

*Российский онкологический  
научный центр  
им. Н.Н. Блохина  
Минздрава России  
(Россия, Москва)*

# **ВЛИЯНИЕ ИПИЛИМУМАБА НА СУБПОПУЛЯЦИОННУЮ СТРУКТУРУ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ**

**З.Г. Кадагидзе, Т.Н. Заботина, О.В. Короткова, Д.В. Табаков, А.И. Черткова,  
А.А. Борунова, И.О. Панчук, И.В. Самойленко, Г.Ю. Харкевич, Л.В. Демидов**

## **THE EFFECT OF IPIILIMUMAB ON THE SUBPOPULATION STRUCTURE OF LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH METASTATIC MELANOMA**

**З.Г. Кадагидзе**

*Доктор медицинских наук, профессор, Лаборатория клинической  
иммунологии опухолей, ФГБУ РОНЦ им.Н.Н. Блохина,  
115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, д.24.  
SPIN-код: 5799-8977.*

**Т.Н. Заботина**

*Доктор биологических наук, Лаборатория клинической иммунологии опухолей.  
Тел.: 8 (499)324-43-72; 89030152211, E-mail: tatzabotina@yandex.ru.  
SPIN-код: 8628-9705.*

**О.В. Короткова**

*Кандидат биологических наук, Лаборатория клинической иммунологии опухолей.  
SPIN-код: 1374-1542.*

**Д.В. Табаков**

*Лаборатория клинической иммунологии опухолей.  
SPIN-код: 1233-6671.*

**А.И. Черткова**

*Кандидат медицинских наук, Лаборатория клинической иммунологии опухолей.  
SPIN-код: 6083-2870.*

**А.А. Борунова**

*Кандидат медицинских наук,  
Лаборатория клинической иммунологии опухолей.  
SPIN-код: 1865-1417.*

**И.О. Панчук**

*Лаборатория клинической иммунологии опухолей.  
SPIN-код 7042-8465*

**И.В. Самойленко**

*Кандидат медицинских наук,  
Отделение хирургическое № 10 (биотерапии опухолей).  
SPIN-код: 3691-8923.*

**Г.Ю. Харкевич**

*Доктор медицинских наук,  
Отделение хирургическое № 10 (биотерапии опухолей).  
SPIN-код 6321-3330.*

**Л.В. Демидов**

*Доктор медицинских наук, профессор,  
Отделение хирургическое № 10 (биотерапии опухолей).  
SPIN-код: 5362-6386.*

**Z.G. Kadagidze**

*Doctor of Medicine, Professor, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Ministry of Health,  
115478, Russia, Moscow, Kashirskoe shosse, 24.  
SPIN-code 5799-8977.*

**T.N. Zabolina**

*Doctor of Biological Sciences, Laboratory of clinical immunology of tumors.  
E-mail: tatzabolina@yandex.ru.  
SPIN-code:8628-9705.*

**O.V. Korotkova**

*Candidate of Biological Sciences, Laboratory of clinical immunology of tumors.  
SPIN-code: 1374-1542.*

**D.V. Tabakov**

*Laboratory of clinical immunology of tumors  
SPIN-code: 1233-6671.*

**A.I. Chertkova**

*Candidate of Medicine, Laboratory of clinical immunology of tumors  
SPIN-code: 6083-2870.*

**A.A. Borunova**

*Candidate of Medicine, Laboratory of clinical immunology of tumors.  
SPIN-code: 1865-1417.*

**I.O. Panchuk**

*Laboratory of clinical immunology of tumors.  
SPIN-code: 7042-8465.*

**I.V. Samoilenko**

*Candidate of Medicine, Department of surgery No. 10 (biotherapy of tumors).  
SPIN-code: 3691-8923.*

**G.Yu. Kharkevich**

*Doctor of Medicine, Department of surgery No. 10 (biotherapy of tumors).  
SPIN-code: 6321-3330.*

**L.V. Demidov**

*Doctor of Medicine, Professor, Department of surgery No.10 (biotherapy of tumors).  
SPIN-code: 5362-6386.*

В настоящее время перспективным направлением в иммунотерапии злокачественных опухолей является применение таргетных препаратов на основе моноклональных антител, направленных против ингибиторных рецепторов Т-клеток, так называемых «контрольных точек иммунитета». Одним из первых препаратов этой группы, введенных в клиническую практику, является Ипилимумаб (анти-CTLA-4).

**Цель исследования** – изучение взаимосвязи субпопуляционного состава циркулирующих лимфоцитов больных диссеминированной меланомой кожи в процессе терапии Ипилимумабом с клинической эффективностью лечения.

**Материалы и методы.** Иммунофенотипирование циркулирующих лимфоцитов проводили методом многопараметрового цитометрического анализа с использованием коммерческих моноклональных антител к поверхностным антигенам CD45, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56, CD25, CD127, CD11b. В исследование было включено 120 больных диссеминированной меланомой кожи. Иммунологическое обследование проводилось до и после 4-х введений Ипилимумаба (3 мг/кг каждый 21 день).

**Результаты.** Проведенное исследование выявило связь исходного количества определенных популяций лимфоцитов периферической крови с продолжительностью жизни больных, леченных Ипилимумабом. Основные различия наблюдались между группой больных с максимальной продолжительностью жизни (более 2-х лет) и группами пациентов с продолжительностью жизни менее 2-х лет, и касались клеток адаптивного и врожденного иммунитета, как эффекторных (CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Т-клетки, НК-клетки), так и регуляторных (NKT-клетки, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/neg</sup> Т-клетки-супрессоры) популяций. Под влиянием терапии Ипилимумабом наиболее значительные изменения линейной структуры циркулирующих лимфоцитов также наблюдались у пациентов с продолжительностью жизни более 2-х лет.

**Заключение.** Проведенное исследование выявило связь исходного количества эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов периферической крови с продолжительностью жизни больных диссеминированной меланомой кожи, леченных Ипилимумабом.

**Ключевые слова:** регуляторные T-клетки, NK-клетки, NKT-клетки, эффекторные T-клетки.

Using of targeted drugs based on monoclonal antibodies directed against inhibitory receptors on T-cells (called «checkpoint of immunity») is a promising direction in immunotherapy of malignant tumors in our days. One of the first medicine of this group introduced in clinical practice is Ipilimumab (anti-CTLA-4).

**The aim** of the investigation is the study of the subpopulation structure of circulating lymphocytes of patients with metastatic melanoma in the process of Ipilimumab therapy and it's relationship with the clinical effect of the treatment.

**Materials and methods.** Immunophenotyping of circulating lymphocytes was assessed by multiparameter cytometric analysis using commercial monoclonal antibodies to surface antigens CD45, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56, CD25, CD127, CD11b. The study included 120 patients with metastatic melanoma. Immunological tests were performed before and after 4 doses of Ipilimumab (3 mg/kg every 21 days).

**Results.** The study has identified the correlation of certain populations of peripheral blood lymphocytes with the life expectancy of patients treated with Ipilimumab. The main differences were observed between the group of patients with a maximum life expectancy (over 2 years) and groups of patients with life expectancy less than 2 years. Differences was shown on cells of adaptive and innate immunity, including effector cells (CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>T-cells, NK-cells) and regulatory cells (NKT-cells, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/neg</sup> T-suppressor cells). Under the influence of Ipilimumab therapy the most significant changes in linear subpopulation structure of circulating lymphocytes was also observed in patients with life expectancy more than 2 years.

**Conclusion.** The study found the relationship of the initial amount of effector and regulatory populations of lymphocytes in the peripheral blood with a life expectancy of patients with metastatic melanoma treated with Ipilimumab.

