Частота обнаружения семи альтернативных форм мРНК Fas, двух форм мРНК CD38 и мРНК ICAM-1 незначительно варьировала между группами пациентов, содержащих и не содержащих мРНК CD25Exo4-5Del в опухолевом очаге. Тем не менее, мРНК ICAM-1 встречалась в 2,1 раза чаще в опухолях, содержащих мРНК CD25Exo4-5Del, чем в CD25Exo4-5Del-негативных опухолях ($p < 0,001$) (см. табл. 4). В соответствии с этим, в опухолях, позитивных по мРНК ICAM-1, чаще, чем в негативных по мРНК ICAM-1, выявлялись мРНК CD25 и CD25Exo4-5Del ($p = 0,032$ и $p < 0,001$) (табл. 5). Показано, что при раке толстой кишки повышенный уровень экспрессии ICAM-1 клетками опухолей ассоциирован с высокодифференцированными новообразованиями, а также с высокой восприимчивостью к лизису цитотоксическими Т-лимфоцитами

[20, 21]. Таким образом, наличие мРНК CD25Exo4-5Del в опухолевых очагах пациентов с раком толстой кишки можно рассматривать как свидетельство благоприятного течения заболевания.

Различий экспрессии раково-тестикулярных генов в опухолевых очагах, содержащих и не содержащих различные варианты мРНК IL-2Ra, не обнаружено (данные не представлены). Наряду с определением мРНК в опухолевых очагах пациентов с раком толстой кишки проведено определение содержания суммарной и олигомерной фракций растворимой молекулы CD25 (sCD25) в сыворотке крови пациентов (табл. 6). Статистически значимых различий содержания суммарной фракции sCD25 в сыворотке крови пациентов с наличием и отсутствием в опухолевых очагах альтернативных форм мРНК IL-2Ra не обнаружено. Статистически значимые различия отсутствовали также при сравнении со здоровыми донорами крови. Результаты указывают на то, что

Таблица 4. Частота обнаружения мРНК дифференцировочных генов в опухолях пациентов с раком толстой кишки

мРНК дифференцировочных генов	мРНК CD25Exo4-5Del			
	присутствует		отсутствует	
	абс.	%	абс.	%
CD38	24/36	67	7/10	70
CD38Exo3Del	10/36	28	2/10	20
ICAM-1	35/37*	95	5/11	45
sICAM-1	11/37	30	3/11	27
mFas	37/37	100	12/12	100
Fas del 5	8/37	22	5/12	42
Fas del 4	10/37	27	3/12	25
Fas del 3, 4	33/37	89	11/12	92
sFas	36/37	97	11/12	92
Fas del 4, 6	17/37	46	7/12	58
Fas del 3, 4, 6	33/37	89	8/12	67

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с частотой обнаружения мРНК ICAM-1 в CD25Exo4-5Del-негативных опухолях ($p < 0,001$).

особенности экспрессии гена *IL2RA* в опухолевых очагах не отражаются на содержании в сыворотке крови суммарной фракции молекул sCD25, которые, как известно, являются продуктом посттрансляционной модификации белка, образуются путем протеолитического срезания с клеточной мембраны и способны поступать в кровоток, где выполняют супрессорную функцию [22]. Однако в сыворотке крови пациентов, в опухолевых очагах которых не определялась мРНК CD25Exo4Del, выявлена выраженная, хотя и статистически не значимая, тенденция к повышению содержания олигомерной фракции молекул sCD25 в сравнении с пациентами, в опухолевых очагах которых мРНК CD25Exo4Del детектировалась. Кроме того, обнаружено статистически значимое повышение уровня олигомерной фракции в 2,6 раза в сравнении со здоровыми донорами ($p < 0,05$). Этот факт свидетельствует о возможной регуляторной роли мРНК *IL-2Rα*, не содержащей в своем составе 4-го экзона, или ее белкового продукта. Можно предположить, что при отсутствии кодируемой мРНК CD25Exo4Del α-цепи, не способной связывать ИЛ-2, резко повышается скорость шеддинга полноразмерной молекулы CD25, а это проявляется в повышении ее концентрации в периферической крови. В результате на системном уровне может возникать торможение активационных процессов, основанное на связывании ИЛ-2 растворимыми молекулами CD25.

