

ФЕНОТИП ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ ПОСЛЕ ИММУНОТЕРАПИИ АКТИВИРОВАННЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ

**Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Неприна Г.С., Кудрявцев Д.В.,
Кудрявцева Г.Т., Селиванова Н.В.**

ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

Резюме. Совершенствование методов лечения меланомы кожи, увеличение их эффективности и безопасности является основной медицинской проблемой в лечении меланомы. В данном исследовании адоптивная иммунотерапия с использованием активированных *in vitro* лимфоцитов была проведена 15 пациентам с метастатической меланомой. Оценен фенотип лимфоцитов периферической крови и маркеры активации (HLA-DR, CD25, CD314, CD38, CD69) до и через 3-4 недели после иммунотерапии. Показано, что для пациентов данной группы характерно повышенное содержание в кровяном русле Treg и CD25⁺ лимфоцитов, которое не изменилось и после иммунотерапии. Сопроводительная иммунотерапия в комбинации с химиотерапией привела к снижению абсолютного содержания лимфоцитов крови, В- и Т-лимфоцитов, Т-хелперов, НКТ-клеток, CD314⁺ лимфоцитов, а также CD38⁺ лимфоцитов и незрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺CD38⁺) ($p < 0,05$). Однако, наблюдалась положительная динамика в увеличении относительного содержания НК-клеток до 32% и CD69⁺ НК-клеток до 21% и значимое увеличение экспрессии HLA-DR на всех лимфоцитах ($p < 0,05$). Адоптивная иммунотерапия хорошо переносится больными, характеризуется отсутствием побочных эффектов и может рекомендоваться как сопроводительная к лучевой и химиотерапии.

Ключевые слова: адоптивная иммунотерапия, активированные лимфоциты, меланома кожи, фенотип лимфоцитов периферической крови

LYMPHOCYTE PHENOTYPE IN PATIENTS WITH SKIN MELANOMA AFTER IMMUNOTHERAPY OF ACTIVATED LYMPHOCYTES

**Abakushina E.V., Marizina Yu.V., Neprina G.S., Kudryavtsev D.V.,
Kudryavtseva G.T., Selivanova N.V.**

Medical Radiological Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation

Abstract. The major medical problem in the treatment of skin melanoma is improvement methods of treatment, increasing their effectiveness and safety. In this study, adoptive immunotherapy, using lymphocytes

Адрес для переписки:

Абакушина Елена Вячеславовна
ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр»
Министерства здравоохранения РФ
249036, Россия, Калужская область, г. Обнинск,
ул. Королева, 4.
Тел.: 8 (484) 392-96-04.
Факс: 8 (495) 956-14-40.
E-mail: abakushina@mail.ru

Address for correspondence:

Abakushina Elena V.
Medical Radiological Research Center of the Ministry of Health of
the Russian Federation
249036, Russian Federation, Kaluga Region, Obninsk, Koroleva str., 4.
Phone: 7 (484) 392-96-04.
Fax: 7 (495) 956-14-40.
E-mail: abakushina@mail.ru

Образец цитирования:

Е.В. Абакушина, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна,
Д.В. Кудрявцев, Г.Т. Кудрявцева, Н.В. Селиванова,
«Фенотип лимфоцитов у больных меланомой кожи после
иммунотерапии активированными лимфоцитами» //
Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 6. С. 567-576.
doi: 10.15789/1563-0625-2014-6-567-576

© Абакушина Е.В. и соавт., 2014

For citation:

E.V. Abakushina, Yu.V. Marizina, G.S. Neprina, D.V. Kudryavtsev,
G.T. Kudryavtseva, N.V. Selivanova, "Lymphocyte phenotype
in patients with skin melanoma after immunotherapy of activated
lymphocytes", Medical Immunology, 2014, Vol. 16, no. 6,
pp. 567-576. doi: 10.15789/1563-0625-2014-6-567-576

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2014-6-567-576>

activated *in vitro*, was performed in 15 patients with metastatic melanoma. Evaluated the phenotype of peripheral blood lymphocytes and activation markers (HLA-DR, CD25, CD314, CD38, CD69) before and 3-4 weeks after immunotherapy. It is shown that for these patients is characterized by increasing the number of CD25⁺ and Treg lymphocytes in the bloodstream, which has not changed after immunotherapy. Adoptive immunotherapy in combination with chemotherapy resulted in a decrease of absolute number of lymphocyte, B- and T-lymphocytes, T helper cells, NKT-cells, CD314⁺ lymphocytes, CD38⁺ lymphocytes and immature T-lymphocytes (CD3⁺CD38⁺) ($p < 0,05$). However, there was a positive dynamic to increase the percentage of NK-cells to 32% and CD69⁺NK-cells to 21% and significant increase in expression of HLA-DR on all lymphocytes ($p < 0.05$). Adoptive immunotherapy characterized by the absence of side effects and can be recommended as accompanying to basic radiation and chemotherapy. (*Med. Immunol.* 2014, vol. 16, N 6, pp 567-576)