**Keywords:** regulatory T-cells, NK-cells, NKT-cells, effector T-cells.

## Введение

Использование в противоопухолевой терапии таргетных моноклональных антител, направленных против ингибиторных рецепторов T-клеток, так называемых «контрольных точек иммунитета», основано на доказательстве существования спонтанного иммунного ответа на опухоль. У значительного числа пациентов с различными злокачественными новообразованиями, не получавших какого-либо иммунотерапевтического лечения, обнаруживаются клетки-эффекторы и антитела, специфические в отношении антигенов опухолевых клеток [1]. Множество проведенных исследований показало, что функциональное состояние иммунной системы и ее способность отвечать на проводимую противоопухолевую терапию во многих случаях определяет эффективность лечения и прогноз заболевания [2]. В настоящее время клинические исследования направлены на поиск прогностических и предиктивных иммунологических маркеров, которые могут помочь в разработке персонализированного лечения онкологических пациентов. Увеличивается число исследований, доказывающих прогностическое значение определенных популяций иммунокомпетентных клеток периферической крови больных различными формами злокачественных новообразований при различных видах терапии.

Одним из первых моноклональных антител, направленных против коингибиторных рецепторов T-клеток и введенных в клиническую практику, является Ипилимумаб (анти-CTLA-4). К настоящему вре-

мени доказана клиническая эффективность терапии Ипилимумабом при меланоме [3]. Данный препарат разрешен в ряде стран для лечения генерализованной и метастатической меланомы и применяется как в виде монотерапии, так и в сочетании с химио-, радио- и вакцинотерапией, а также в комбинации с другими таргетными препаратами [4–6]. На сегодняшний день одной из важных задач иммуноонкологии является поиск биологических маркеров для выявления группы пациентов, лечение которых будет клинически эффективным.

Наиболее значимым показателем эффективности противоопухолевой терапии является продолжительность жизни пациентов. Поэтому важно определить взаимосвязь между количеством линейных, эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов периферической крови (ПК) пациентов с диссеминированной меланомой до и после терапии Ипилимумабом и продолжительностью жизни пациентов.

**Цель исследования.** Изучение субпопуляционного состава циркулирующих лимфоцитов больных диссеминированной меланомой кожи в процессе терапии Ипилимумабом. Определение связи с клинической эффективностью лечения.

**Материалы и методы.** Иммунологическое обследование проводилось до и после 4-х введений Ипилимумаба (3 мг/кг каждый 21 день). В исследование было включено 120 пациентов с диссеминированной меланомой кожи, 41 мужчина и 79 женщин. Период наблюдения составил 4 года. В качестве контрольных образцов использовали периферическую кровь (ПК) 47 практически здоровых доноров, медиана возраста

37,0 (25,5–51,5). В зависимости от общей выживаемости все больные были разделены на 4 группы. Первая группа – выживаемость менее 6 месяцев (n=28) медиана возраста 51,5 (32,5–59,0), Вторая группа – выживаемость от 6 месяцев до 1 года (n=40) медиана возраста 52,0 (38,0–59,5), Третья группа – выживаемость от 1 года до 2-х лет (n=32) медиана возраста (47,5 (36,0–59,2), четвертая группа – выживаемость более 2-х лет (n=20) медиана возраста 57,0 (36,5–61,2). Общая выживаемость в первой группе составила 3,9 (2,0–4,8) месяца, во второй группе – 8,5 (6,4–10,3) месяцев, в третьей группе – 15,2 (13,6–21,2) месяца, в четвертой группе – 32,8 (28,6–38,2).

Все пациенты дали информированное согласие на проведение иммунологического обследования.

Имунофенотипирование циркулирующих лимфоцитов проводили методом многопараметрового цитофлюориметрического анализа на проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciences) с использованием коммерческих моноклональных антител (МКА), конъюгированных с FITC, PE, PE-Cy5, PC5 (BD Biosciences, Becton Coulter) к поверхностным антигенам CD45, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56, CD25, CD127, CD11b. В каждом образце накапливали и анализировали не менее 5000 событий в гейте CD45<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup> лимфоцитов, количество клеток с фенотипом CD45<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup> составляло не менее 95–97%. Для дискриминации неспецифического связывания использовали конъюгаты IgG1FITC/IgG2aPE, IgG1FITC/IgG2aPE/IgG2aPC5. Применяли Dotplot-анализ цитограмм с коммерческим программным обеспечением BD CellQuest PRO software (BD Biosciences), учитывали относительное число позитивных клеток (%).

Цитотоксический потенциал клеток-эффекторов изучали с использованием коммерческой тест-системы, содержащей моноклональные антитела к внутриклеточному белку перфорину (BD Biosciences). Для субпопуляционного анализа экспрессии внутриклеточных белков использовали метод одновременного окрашивания поверхностных антигенов в сочетании с окрашиванием внутриклеточных маркеров CD8/Perforin, CD16/Perforin.

**Статистический анализ данных.** Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Sigma Plot 11.0 for Windows. Нормальность распределения показателей определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильной широты (25-й и 75-й процентиля) в случае распределения отличного от нормального, или среднего значения и стандартного отклонения  $\bar{x}(s)$  при нормальном распределении показателей. Статистическую значимость различий между сравниваемыми группами оценивали по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни и t-критерию Стьюдента для независимых групп и критерию Вилкоксона для зависимых групп. Раз-

личия между показателями считали статистически значимыми при  $P \leq 0,05$  (95% ДИ).

**Результаты.** В зависимости от продолжительности жизни (ПЖ) все пациенты, включенные в исследование, были разделены на 4 группы. Группа 1 – пациенты с ПЖ менее 6 месяцев, группа 2 – ПЖ от 6 месяцев до 1 года, группа 3 – ПЖ от 1 года до 2-х лет, группа 4 – ПЖ более 2-х лет.

*Определение линейной структуры основных популяций лимфоцитов периферической крови больных диссеминированной меланомой в процессе лечения Ипилимумабом*

Сравнительное исследование состояния клеточного звена иммунитета выявило как сходство, так и различия в линейной структуре основных популяций лимфоцитов ПК между группами больных с различной ПЖ, как до начала терапии, так и через 3 месяца после лечения (12 неделя) Ипилимумабом.

Было обнаружено, что у больных всех четырех групп до лечения процент CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов находился в пределах физиологической нормы и в группах 1, 2, и 3 после лечения не изменился. В то же время только у пациентов 4 группы с ПЖ более двух лет общее количество CD3<sup>+</sup> Т-клеток после лечения статистически значимо увеличилось и превысило исходное и контрольное значения. Процент CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> В-клеток до лечения в группах с ПЖ менее 6 месяцев и более 2 лет был ниже нормы. После лечения в группе с ПЖ менее 6 месяцев этот показатель повышался до контрольных значений, а в группе с ПЖ более 2 лет оставался на том же уровне, т.е. ниже нормы. В 2-х других группах до лечения он был в пределах нормы, а после лечения снижался до значений ниже контрольных. Количество CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> НК-клеток у больных во всех группах до лечения было в пределах нормы. В то же время отмечалось различие во влиянии Ипилимумаба на количество этих клеток у больных разных групп. У пациентов с ПЖ менее 6 месяцев и ПЖ от 6 до 12 месяцев лечение не влияло на процент этих клеток (как до лечения, так и после он был в пределах нормы). А у пациентов с ПЖ от 1 до 2 лет (группа 3) и с ПЖ более 2-х лет (группа 4) под влиянием терапии Ипилимумабом процент НК-клеток снижался: в группе 3 до уровня ниже контрольного, в группе 4 до контрольных значений (таблицы 1–4). В норме уровень НК-клеток, экспрессирующих маркер CD8 (CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>), не превышает 5–10%. В нашем исследовании только у пациентов с ПЖ более двух лет количество этих клеток статистически значимо уменьшалось до нормальных значений.