Как указано выше, все три исследуемые формы мРНК *IL-2Rα* были обнаружены в 100 % тестированных

образцов периферической крови как у пациентов с раком толстой кишки, так и у здоровых доноров крови. При этом в опухолевых очагах частота обнаружения всех трех альтернативных форм мРНК *IL-2Rα* составила 64 % и оказалась статистически значимо ниже, чем в крови пациентов с раком толстой кишки и доноров крови ($p = 0,046$). Таким образом, в клетках опухолевых очагов части пациентов с раком толстой кишки обнаруживаются изменения в спектре альтернативных форм мРНК *IL-2Rα*, отсутствующие в клетках периферической крови. Изменения чаще всего связаны с потерей мРНК, имеющей делецию 4-го и 5-го экзона, и могут принадлежать или непосредственно опухолевым клеткам, или лимфоидным клеткам, инфильтрирующим опухоль.

Обсуждение

По результатам исследования образцов опухолевых очагов пациентов с колоректальным раком, проведенного ранее, мРНК *IL-2Rα* была детектирована в 58 % (7/12) случаев, что согласуется с данными, представленными в настоящей работе [20]. Присутствие мРНК *IL-2Rα* в опухолевых клетках было показано при ряде других новообразований [23–25].

Данные литературы свидетельствуют, что экспрессия гена *IL-2RA* в раковой клетке является одним из молекулярных механизмов экспансии опухолевых клонов

Таблица 5. Частота обнаружения альтернативных форм мРНК *IL-2Rα* в опухолях пациентов с раком толстой кишки

мРНК дифференцировочных и раково-тесткулярных генов	Альтернативные варианты мРНК <i>IL-2Rα</i>					
	CD25		CD25Exo4Del		CD25Exo4-5Del	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
CD38 ⁺	30/31	98	28/31	90	25/31 [^]	81
CD38 ⁻	15/15	100	15/15	100	12/15	80
CD38Exo3Del ⁺	12/12	100	11/12	92	10/12	83
CD38Exo3Del ⁻	33/34	97	32/34 ^{^^}	94	26/34 [^]	76
ICAM-1 ⁺	40/40*	100	38/40	95	35/40*	88
ICAM-1 ⁻	7/8	88	6/8	75	2/8	25
sICAM-1 ⁺	14/14	100	13/14 31/34	93	11/14	79
sICAM-1 ⁻	33/34	97		91	26/34 [^]	77
mFas ⁺	48/49	98	45/49	92	37/49 [^]	76
mFas ⁻	0/0	0	0/0	0	0/0	0
Fas del 5 ⁺	13/13	100	13/13 ^{^^}	100	8/13 [^]	62
Fas del 5 ⁻	35/36	97	32/36	89	29/36 [^]	81
Fas del 4 ⁺	13/13	100	12/13 33/36	92	10/13	77
Fas del 4 ⁻	35/36	97		92	27/36 [^]	75
Fas del 3, 4 ⁺	44/44	100	43/44 ^{^^}	98	33/44 [^]	75
Fas del 3, 4 ⁻	4/5	80	2/5	40	4/5	80
sFas ⁺	46/47	98	43/47	91	36/47 [^]	77
sFas ⁻	2/2	100	2/2	100	1/2	50
Fas del 4, 6 ⁺	24/25	96	22/25 23/24	88	18/25 [^]	72
Fas del 4, 6 ⁻	24/24	100		96	19/24 [^]	79
Fas del 3, 4, 6 ⁺	40/41	98	38/41	93	33/41 [^]	80
Fas del 3, 4, 6 ⁻	8/8	100	7/8	88	4/8 [^]	50

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с частотой выявления мРНК в ICAM-1⁻-опухолях ($p < 0,05$); [^] – статистически значимые различия по сравнению с частотой выявления мРНК CD25 ($p < 0,05$); ^{^^} – статистически значимые различия по сравнению с частотой выявления мРНК CD25Exo4-5Del ($p < 0,05$).

Таблица 6. Уровень суммарной и олигомерной фракций sCD25 в сыворотке крови пациентов с раком толстой кишки (ед/мл)

мРНК		Фракция sCD25	
		суммарная	олигомерная
CD25	Есть	367,7 (313,0; 427,5)	302,3 (266,5; 397,3)
	Нет	273,0	Не тестировали
CD25Exo4Del	Есть	365,8 (305,0; 427,5)	302,3 (261,5; 390,5)
	Нет	369,2 (317,7; 409,3)	1047,0 (271,4; 1822,5)
CD25Exo4-5Del	Есть	355,0 (285,0; 416,0)	292,8 (258,4; 397,3)
	Нет	377,0 (339,2; 433,8)	319,2 (286,0; 437,4)

и ассоциирована с высоким уровнем злокачественности опухоли. Установлено, что высокая экспрессия IL-2RA в неопластических клетках приводит к повышению их пролиферативной, трансформирующей активности, устойчивости к лекарственным препаратам и коррелирует с неблагоприятным прогнозом для пациента [1]. Однако во всех упомянутых случаях анализировалась мРНК IL-2Ra полноразмерной формы или ее белковый продукт. Как показано в настоящей работе, в опухолях одновременно в большинстве случаев присутствовали и делетированные формы мРНК. Можно предположить, что кодируемые ими белки конкурируют с полноразмерными α -цепями за включение в состав высокоаффинного рецептора и тем самым осуществляют ограничительную регуляторную функцию. Однако по мере развития опухолевого процесса частота встречаемости мРНК CD25Exo4-5Del падала, достигая минимума на IV стадии. Отсутствие делетированной мРНК должно приводить в этой ситуации к более эффективному связыванию ИЛ-2 и пролиферации клеток, что наблюдается на поздних стадиях опухолевого роста.

Другим источником мРНК IL-2Ra в опухолевых очагах пациентов с раком толстой кишки могут быть лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, в частности CD4⁺CD25⁺-Трег [26]. Важной характеристикой CD4⁺CD25⁺-Трег является высокая экспрессия α -цепи рецептора ИЛ-2 на их мембране. Функциональная роль данной субпопуляции клеток заключается в том, что они оказывают мощный регуляторно-супрессирующий эффект на пролиферацию других Т-клеток *in vitro* и подавляют их функции *in vivo*. Активированные CD4⁺-клетки также экспрессируют на своей поверхности молекулу CD25, но временно и в значительно меньших количествах по сравнению с Трег [27].

Нами показано, что три альтернативные формы мРНК IL-2Ra в периферической крови пациентов с раком толстой кишки, так же, как и в крови здоровых доноров, определяются в 100 % случаев и, видимо,

таким образом обеспечивают полноценную работу системы «ИЛ-2 – его рецептор». В опухолях делетированные формы мРНК IL-2Ra и в первую очередь – мРНК CD25Exo4-5Del выявляются значительно реже. Вероятно, потеря делетированных форм на поздних стадиях заболевания приводит к дисбалансу в содержании альтернативных вариантов мРНК IL-2Ra не только в опухолевых клетках, но и в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах, в первую очередь – Трег. Причина и механизм формирования такого дисбаланса остаются неясными, однако результатом может стать повышение уровня активации Трег за счет отсутствия на мембране продуктов делетированных форм мРНК IL-2Ra, не способных связывать ИЛ-2 и играющих роль ограничителя количества функционально активных рецепторов ИЛ-2. Усиление супрессорной активности Трег, как известно, служит одной из причин прогрессии опухоли. Для проверки изложенных предположений необходимы дополнительные исследования.