*Исследование структуры Т-клеток периферической крови больных диссеминированной меланомой до и после лечения Ипилимумабом*

Основными популяциями Т-клеток являются лимфоциты, экспрессирующие маркеры CD4 и CD8. Ис-

Таблица 1. Субпопуляционная структура лимфоцитов периферической крови больных меланомой с продолжительностью жизни менее 6 месяцев (группа 1)

Маркер	До лечения	12 неделя	Доноры	P
	Медиана и квартили M(25%-75%) или $\bar{x}(s)$	Медиана и квартили M(25%-75%) или $\bar{x}(s)$	Медиана и квартили M(25%-75%) или $\bar{x}(s)$	
	2	3	1	
CD3 <sup>+</sup>	74,9 (69,1–80,3)	71,1 (59,1–75,5)	73,7 (69,4–80,0)	
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	36,8 (24,6–46,7)	31,9 (20,5–45,5)	41,1 (36,4–49,7)	P1.3=0,038
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	28,8 (23,9–38,0)	30,6 (24,2–38,3)	28,7 (24,3–31,9)	
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	7,2 (4,3–10,9)	7,2 (4,0–10,5)	7,7 (5,6–11,2)	
CD8 <sup>+</sup>	39,1 (9,4)	37,5 (6,8)	36,3 (7,2)	
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	9,2 (6,9–15,0)	10,7 (6,9–20,2)	5,2 (3,7–8,5)	P1.2<0,001; P1.3=0,003
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	13,3 (9,8–21,0)	14,0 (6,1–17,9)	16,0 (11,5–20,5)	
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	10,8 (7,9–17,8)	13,5 (10,0–20,0)	9,0 (4,9–13,1)	P1.2=0,017; P1.3=0,011
CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>	3,25 (1,8–5,8)	4,8 (2,5–14,8)	5,1 (3,6–6,9)	P1.2=0,004
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	5,4 (3,7–10,6)	5,5 (2,2–9,1)	7,7 (5,6–11,2)	P1.3=0,020
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	12,6 (9,1–19,2)	15,7 (7,9–25,3)	10,9 (6,9–13,8)	
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> / CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,4 (0,3–0,83)	0,4 (0,11–0,58)	0,71 (0,5–0,9)	P1.2=0,031; P1.3=0,003
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	10,7 (8,4–15,4)	9,6 (2,1–14,7)	9,2 (6,48–12,5)	
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>lo</sup>	9,5 (3,2)	10,5 (4,0)	9,2 (2,5)	
CD4/CD8	0,96 (0,6–1,3)	0,75 (0,6–1,1)	1,19 (0,9–1,4)	P1.3=0,011
CD16 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	17,4 (12,2–26,5)	13,9 (7,7–25,6)	16,4 (12,35–21,7)	
Цитотоксический потенциал CD16 <sup>+</sup> лф	91,8 (79,8–95,2)	92,0 (86,6–96,9)	91,4 (82,2–4,9)	
CD8 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	19,8 (7,3)	20,9 (10,0)	13,4 (5,7)	P1.2<0,001; P1.3=0,011
Цитотоксический потенциал CD8 <sup>+</sup> лф	53,4 (36,8–65,9)	55,5 (39,0–66,8)	38,9 (28,4–46,5)	P1.2=0,001; P1.3=0,010

следование показало, что до лечения только у больных с максимальной ПЖ процент CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток был статистически значимо выше, чем в контроле, в то же время исходное количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов было снижено. После терапии Ипилимумабом процент CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток снизился до нормы, а процент CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов возрос до нормы и статистически значимо превысил исходное значение показателя (таблица 4). У пациентов с меньшей ПЖ (группы 1, 2 и 3) количество клеток этих двух популяций до лечения было в пределах нормы, и терапия Ипилимумабом у пациентов 2 и 3 групп не повлияла на величину этих показателей (таблицы 2 и 3). В то же время у больных с наименьшей продолжительностью жизни количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клеток после лечения снизилось (таблица 1). Исходное количество CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> лимфоцитов у больных группы 2 было статистически значимо ниже по сравнению с группой контроля, в то время как в группах 1, 3 и 4 число этих клеток не отличалось от нормы. После лечения количество этих лимфоцитов практически не изменялось только у пациентов с ПЖ более 1 года (группы 3 и 4) (табл.1–4).

Одним из важных иммунологических показателей, указывающих на состояние иммунной системы, является величина соотношения CD4/CD8

лимфоцитов (иммунорегуляторный индекс – ИРИ) [7–9]. Изменения величины ИРИ в процессе лечения Ипилимумабом наблюдалось только у больных с минимальной и максимальной ПЖ (таблицы 1 и 4), однако они имели разнонаправленный характер. Так у больных 1 группы снижение на фоне лечения количества CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток при нормальном содержании CD8<sup>+</sup> привело к статистически значимому снижению ИРИ. В то же время у пациентов с ПЖ более 2-х лет под влиянием лечения исходно сниженный показатель статистически значимо повышался за счет увеличения популяции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток и снижения количества CD8<sup>+</sup> лимфоцитов. У больных 2 и 3 групп и до и после лечения ИРИ был в пределах нормы. Следует отметить, что субпопуляция лимфоцитов, экспрессирующих маркер CD8, является фенотипически и функционально гетерогенной и может включать в свой состав как CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, так и NK-клетки, экспрессирующие маркер CD8 (CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) [10]. У всех пациентов, независимо от ПЖ, до и после лечения отмечалось статистически значимое повышение процента активированных Т-лимфоцитов с фенотипом CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> по сравнению с контролем. До лечения наибольшее повышение показателя наблюдалось у пациентов с максимальной ПЖ.

Таблица 2. Субпопуляционная структура лимфоцитов периферической крови больных меланомой с продолжительностью жизни от 6 месяцев до 1 года (группа 2)

Маркер	До лечения	12 неделя	Доноры	P
	Медиана и квартили M(25%-75%) или $\bar{x}(s)$	Медиана и квартили M(25%-75%) или $\bar{x}(s)$	Медиана и квартили M(25%-75%) или $\bar{x}(s)$	
	2	3	1	
CD3 <sup>+</sup>	73,7 (65,3–80,5)	72,0 (68,1–82,4)	73,7 (69,4–80,0)	
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	37,1 (30,37–4,3)	39,4 (29,0–46,8)	41,1 (36,4–49,7)	
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	29,3 (24,7–36,9)	28,0 (20,5–38,8)	28,7 (24,3–31,9)	
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	8,1 (5,1–12,8)	8,2 (4,8–14,3)	7,7 (5,6–11,2)	
CD8 <sup>+</sup>	40,8 (31,0–46,9)	40,8 (29,6–48,6)	36,1 (30,6–41,7)	
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	10,4 (5,9–16,0)	12,8 (9,8–16,7)	5,2 (3,7–8,5)	P1.2<0,001; P1.3=<0,001
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	14,9 (10,5–2,37)	13,5 (7,9–22,3)	16,0 (11,5–20,5)	
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	10,9 (7,3–20,0)	13,5 (6,7–19,6)	9,0 (4,9–13,1)	P1.2=0,017; P1.3=0,009
CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>	4,4 (2,6–6,7)	3,3 (1,5–5,5)	5,1 (3,6–6,9)	P1.3=0,004
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	5,0 (3,3–8,0)	5,8 (3,4–12,3)	7,7 (5,6–11,2)	P1.2=0,006
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	14,0 (8,9–21,6)	14,5 (8,9–19,8)	10,9 (6,9–13,8)	
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> / CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,36 (0,2–0,75)	0,4 (0,17–1,0)	0,71 (0,5–0,97)	P1.2 =<0,001
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	8,2 (5,3–13,2)	9,2 (4,8–15,3)	9,2 (6,5–12,5)	
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>low</sup> /-	9,3 (7,47–10,87)	10,3 (7,7–12,2)	9,4 (7,4–10,6)	
CD4/CD8	0,96 (0,59–1,4)	1,1 (0,6–1,3)	1,19 (0,9–1,4)	
CD16 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	16,0 (11,3–24,0)	16,0 (12,4–21,9)	16,4 (12,3–1,7)	
Цитотоксический потенциал CD16 <sup>+</sup> лф	92,1 (83,0–94,8)	90,3 (85,0–94,2)	91,4 (82,2–94,9)	
CD8 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	17,6 (11,2–26,6)	18,5 (14,0–22,2)	12,4 (9,1–17,6)	P1.2=0,009; P1.3=0,005
Цитотоксический потенциал CD8 <sup>+</sup> лф	56,0 (37,1–63,5)	56,5 (43,4–69,5)	38,9 (28,4–46,5)	P1.2=<0,001; P1.3=<0,001

*Исследование функциональной активности клеток-эффекторов периферической крови больных диссеминированной меланомой до и после лечения Ипилимуабом*

Одним из основных путей реализации лимфоцитами цитотоксической функции является экзоцитоз литических гранул – перфорина и гранзимов.

В работе были исследованы основные субпопуляции эффекторных лимфоцитов, содержащих перфорин – CD45<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> Т-лимфоциты и CD45<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> НК клетки. При оценке содержания перфорина в CD16<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитах было установлено, что количество CD45<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> лимфоцитов и их цитотоксический потенциал статистически значимо превышал показатели доноров в 1, 2 и 4 группах. После лечения содержание перфорина в CD8<sup>+</sup> лимфоцитах статистически значимо снижалось и доходило до нормальных значений только в группе с ПЖ более 2-х лет. В 1 и 2 группах и после лечения показатель превышал контрольные значения. В то же время каких-либо различий в количестве CD16<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> лимфоцитов между группами и до и после лечения не наблюдалось. Все показатели были в пределах нормы (таблицы 1, 2, 3, 4).

*Изучение регуляторных популяций лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NKT-клеток, регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/neg</sup> Т-клеток и CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Т-лимфоцитов) периферической крови больных диссеминированной меланомой до и после лечения Ипилимуабом*

Полученные результаты показали, что у пациентов с ПЖ менее 6 месяцев и с ПЖ от 6 до 12 месяцев количество CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NKT-клеток было повышено и до и после лечения. У пациентов с ПЖ от 12 до 24 месяцев повышенное до лечения по сравнению с контролем количество этих клеток снижалось до нормы. В то же время у больных с ПЖ более 2-х лет количество NKT-клеток было в пределах нормы и до и после лечения.

Количество регуляторных Т-клеток с фенотипом CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> до лечения у больных 1, 2, 3 групп было в пределах нормы, а у больных в группе 4 статистически значимо выше нормы. После лечения изменения этого показателя наблюдались только у пациентов групп 3 и 4, однако оно носило разнонаправленный характер: в то время как в группе 3 показатель превысил норму, в группе 4 он статистически значимо снизился по сравнению с исходным значением до контрольного уровня. Высокоинформативным является определение величины соотношения CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>.

Таблица 3. Субпопуляционная структура лимфоцитов периферической крови больных меланомой с продолжительностью жизни от 1 года до 2-х лет (группа 3)

Маркер	До лечения	12 неделя	Доноры	P
	Медиана и квартили M(25%-75%) или $\bar{x}(s)$	Медиана и квартили M(25%-75%) или $\bar{x}(s)$	Медиана и квартили M(25%-75%) или $\bar{x}(s)$	
	2	3	1	
CD3 <sup>+</sup>	77,3 (66,7-83,8)	79,4 (71,5-86,5)	73,7 (69,4-80,0)	
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	38,6 (26,6-48,8)	42,2 (29,3-50,8)	41,1 (36,4-49,7)	
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	30,7 (26,1-37,9)	30,4 (24,6-37,3)	28,7 (24,3-31,9)	
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	6,8 (3,9-10,3)	6,5 (3,8-9,5)	7,7 (5,6-11,2)	
CD8 <sup>+</sup>	40,5 (10,1)	37,1 (9,9)	36,3 (7,2)	
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	10,2 (5,3-15,4)	8,8 (5,7-18,2)	5,2 (3,7-8,5)	P1.2=0,002; P1.3=0,003
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	12,1 (8,1-21,5)	9,3 (7,5-17,9)	16,0 (11,5-20,5)	P1.3=0,029
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	10,8 (7,9-16,7)	10,3 (5,3-15,4)	9,0 (4,9-13,1)	P1.2=0,038
CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>	4,8 (2,7-7,8)	3,0 (2,1-6,3)	5,1 (3,6-6,9)	P1.3=0,016
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	6,3 (2,9-12,7)	6,6 (3,7-11,7)	7,7 (5,6-11,2)	
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	12,3 (8,1-18,4)	14,9 (10,9-23,6)	10,9 (6,9-13,8)	P1.3=0,037
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> / CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,57 (0,27-0,91)	0,52 (0,3-0,7)	0,71 (0,5-0,9)	P1.3=0,026
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	13,0 (7,9-18,4)	12,1 (5,5-16,8)	9,2 (6,5-12,5)	P1.2=0,049
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>low</sup> /-	9,0 (7,3-11,2)	10,7 (9,4-13,8)	9,4 (7,4-10,6)	P1.3=0,004; P2.3=0,010
CD4/CD8	0,97 (0,6-1,5)	1,0 (0,82-1,4)	1,19 (0,9-1,4)	
CD16 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	15,2 (9,2-20,4)	12,9 (7,3-23,6)	16,4 (12,3-21,7)	
Цитотоксический потенциал CD16 <sup>+</sup> лф	90,9 (78,0-94,9)	91,7 (90,4-95,2)	91,4 (82,2-94,9)	
CD8 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	11,9 (8,4-17,6)	15,9 (8,4-22,2)	12,4 (9,1-17,6)	
Цитотоксический потенциал CD8 <sup>+</sup> лф	39,5 (24,2-52,9)	49,1 (27,2-63,4)	38,9 (28,4-46,5)	

До лечения величина соотношения CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> клеток была статистически значимо ниже значения этого показателя в контроле у больных 1, 2 и 4 групп, а в группе 3 была в пределах нормы. При этом только у пациентов с ПЖ более 2-х лет (4 группа) величина этого показателя на фоне терапии Ипилимумабом статистически значимо повышалась по сравнению с исходным значением. В группе 1 после лечения этот показатель по-прежнему был ниже нормы, в группе 2 не отличался от нормы, а в группе 3 стал ниже нормы (таблицы 1-4).

При анализе содержания регуляторных Т-клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/neg</sup> у больных 1, 2 и 4 групп не было выявлено статистически значимых различий по сравнению с группой контроля ни до, ни после лечения. Только в группе пациентов с ПЖ от 1 до 2 лет (группа 3) после лечения наблюдалось статистически значимое повышение количества этих регуляторных Т-клеток. При этом процент CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> до лечения превышавший нормальный показатель, после лечения снижался до нормы (таблица 3). При изучении величины этого показателя у индивидуальных больных было выявлено, что в 1-й группе 56,5% больных имели до лечения сниженный уровень регуляторных Т-клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/neg</sup>, и только у 43,5% их количество было повышено. В группах 2 и 3 повышенный уровень этих клеток до лечения был выявлен у 50% больных. В группе

пациентов с ПЖ более 2-х лет у 68,7% регистрировалось повышенное число этих клеток, которое составило от 9,9% до 19,6%.

## Обсуждение

CTLA-4 (CD152) является одной из важнейших ингибиторных молекул, передающих сигнал, подавляющий активацию Т-клеток. Передача сигнала с CTLA-4 приводит к повышению активационного порога Т-клеток, уменьшению продукции IL-2, развитию периферической толерантности. Хроническая стимуляция опухолевыми антигенами приводит к устойчивой экспрессии CTLA-4 на Т-клетках. Ипилимумаб блокирует связывание CTLA-4 с соответствующими лигандами, что обеспечивает усиление Т-клеточного иммунного ответа [11, 12]. По данным различных авторов, Ипилимумаб достоверно увеличивает общую выживаемость пациентов с генерализованной меланомой [13, 14].