Заключение

Продemonстрировано присутствие альтернативных форм мРНК IL-2Ra CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del в опухолевых очагах и периферической крови пациентов с раком толстой кишки. Представлены данные о частоте их выявления и частоте выявления полноразмерной формы мРНК CD25 в опухолевых очагах пациентов с различными гистологическими формами рака толстой кишки, на различных стадиях заболевания, при различной локализации опухоли, при метастазах, в сравнении с особенностями транскриптома клеток опухолевых очагов и уровнем растворимой формы дифференцировочной молекулы CD25 в сыворотке крови. Полученные данные позволяют высказать предположение о регуляторной роли продуктов делетированных форм мРНК IL-2Ra, отсутствие которых в опухолевых очагах пациентов с раком толстой кишки может приводить к активации Трег, усилению иммуносупрессии и прогрессии опухоли.

Литература

1. Kuhn D.J., Dou Q.P. The role of interleukin-2 receptor alpha in cancer. *Front. Biosci.* 2005; 10: 1462–74. DOI: 10.2741/1631.
2. Cosman D. Cloning, sequence and expression of human interleukin-2 receptor. *Nature*. 1984; 312 (5996): 768–71. DOI: 10.1038/312768a0.
3. Castrignano T., D'Antonio M., Anselmo A. Carrabino D. et al. ASPicDB: a database resource for alternative splicing analysis. *Bio-*

informatics. 2008; 24 (10): 1300–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btn113.

4. Ishida N., Kanamori H., Noma T., Nikaido T. et al. Molecular cloning and structure of the human interleukin 2 receptor gene. *Nucleic Acids Res.* 1985; 13 (21): 7579–89. DOI: 10.1093/nar/13.21.7579.

5. Новикова С.В. (Шумилова С.В.), Алясова А.В., Новиков Д.В. Разработка и апробация метода детекции мРНК альфа-цепи ре-

цептора интерлейкина-2 в клетках опухолевых очагов человека. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2010; 2 (2): 563–65.

6. Kubysheva N., Postnikova L., Soodaeva S., Novikov V. et al. Relationship of the content of systemic and endobronchial soluble molecules of CD25, CD38, CD8, and HLA-I-CD8 and Lung function parameters in COPD patients. *Dis. Markers*. 2017. Vol. 2017. DOI:10.1155/2017/8216723.

7. Novikov V.V., Egorova N.I., Kurnikov G.Yu., Evsegneeva I.V. The Serum level of soluble HLA molecules and IL-2R at urogenital chlamydial infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 601: 285–89.

8. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162 (1): 156–59. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.

9. Новиков В.В., Евсегнеева И.В. Новые дифференцировочные антигены человека, утвержденные на VII Международном Воркшопе. Российский биотерапевтический журнал. 2003; 2 (3): 3–6.

10. Голышко П.В., Новиков Д.В., Ананьев С.В., Барышников К.А. и др. Раково-тестикулярные гены в крови и опухоли больных колоректальным раком. Российский биотерапевтический журнал. 2015; 1: 19–25.

11. Новиков Д.В., Белова Т.В., Пегов Р.Г., Алясова А.В. и др. Частота обнаружения мРНК MAGE-A1-A6 в крови онкологических больных. Клиническая лабораторная диагностика. 2009; 4: 25–7.

12. Choi C. Homo sapiens interleukin-2 receptor mRNA, alternatively spliced, partial CDS. In: Submitted Neurology. Shinchondong, South Korea : Yonsei University, 1997. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF008556.1>.

13. Nagata S., Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995; 267: 1449–56. DOI: 10.1126/science.7533326.

14. Deaglio S., Mehta K., Malavasi F. Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk. Res.* 2001; 25 (1): 1–12. DOI: 10.1016/s0145-2126(00)00093-x.

15. Wingren A.G., Parra E., Varga M., Kalland T. T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles. *Crit. Rev. Immunol.* 2017; 37 (2-6): 463–81. DOI: 10.1615/critrevimmunol.v15.i3-4.30

16. Perenkov A.D., Novikov D.V., Sakharov N.A. et al. Heterogeneous CD38 expression in tumor tissues of patients with colorectal cancer. *Mol. Biol.* 2012; 46 (5): 705–9.

17. Новиков Д.В., Фомина С.Г., Гурина Н.Н., Перенков А.Д. и др. Корреляция экспрессии MUC1, ICAM1, IL32, FcγR3A и FoxP3 в опухолевых очагах больных раком молочной железы. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 1: 37–41.