Наиболее значимым показателем клинической эффективности противоопухолевой терапии является продолжительность жизни пациентов. Поэтому в настоящем исследовании было предпринято определение связи исходного количества основных популяций лимфоцитов ПК с ПЖ больных метастатической меланомой, получавших лечение Ипилимумабом, а также влияние терапии на изученные показатели клеточного иммунитета. При сравнительном иммунофенотипировании лимфоцитов больных четырех

Таблица 4. Субпопуляционная структура лимфоцитов периферической крови больных с продолжительностью жизни более 2-х лет (группа 4)

Маркер	До лечения	12 неделя	Доноры	P
	Медиана и квартили М (25%-75%) или $\bar{x}(s)$	Медиана и квартили М (25%-75%) или $\bar{x}(s)$	Медиана и квартили М (25%-75%) или $\bar{x}(s)$	
	2	3	1	
CD3 <sup>+</sup>	70,4 (10,4)	79,3 (8,1)	74,5 (7,1)	P1.3=0,023; P2.3<0,001
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	36,3 (9,0)	46,2 (10,8)	41,9 (8,0)	P1.2=0,017; P2.3<0,001
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	32,1(7,0)	31,0 (7,1)	28,1 (5,5)	P1.2=0,017
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	10,0 (6,4)	6,3 (4,2)	8,1 (3,9)	P2.3=0,013
CD8 <sup>+</sup>	42,2 (6,2)	37,3 (8,1)	36,3 (7,2)	P1.2=0,003; P2.3=0,038
CD3 <sup>+</sup> HLA <sup>-</sup> DR <sup>+</sup>	15,0 (9,1–19,8)	12,2 (9,5–20,1)	5,2 (3,7–8,5)	P1.2<0,00; P1.3<0,001
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	17,5 (10,9–28,4)	12,8 (6,9–18,7)	16,0 (11,5–20,5)	P2.3=0,001
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	9,9 (7,0–12,9)	10,5 (7,0–17,1)	9,0 (4,9–13,1)	
CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup>	3,0 (1,5–4,9)	3,3 (1,6–5,0)	5,1 (3,6–6,9)	P1.2<0,001 P1.3=0,010
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	4,5 (3,0–11,8)	6,0 (3,0–10,1)	7,7 (5,6–11,2)	
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	17,2 (12,0–29,5)	10,9 (5,2–12,9)	10,9 (6,9–13,8)	P1.2=0,004; P2.3=0,004
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> / CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,29 (0,2–0,5)	0,6 (0,3–1,4)	0,71 (0,5–0,9)	P1.2<0,001 P2.3=0,015
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	12,8 (6,6–12,5)	11,3 (9,2–16,5)	9,2 (6,5–12,5)	
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>h</sup> CD127l <sup>-</sup>	10,6 (8,8–12,4)	10,7 (6,3–13,4)	9,4 (7,37–10,6)	
CD4/CD8	22,0 (11,8–22,8)	16,7 (6,9 –25,1)	16,4 (12,3–21,7)	
CD16 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	0,83 (0,6–1,1)	1,19 (0,9–1,7)	1,19 (0,9–1,4)	P1.2=0,005; P2.3<0,001
Цитотоксический потенциал CD16 <sup>+</sup> лф	94,6 (86,9–95,9)	90,7 (80,4–94,1)	91,4 (82,2–94,9)	
CD8 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	21,7 (10,4)	17,5 (10,0)	13,4 (5,7)	P2.3=0,021; P1.2=0,001;
Цитотоксический потенциал CD8 <sup>+</sup> лф	50,2 (38,1–73,6)	46,4 (35,0–65,5)	38,9 (28,4–46,5)	P1.2=0,006

групп пациентов с диссеминированной меланомой, включенных в исследование, были обнаружены как сходство, так и различия в количественном составе лимфоцитов ПК как до, так и после лечения в зависимости от продолжительности жизни пациентов. Наиболее значительные отличия показателей по сравнению с пациентами остальных групп наблюдались у больных с максимальной ПЖ (более 2 лет) и касались основных популяций адаптивного и врожденного иммунитета. Только у больных с ПЖ более двух лет наблюдалось:

- повышение количества CD3<sup>+</sup> Т-клеток, сниженного до лечения, после терапии Ипилимумабом, (в остальных группах этот показатель до лечения был в пределах нормы и не изменялся под влиянием терапии);

- повышенное до лечения количество CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, которое под влиянием терапии Ипилимумабом снижалось до нормы (в остальных группах до лечения этот показатель был в пределах нормы и не изменялся под влиянием терапии);

- снижение исходно повышенного процента CD8<sup>+</sup> лимфоцитов после терапии до нормы, главным

образом за счет снижения количества НК-клеток, экспрессирующих маркер CD8, и в меньшей степени вследствие снижения процента CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток (в остальных группах до лечения показатель был в пределах нормы и не изменялся под влиянием терапии);

- увеличение числа CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в процессе лечения Ипилимумабом (в остальных группах этот показатель до лечения был в пределах нормы, а после лечения не изменялся, или снижался как в группе пациентов с ПЖ менее 6 месяцев);

- повышение величины соотношения CD4/CD8 после терапии Ипилимумабом, до лечения сниженной (в остальных группах этот показатель до лечения был в пределах нормы и после лечения или не изменялся, или снижался как в группе пациентов с ПЖ менее 6 месяцев);

- нормальное количество НКТ- клеток – как до, так и после лечения (у всех пациентов с ПЖ менее двух лет до лечения этот показатель был выше нормы).

CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клетки являются основными клетками-эффекторами адаптивного противоопухолевого



иммунитета. Повышение их количества в опухолевом микроокружении и периферической крови во многих случаях коррелирует с благоприятным прогнозом заболевания [15]. В данном исследовании исходное повышенное количество CD8<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток отмечалось только у пациентов с ПЖ более 2-х лет, что указывает на положительное значение повышения числа этих клеток до лечения при терапии Ипилимумабом больных меланомой. Увеличение процента CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в группе 4 до лечения, возможно, было связано с повышением количества не только Т-клеток, но и NK-клеток, достаточное число которых экспрессирует маркер CD8.

Важную роль в противоопухолевом иммунитете играют и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты [16], и повышение их числа под влиянием терапии Ипилимумабом только у больных с максимальной продолжительностью жизни, по-видимому, имеет благоприятное прогностическое значение. Важно отметить, что в группе с минимальной продолжительностью жизни после лечения наблюдалось снижение количества CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

В настоящее время известно несколько систем реализации лимфоцитами цитотоксической функции. Одним из основных путей является экзоцитоз литических гранул – перфорина и гранзимов. При взаимодействии клетки-эффектора с клеткой-мишенью происходит высвобождение перфорина, который, встраиваясь в мембрану клетки-мишени, полимеризуется в присутствии ионов кальция, образуя большие трансмембранные поры, вызывая тем самым осмотический «взрыв» и лизис клетки. Через эти поры в клетку проникают гранзимы, довершающие разрушение клетки, опосредуя деградацию ДНК клетки-мишени путем активации каспазы 3. Действие тандема этих молекул необратимо [17–19]. Полученные результаты показали, что количество CD45<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> лимфоцитов и их цитотоксический потенциал до лечения превышали контрольные значения в 1, 2 и 4 группах. Важно отметить, что только в группе пациентов с ПЖ более 2-х лет содержание перфорина в CD8<sup>+</sup> лимфоцитах после лечения статистически значимо снижалось и доходило до нормальных значений. Ранее было показано, что наличие высокого содержания перфорин-позитивных клеток в структуре CD45<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов можно рассматривать как фактор неблагоприятного прогноза основного заболевания [20, 21].

В настоящее время в клинических исследованиях значительное внимание уделяется NK-клеткам, которые являются главными эффекторными лимфоцитами врожденного иммунитета. Они обеспечивают защиту от вирусных инфекций и некоторых других патогенов на ранних этапах иммунного ответа и участвуют в контроле опухолевого роста и метастазирования [22]. У пациентов с ПЖ более 12 месяцев (3 и 4 группы) под влиянием терапии количество NK-клеток

снижалось. Снижение этого показателя у пациентов с ПЖ более 2 лет было значительно более выражено, и только у них сочеталось с повышением количества Т-клеток. По всей вероятности, увеличение количества CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в условиях снижения числа NK-клеток носит компенсаторный характер и играет определенную роль в противоопухолевой защите или, возможно, это связано с тем, что основной мишенью Ипилимумаба являются Т-клетки. В группах с ПЖ менее 1 года число NK-клеток оставалось на одном уровне, как до лечения, так и после. Различия в количестве CD16<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> лимфоцитов, возможно, не были выявлены в связи с тем, что эта популяция включает в себя и NK- и NKT-клетки.

Была обнаружена специфика характера изменений количества В-клеток в зависимости от ПЖ. Во всех группах с продолжительностью жизни от 6 месяцев до двух лет процент В-клеток до лечения был в пределах нормы и снижался только после лечения (группы 2, 3). В группе с ПЖ менее 6 месяцев количество этих клеток, сниженное до лечения, повышалось до нормы. Только у пациентов с максимальной ПЖ показатель был ниже нормы и до и после лечения. В последние годы накапливаются данные о существовании регуляторной популяции В-клеток, которая вносит значительный вклад в патогенез аутоиммунных и неопластических заболеваний [23]. Мы обнаружили, что снижение количества В-клеток ПК как до, так и после лечения ассоциировалось с максимальной ПЖ пациентов с диссеминированной меланомой. Какую роль играют в данном случае В-клетки, не ясно, но повышение их количества после лечения только у больных с наименьшей продолжительностью жизни может указывать на его неблагоприятное значение.

Важным активационным маркером является HLA-DR. Экспрессия этого маркера повышается на Т-клетках при различных процессах, характеризующихся хроническим воспалением: инфекционных и аутоиммунных заболеваниях, а также при многих злокачественных опухолях. Обнаруженное нами повышение этого показателя у больных меланомой согласуется с данными других исследований [24, 25].

Наиболее интересными оказались результаты изучения динамики уровня регуляторных/супрессорных лимфоцитов. С функционированием популяций регуляторных лимфоцитов связывают ускользание опухоли от иммунологического надзора и низкую эффективность противоопухолевой иммунотерапии. В подавлении противоопухолевого иммунитета участвуют регуляторные Т-клетки с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD27<sup>low/neg</sup> (T-per), CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NKT-клетки и регуляторные CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Т-лимфоциты. Согласно современным представлениям, популяции этих клеток имеют прогностическое значение у онкологических больных.

NKT-клетки играют важную роль в регуляции иммунного ответа при различных патологических

состояниях и могут, как стимулировать, так и подавлять противоопухолевый иммунный ответ [26, 27]. Ранее в исследованиях нашей лаборатории было продемонстрировано неблагоприятное прогностическое значение CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NKT-клеток у больных генерализованной меланомой, получавших лечение дендритноклеточной вакциной [28]. Повышенное количество NKT-клеток у больных меланомой, получавших лечение Ипилимумабом, до и после лечения, возможно, является неблагоприятным фактором, т. к. наблюдалось, главным образом, в группах с меньшей ПЖ. В то же время в группе 3 количество этих клеток, будучи повышенным до лечения, после лечения снижалось до нормы, а в группе 4 было в пределах нормы до и после лечения.

Наиболее значительные изменения процента CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Т-клеток были характерны только для больных с более высокой ПЖ (группы 3 и 4), но они носили разнонаправленный характер. У пациентов с ПЖ более 2-х лет количество CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Т-клеток до лечения было выше нормы, а после лечения оно статистически значимо снижалось до нормы. В остальных группах оно или оставалось в пределах нормы в оба момента исследования, или превышало норму, как у пациентов в группе 3. По данным различных авторов, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Т-клетки являются гетерогенной популяцией и включают в свой состав как клетки-эффекторы, так и клетки-супрессоры. При этом у онкологических больных они могут проявлять главным образом супрессорную функцию. G. Filaci с соавторами, исследуя опухолевые ткани, лимфоузлы и периферическую кровь больных различными формами злокачественных опухолей, обнаружили, что только у онкологических больных CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Т-клетки периферической крови проявляли супрессорную активность (в отличие от CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Т-клеток здоровых доноров, не обладавших супрессорной активностью) [29]. По данным различных авторов, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Т-клетки играют отрицательную роль у онкологических больных и могут служить неблагоприятным прогностическим признаком, что нужно учитывать в процессе лечения [30, 31]. В данном исследовании повышение уровня этой супрессорной популяции до лечения наблюдалось только у пациентов с максимальной продолжительностью жизни, что может указывать на реакцию супрессорного звена иммунитета на эффективный иммунный ответ организма. В то же время снижение количества этих клеток после лечения может иметь благоприятное значение.

Актуальной задачей является изучение регуляторных Т-клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/neg</sup> у больных, получающих таргетное лечение Ипилимумабом, т. к. данная популяция, как и эффекторных Т-клетки, также является мишенью для воздействия данного препарата [32]. Изменения количества кле-

ток данной регуляторной популяции под влиянием терапии Ипилимумабом наблюдались только в группе пациентов с ПЖ 1-2 года. После лечения количество Т-рег статистически значимо повышалось на фоне снижения процента CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, которое, таким образом, было связано, скорее всего, со снижением количества не регуляторных активированных Т-клеток. Причины изменений процента Т-рег клеток только в группе 3 не ясны. Следует отметить, что при определении этого показателя у индивидуальных больных, наиболее часто повышенный уровень регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low/neg</sup> Т-клеток до лечения отмечался у пациентов с ПЖ более 2-х лет и максимальная ПЖ может быть обусловлена в частности наличием клеток-мишеней таргетной иммуно-терапии Ипилимумабом.

## Заключение

Проведенное исследование выявило связь исходного количества эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов периферической крови с продолжительностью жизни больных генерализованной меланомой кожи, леченных Ипилимумабом. Основные различия в исходной величине показателей наблюдались между группой с максимальной продолжительностью жизни (более 2-х лет) и группами пациентов с ПЖ менее 2 лет. Наиболее значительные изменения линейной структуры лимфоцитов ПК под влиянием терапии Ипилимумабом также наблюдались у пациентов с ПЖ более 2-х лет, что указывает на сохранение функциональной способности иммунной системы у данной группы больных отвечать на проводимое лечение. Результаты, полученные при исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов ПК пациентов с генерализованной меланомой, указывают на четкую связь исходного состояния Т-клеточного звена иммунитета (CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>) и характера его изменений с эффективностью терапии Ипилимумабом. Это также демонстрирует специфику взаимосвязи других популяций лимфоцитов, изученных нами, включая популяции регуляторных Т- и NKT-клеток, с показателями общей выживаемости. Таким образом, полученные нами данные указывают на необходимость разработки алгоритма исследования состояния иммунитета у онкологических пациентов с различными злокачественными новообразованиями для определения наиболее значимых прогностических и предиктивных маркеров, которые помогут обосновать целесообразность назначения иммунотерапевтического лечения в каждом конкретном случае и послужат основой для проведения персонализированного лечения онкологических больных.