18. Голеньков А.К., Митина Т.А., Новиков В.В. и др. Клиническое значение растворимых молекул адгезии (sCD50-ICAM-3), апоптоза (sCD95) и sHLA класса I при лимфопролиферативных заболеваниях. Российский биотерапевтический журнал. 2002; 1 (1): 60–4.

19. Уткин О.В., Свинцова Т.А., Кравченко Г.А., Шмелева О.А. и др. Экспрессия альтернативных форм гена CD95/FAS в клетках крови при герпес-вирусной инфекции. Иммунология. 2012; 33 (4): 189–93.

20. Wang Q., Li B., Liu B., Liu Y.B. et al. Polymorphisms of the ICAM-1 exon 6 (E469K) are associated with differentiation of colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2009; 28: 139–45. DOI: 10.1186/1756-9966-28-139.

21. Hamai A., Meslin F., Benhalam H., Jalil A. et al. ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway. *Cancer Res.* 2008; 68 (23): 9854–64. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0719.

22. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы. Москва : Медицинское информационное агентство. 2008: 249 с.

23. García-Tuñón I., Ricote M., Ruiz A., Fraile B. et al. Interleukin-2 and its receptor complex (alpha, beta and gamma chains) in situ and infiltrative human breast cancer: an immunohistochemical comparative study. *Breast Cancer Res.* 2004; 6 (1): R1–7. DOI: 10.1186/bcr730.

24. Loose D., Signore A., Bonanno E., Vermeersch H. et al. Prognostic value of CD25 expression on lymphocytes and tumor cells in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2008; 23 (1): 25–33. DOI: 10.1089/cbr.2007.0373.

25. McDoniels-Silvers A.L., Stoner G.D., Lubet R.A., You M. Differential expression of critical cellular genes in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas in comparison to normal lung tissues. *Neoplasia*. 2002; 4 (2): 141–50. DOI: 10.1038/sj.neo.7900217.

26. Guoping D. Tumor-infiltrating regulatory T cells: origins and features. *Am. J. Exp. Immunol.* 2018; 7 (5): 81–7.

27. Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J., Hafler D.A. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 2001; 167 (3): 1245–53. DOI: 10.4049/jimmunol.167.3.1245.

References

1. Kuhn D.J., Dou Q.P. The role of interleukin-2 receptor alpha in cancer. *Front. Biosci.* 2005; 10: 1462–74. DOI: 10.2741/1631.

2. Cosman D. Cloning, sequence and expression of human interleukin-2 receptor. *Nature*. 1984; 312 (5996): 768–71. DOI: 10.1038/312768a0.

3. Castrignano T., D'Antonio M., Anselmo A. Carrabino D., et al. ASPicDB: a database resource for alternative splicing analysis. *Bioinformatics*. 2008; 24 (10): 1300–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btn113.

4. Ishida N., Kanamori H., Noma T., Nikaido T., et al. Molecular cloning and structure of the human interleukin 2 receptor gene. *Nucleic Acids Res.* 1985; 13 (21): 7579–89. DOI: 10.1093/nar/13.21.7579.

5. Novikova S.V. (Schumilova S.V.), Alyasova A.V., Novikov D.V. Development and testing of the method of detection of alpha-chain mRNA of interleukin-2 receptor in cells of human tumors. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo*. 2010; 2 (2): 563–65. (in Russian)

6. Kubysheva N., Postnikova L., Soodaeva S., Novikov V., et al. Relationship of the content of systemic and endobronchial soluble molecules of CD25, CD38, CD8, and HLA-I-CD8 and Lung function parameters in COPD patients. *Dis. Markers*. 2017. Vol. 2017. DOI:10.1155/2017/8216723.

7. Novikov V.V., Egorova N.I., Kurnikov G.Yu., Evsegneeva I.V. The Serum level of soluble HLA molecules and IL-2R at urogenital chlamydial infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 601: 285–89.

8. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162 (1): 156–59. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.