## Список литературы

1. Swann J.B., Smyth M.J. Immune surveillance of tumors // *Journal of Clinical Investigation*. – 2007 – Vol. 117, № 5. – P. 1137–1146.
2. Galluzzi L., Buqué A., Kepp O. et al. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents // *Cancer Cell*. – 2015. – Vol. 28. – № 6. – P. 690–714.
3. Wolchok J.D., Thomas L., Bondarenko I.N. et al. Phase III randomized study of ipilimumab (IPI) plus dacarbazine (DTIC) versus DTIC alone as first line treatment in patients with unresectable stage III or IV melanoma // *Journal of Clinical Oncology*. – 2011. – Vol. 29. – № 5. – suppl.
4. Silk A.W., Bassetti M.F., West B.T. et al. Ipilimumab and radiation therapy for melanoma brain metastases // *Cancer Medicine*. – 2013. – № 2. – P. 899–906.
5. Weber J., Hamid O., Amin A. et al. Randomized phase I pharmacokinetic study of ipilimumab with or without one of two different chemotherapy regimens in patients with untreated advanced melanoma // *Cancer Immunity*. – 2013. – Vol. 13. – № 7.
6. Wolchok J.D., Kluger H., Callahan M.K. et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma // *New England Journal of Medicine*. – 2013. – Vol. 369. – № 2. – P. 122–133.
7. Фрейдлин И.С. Как читать иммунограмму // *Соросовский Образовательный Журнал*. – 1997. – № 7. – С. 25–31.
8. Yu X., Fournier S., Allison J.P. et al. The role of B7 costimulation in CD4/CD8 T cell homeostasis // *Journal of Immunology*. – 2000. – Vol. 164. – № 7. – P. 3543–3553.
9. Hernberg M., Mubonen T., Pyrhonen S. Can the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio predict the outcome of interferon- $\alpha$  therapy for renal cell carcinoma? // *Annals of Oncology*. – 1997. – Vol. 8. – № 1. – P. 71–77.
10. Ibegbu C., Brodie-Hill A., Kourtis A.P. et al. Use of human CD3 monoclonal antibody for accurate CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocyte determinations in macaques: phenotypic characterization of the CD3-CD8<sup>+</sup> cell subset // *Journal of Medical Primatology*. – 2001. – Vol. 30. – № 6. – P. 291–298.
11. Grosso J.F., Jure-Kunkel M.N. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research // *Cancer Immunity*. – 2013. – Vol. 13. – № 5.
12. Ji R.R., Chasalow S.D., Wang L. et al. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab // *Cancer Immunology, immunotherapy*. – 2012. – Vol. 61. – № 7. – P. 1019–1031.
13. Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma // *New England Journal of Medicine*. – 2010. – Vol. 36. – № 8. – P. 711–723.
14. Wolchok J.D., Hodi F.S., Weber J.S. et al. Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2013. – № 1291. – P. 1–13.
15. Senovilla L., Vacchelli E., Galon J. et al. Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer // *Oncimmunology*. – 2012. – Vol. 1. – № 8. – P. 1323–1343.
16. Gerloni M., Zanetti M. CD4 T cells in tumor immunity // *Springer Seminars Immunopathology*. – 2005. – Vol. 27. – № 1. – P. 37–48.
17. Кадагидзе 3.Г. и др. Субпопуляции Granzyme-B<sup>+</sup>- лимфоцитов у больных меланомой при вакцинотерапии / 3.Г. Кадагидзе, А.А. Борунова, Г.З. Чкадуа и др. // *Иммунология*. – 2008. – № 2 – С. 87–94.
18. Law R.H., Lukoyanova N., Voskoboynik I. et al. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin // *Nature*. – 2010 – Vol. 468. – № 7322. – P. 447–451.
19. Rousalova I., Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation // *International Journal of Oncology*. – 2010. – Vol. 37. – № 6. – P. 1361–1378.
20. Борунова А.А. и др. Перфориновый потенциал эффекторных клеток у онкологических больных / А.А. Борунова, Г.З. Чкадуа, Т.Н. Заботина и др. // *Вестник ГУРОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. – 2005. – № 3–4 – С. 3–4.
21. Борунова А.А. и др. Перфорин-опосредованная цитотоксичность лимфоцитов / А.А. Борунова, Г.З. Чкадуа, Т.Н. Заботина и др. // *Медицинская иммунология*. – 2005. – Т. 7. – № 2–3. – С. 273.
22. Moretta L., Pietra G., Montaldo E. et al. Human NK cells: from surface receptors to the therapy of leukemias and solid tumors // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – Vol. 5. – № 5. – P. 87.
23. Zhang Y., Gallastegui N., Rosenblatt J.D. Regulatory B cells in anti-tumor immunity // *International Journal of Immunology*. – 2015. – Vol. 27. – № 10. – P. 521–530.
24. Váróczy L., Gergely L., Miltényi Z. et al. Can CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> activated T cells predict the prognosis of non-Hodgkin's lymphoma patients? // *Immunology Letters*. – 2005. – Vol. 97. – № 1. – P. 155–157.
25. Rodríguez A.C., García-Piñeres A.J., Hildesheim A. et al. Alterations of T-cell surface markers in older women with persistent human papillomavirus infection // *International Journal of Cancer*. – 2011. – Vol. 128. – № 3. – P. 597–607.
26. Subleski J.J., Jiang Q., Weiss J.M. et al. The split personality of NKT cells in malignancy, autoimmune and allergic disorders // *Immunotherapy*. – 2011. – Vol. 3. – № 10. – P. 1167–1184.
27. Terabe M., Berzofsky J.A. The role of NKT cells in tumor immunity // *Advances in Cancer Research*. – 2008. – Vol. 101. – P. 277–348.

28. Кадагидзе З.Г. и др. Основные субпопуляции регуляторных лимфоцитов у больных злокачественной меланомой и раком молочной железы / З.Г. Кадагидзе, А.И. Черткова, Т.Н. Заботина и др. // Иммунология. – 2014. – Т. 35. – № 2. – С. 64–67.

29. Filaci G., Fenoglio D., Fravega M. et al. CD8+CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers // Journal of Immunology. – 2007. – Vol. 179. – № 7. – P. 4323–4334.

30. Karagoz B., Bilgi O., Turken O. et al. CD8+CD28- cells and CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of advanced stage lung cancer patients // Medical Oncology. – 2010. – Vol. 27. – № 1. – P. 29–33.

31. Chen C., Chen D., Zhang Y. et al. Changes of CD4+CD25+FOXP3+ and CD8+CD28- regulatory T cells in non-small cell lung cancer patients undergoing surgery // International Immunopharmacology. – 2014. – Vol. 18. – № 2. – P. 255–261.

32. Simpson T.R., Li F., Montalvo-Ortiz W. et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma // Journal of Experimental Medicine. – 2013. – Vol. 210. – № 9. – P. 1695–1710.

## References

1. Swann J.B., Smyth M.J. Immune surveillance of tumors. J. Clin Invest. 2007; 117(5): 1137-46. doi: 10.1172/JCI31405. PMID: 17476343.

2. Galluzzi L., Buqué A., Kepp O., Zitvogel L., Kroemer G. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents Cancer Cell. 2015; 14(6): 690-714. doi: 10.1016/j.ccell.2015.10.012. PMID: 26678337.

3. Wolchok J.D., Thomas L., Bondarenko I.N., O'Day S.J., Weber J.S., Garbe C., et al. Phase III randomized study of ipilimumab (IPI) plus dacarbazine (DTIC) versus DTIC alone as first line treatment in patients with unresectable stage III or IV melanoma. J Clin Oncol. 2011. suppl., abstr LBA5.

4. Silk A.W., Bassetti M.F., West B.T., Tsien C.I., Lao C.D. Ipilimumab and radiation therapy for melanoma brain metastases. Cancer Med. 2013 Dec; 2(6): 899-906. doi: 10.1002/cam4.140. PMID: 24403263.

5. Weber J., Hamid O., Amin A., O'Day S., Masson E., Goldberg S.M., Williams D., Parker S.M., Chasalow S.D., Alaparthi S., Wolchok J.D. Randomized phase I pharmacokinetic study of ipilimumab with or without one of two different chemotherapy regimens in patients with untreated advanced melanoma. Cancer Immun. 2013 May 1; 13: 7. PMID: 23833564.

6. Wolchok J.D., Kluger H., Callahan M.K., Postow M.A., Rizvi N.A., Lesokhin A.M., Segal N.H., Ariyan C.E., Gordon R.A., Reed K., Burke M.M., Caldwell A., Kronenberg S.A., Agunwamba B.U., Zhang X., Lowy I., Inzunza H.D., Feely W., Horak C.E., Hong Q., Korman A.J., Wigginton J.M., Gupta A., Sznol M. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. N Engl J Med. 2013 Jul 11; 369(2): 122-33. doi: 10.1056/NEJMoa1302369. PMID: 23724867.

7. [Freidlin I.S. How to read an immunogram. Sorosovskii Journal. 1997; 7: 25-31. (In Russ)].