9. Novikov V.V., Evsegneeva I.V. New human differentiation antigens approved at the VII International Workshop. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2003; 2 (3): 3–6. (in Russian)

10. Golyshko P.V., Novikov D.V., Ananiev S.V., Baryshnikov K.A., et al. Cancer-testicular genes in patients with colorectal cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2015; 1: 19–25. (in Russian)

11. Novikov D.V., Belova T.V., Pegov R.G., Alyasova A.V., et al. The frequency of mRNA detection is MAGE-A1-A6 in the blood of oncological patients. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2009; 4: 25–7. (in Russian)

12. Choi C. Homo sapiens interleukin-2 receptor mRNA, alternatively spliced, partial CDS. In: Submitted Neurology. Shinchondong, South Korea : Yonsei University, 1997. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF008556.1>.

13. Nagata S., Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995; 267: 1449–56. DOI: 10.1126/science.7533326.

14. Deaglio S., Mehta K., Malavasi F. Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk. Res.* 2001; 25 (1): 1–12. DOI: 10.1016/s0145-2126(00)00093-x.

15. Wingren A.G., Parra E., Varga M., Kalland T. T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles. *Crit. Rev. Immunol.* 2017; 37 (2-6): 463–81. DOI: 10.1615/critrevimmunol.v15.i3-4.30

16. Perenkov A.D., Novikov D.V., Sakharov N.A., et al. Heterogeneous CD38 expression in tumor tissues of patients with colorectal cancer. *Mol. Biol.* 2012; 46 (5): 705–9.

17. Novikov D.V., Fomina S.G., Gurina N.N., Perenkov A.D., et al. Correlation of expression of MUC1, ICAM1, IL32, FcγR3A and FoxP3 in tumor centers of breast cancer patients. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 1: 37–41. (in Russian)

18. Golenkov A.K., Mitina T.A., Novikov V.V., et al. Clinical significance of soluble adhesion molecules (sCD50-ICAM-3), apoptosis (sCD95) and class I sHLA in lymphoproliferative diseases. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2002; 1 (1): 60–4. (in Russian)

19. Utkin O.V., Svintsova T.A., Kravchenko G.A., Shmeleva O.A., et al. Expression of alternative forms of gene CD95/FAS in blood cells at herpesviral infection. *Immunologiya*. 2012; 33 (4): 189–93. (in Russian)
20. Wang Q., Li B., Liu B., Liu Y.B., et al. Polymorphisms of the ICAM-1 exon 6 (E469K) are associated with differentiation of colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2009; 28: 139–45. DOI: 10.1186/1756-9966-28-139.
21. Hamai A., Meslin F., Benhalam H., Jalil A., et al. ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway. *Cancer Res*. 2008; 68 (23): 9854–64. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0719.
22. Novikov V.V., Karaulov A.V., Baryshnikov A.Y. Soluble forms of membrane antigens of immune system cells. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo, 2008: 249 p.
23. García-Tuñón I., Ricote M., Ruiz A., Fraile B., et al. Interleukin-2 and its receptor complex (alpha, beta and gamma chains) in situ and infiltrative human breast cancer: an immunohistochemical comparative study. *Breast Cancer Res*. 2004; 6 (1): R1–7. DOI: 10.1186/bcr730.
24. Loose D., Signore A., Bonanno E., Vermeersch H., et al. Prognostic value of CD25 expression on lymphocytes and tumor cells in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Biother. Radiopharm*. 2008; 23 (1): 25–33. DOI: 10.1089/cbr.2007.0373.
25. McDoniels-Silvers A.L., Stoner G.D., Lubet R.A., You M. Differential expression of critical cellular genes in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas in comparison to normal lung tissues. *Neoplasia*. 2002; 4 (2): 141–50. DOI: 10.1038/sj.neo.7900217.
26. Guoping D. Tumor-infiltrating regulatory T cells: origins and features. *Am. J. Exp. Immunol*. 2018; 7 (5): 81–7.
27. Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J., Hafler D.A. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol*. 2001; 167 (3): 1245–53. DOI: 10.4049/jimmunol.167.3.1245.