8. Yu X., Fournier S., Allison J.P., Sharpe A.H., Hodes R.J. The role of B7 costimulation in CD4/CD8 T cell homeostasis. J Immunol. 2000 Apr 1; 164(7): 3543-53. PMID: 10725709.

9. Hernberg M., Mubonen T., Pyrhonen S. Can the CD4+/CD8+ ratio predict the outcome of interferon- $\alpha$  therapy for renal cell carcinoma? Ann Oncol. 1997 Jan; 8(1): 71-77. PMID: 9093710.

10. Ibegbu C., Brodie-Hill A., Kourtis A.P., Carter A., McClure H., Chen Z.W., Nabmias A.J. Use of human CD3 monoclonal antibody for accurate CD4+ and CD8+ lymphocyte determinations in macaques: phenotypic characterization of the CD3-CD8+ cell subset. J Med Primatol. 2001 Dec; 30(6): 291-298. PMID: 11990527.

11. Grosso J.F., Jure-Kunkel M.N. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. Cancer Immun. 2013; 13: 5. Epub 2013 Jan 22. PMID: 23390376.

12. Ji R.R., Chasalow S.D., Wang L., Hamid O., Schmidt H., Cogswell J., Alaparthi S., Berman D., Jure-Kunkel M., Siemers N.O., Jackson J.R., Shababi V. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. Cancer Immunol Immunother. 2012 Jul; 61(7): 1019-31. doi: 10.1007/s00262-011-1172-6. PMID: 22146893.

13. Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F., Weber R.W., Sosman J.A., Haanen J.B., Gonzalez R., Robert C., Schadendorf D., Hassel J.C., Akerley W., van den Eertwegh A.J., Lutzky J., Lorigan P., Vaubel J.M., Linette G.P., Hogg D., Ottensmeier C.H., Lebbé C., Peschel C., Quirt I., Clark J.I., Wolchok J.D., Weber J.S., Tian J., Yellin M.J., Nichol G.M., Hoos A., Urba W.J. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med. 2010 Aug 19; 363(8): 711-23. doi: 10.1056/NEJMoa1003466. PMID: 20525992.

14. Wolchok J.D., Hodi F.S., Weber J.S., Allison J.P., Urba W.J., Robert C., O'Day S.J., Hoos A., Humphrey R., Berman D.M., Lonberg N., Korman A.J. Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. Ann N Y Acad Sci. 2013 Jul; 1291: 1-13. doi: 10.1111/nyas.12180. PMID: 23772560.

15. Senovilla L., Vacchelli E., Galon J., Adjemian S., Eggermont A., Fridman W.H., Sautès-Fridman C., Ma Y., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L. Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. Oncoimmunology. 2012 Nov 1; 1(8): 1323-1343. PMID: 23243596.

16. Gerloni M., Zanetti M. CD4 T cells in tumor immunity. Springer Semin Immunopathol. 2005 Jun; 27(1): 37-48. PMID: 15965712.
17. [Kadagidze Z.G., Borunova A.A., Chkadua G.Z., Zobotina T.N. Subpopulation of Granzyme-B<sup>+</sup> lymphocytes in patients with melanoma at vaccination. Immunology. 2008; 29(2): 87-94. (In Russ)].
18. Law R.H., Lukoyanova N., Voskoboinik I., Caradoc-Davies T.T., Baran K., Dunstone M.A., D'Angelo M.E., Orlova E.V., Coulibaly F., Verschoor S., Browne K.A., Ciccone A., Kuiper M.J., Bird P.I., Trapani J.A., Saibil H.R., Whisstock J.C. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. Nature. 2010; 468(7322): 447-51. doi: 10.1038/nature09518. PMID: 21037563.
19. Rousalova I., Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation. Int J Oncol. 2010 Dec; 37(6): 1361-78. PMID: 21042704.
20. [Borunova A.A., Chkadua G.Z., Zobotina T.N., Kadagidze Z.G. Perforin potential of effector cells in cancer patients. Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center. 2005; 3-4: 3-4. (In Russ)].
21. [Borunova A.A., Chkadua G.Z., Zobotina T.N., Arustamyan L.Yu. Perforin-mediated cytotoxicity of lymphocytes. Medical Immunology. 2005; 7(2-3): 273. (In Russ)].
22. Moretta L., Pietra G., Montaldo E., Vacca P., Pende D., Falco M., Del Zotto G., Locatelli F., Moretta A., Mingari M.C. Human NK cells: from surface receptors to the therapy of leukemias and solid tumors. Front Immunol. 2014 Mar 7; 5: 87. doi: 10.3389/fimmu.2014.00087. PMID: 24639677.
23. Zhang Y., Gallastegui N., Rosenblatt J.D. Regulatory B cells in anti-tumor immunity. Int Immunol. 2015 Oct; 27(10): 521-30. doi: 10.1093/intimm/dxv034. PMID: 25999597.
24. Váróczy L., Gergely L., Miltényi Z., Aleksza M., Illés A. Can CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> activated T cells predict the prognosis of non-Hodgkin's lymphoma patients? Immunol Lett. 2005 Feb 15; 97(1): 155-7. PMID: 15626488.
25. Rodríguez A.C., García-Piñeres A.J., Hildesheim A., Herrero R., Trivett M., Williams M., Atmella I., Ramírez M., Villegas M., Schiffman M., Burk R., Freer E., Bonilla J., Bratti C., Pinto L.A. Alterations of T-cell surface markers in older women with persistent human papillomavirus infection. Int J Cancer. 2011 Feb 1; 128(3): 597-607. doi: 10.1002/ijc.25371. PMID: 20473864.
26. Subleski J.J., Jiang Q., Weiss J.M., Willtrout R.H. The split personality of NKT cells in malignancy, autoimmune and allergic disorders. Immunotherapy. 2011 Oct; 3(10): 1167-84. doi: 10.2217/imt.11.117. PMID: 21995570.
27. Terabe M., Berzofsky J.A. The role of NKT cells in tumor immunity. Adv Cancer Res. 2008; 101: 277-348. doi: 10.1016/S0065-230X(08)00408-9. PMID: 19055947.
28. [Kadagidze Z.G., Chertkova A.I., Zobotina T.N., Korotkova O.V., Borunova A.A., Slavina E.G. The main subpopulation regulatory lymphocytes in patients with malignant melanoma and breast cancer. Immunology. 2014; 35(2): 64-67. (In Russ)].
29. Filaci G., Fenoglio D., Fravega M., Ansaldo G., Borgonovo G., Traverso P., Villaggio B., Ferrera A., Kunkl A., Rizzi M., Ferrera F., Balestra P., Ghio M., Contini P., Setti M., Olive D., Azzarone B., Carmignani G., Ravetti J.L., Torre G., Indiveri F. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. J Immunol. 2007 Oct 1; 179(7): 4323-34. PMID: 17878327.
30. Karagöz B., Bilgi O., Gümüş M., Erikçi A.A., Sayan O., Türken O., Kandemir E.G., Oztürk A., Yaylaci M. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in the peripheral blood of advanced stage lung cancer patients. Med Oncol. 2010 Mar; 27(1): 29-33. doi: 10.1007/s12032-008-9165-9. PMID: 19148592.
31. Chen C., Chen D., Zhang Y., Chen Z., Zhu W., Zhang B., Wang Z., Le H. Changes of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> regulatory T cells in non-small cell lung cancer patients undergoing surgery. Int Immunopharmacol. 2014 Feb; 18(2): 255-61. doi: 10.1016/j.intimp.2013.12.004. PMID: 24345703.
32. Simpson T.R., Li F., Montalvo-Ortiz W., Sepulveda M.A., Bergerhoff K., Arce F., Roddie C., Henry J.Y., Yagita H., Wolchok J.D., Peggs K.S., Ravetch J.V., Allison J.P., Quezada S.A. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. J Exp Med. 2013 Aug 26; 210(9): 1695-710. doi: 10.1084/jem.20130579. PMID: 23897981.