Keywords: the adoptive immunotherapy, the activated lymphocytes, skin melanoma, phenotype of peripheral blood lymphocytes

Введение

Меланома кожи — пигментная злокачественная опухоль, развивающаяся из меланоцитов, вследствие своей способности к быстрому и множественному метастазированию, резистентности к лучевому лечению, лекарственным препаратам и средствам иммунотерапии на протяжении многих лет является вызовом онкологам и исследователям этой патологии. Заболеваемость меланомой кожи, а также смертность от данного заболевания ежегодно повышается во всем мире [3]. Только за предыдущие десять лет заболеваемость этой опухолью кожи возросла в 1,5 раза. В то же время наибольшее число пациентов имеет трудоспособный и социально активный возраст. Так, средний возраст больных меланомой кожи составляет $50,2 \pm 14,8$ лет, при медиане 51 год ($40_{Q_{25}}$ и $70_{Q_{75}}$ соответственно), поэтому при меланоме отмечается наибольшее число недожитых лет среди всех больных солидными опухолями [3, 22]. Данные обстоятельства придают важный социальный оттенок работам, посвященным усовершенствованию методов лечения данной патологии. Однако, применение стандартных подходов лечения меланомы кожи, включающих лучевую и химиотерапию, при малой их эффективности, часто сопровождается развитием нежелательных реакций и осложнений, приводящим, в том числе, к иммунодефицитным состояниям. Результаты исследований последних лет показывают способность опухоли привлекать клетки иммунной системы и создавать в своем микроокружении иммуносупрессивный фон, что препятствует формированию адекватного клеточного иммунного ответа [1, 7, 20]. Таким образом, усовершенствование методов лечения меланомы кожи, увеличение их эффективности и безопас-

ности является основной медицинской проблемой в лечении меланомы.

В связи с развитием молекулярной биологии и иммунологии, все большее значение в терапии онкологических заболеваний приобретают комплексные подходы с использованием методов иммунотерапии, которые направлены на активацию противоопухолевой активности и усиление эффекторного звена иммунного ответа за счет цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) и NK-клеток [5, 6, 11, 13, 15, 19]. К таким исследованиям с полным основанием можно отнести работы, связанные с развитием новых методов иммунотерапии (ИТ). Сведения о применении цитокинов, главным образом IL-2, интерферона и фактора некроза опухоли, известны еще с начала 90-х годов. В настоящее время наиболее распространенными методами лечения меланомы считаются полихимиотерапия и химиотерапия в комбинации с цитокинами интерфероном-альфа (IFN α) и/или IL-2 [2]. Рядом зарубежных ученых оценена эффективность сочетанной химиотерапии и IFN α в комбинации с IL-2 у больных с метастатической меланомой [17]. Также в качестве одного из методов иммунотерапии меланомы были предложены вакцины на основе опухолевых клеток, но для дальнейшего уточнения механизмов активации противоопухолевого ответа требуются дополнительные исследования [12]. Однако в настоящее время наиболее эффективным и перспективным методом для лечения различных форм злокачественных новообразований считается адоптивная терапия активированными цитотоксическими лимфоцитами в сочетании с цитокинами [5]. Данные виды клеток могут применяться как в неоадьювантном, так и в адьювантном режиме, а также в комбинации

с традиционными методами химио- и/или лучевой терапии и/или гипертермией при различных онкологических заболеваниях [4, 13]. Наиболее перспективным методом считается применение активированных цитотоксических лимфоцитов с ИЛ-2. Преимущество данного вида иммунотерапии объясняется прямым противоопухолевым действием активированных клеток-киллеров и их способностью лизировать опухолевые клетки.

Показано, что неoadъювантная иммунотерапия может повысить эффективность ответа на последующий курс химиотерапии, при этом индуцированный иммунотерапией Т-клеточный ответ не только не подавляется стандартными дозами химиопрепаратов, но и приводит к увеличению показателей выживаемости больных. Таким образом, предпочтительнее проводить иммунотерапию активированными клетками киллерами до начала химиотерапевтического лечения больного. Однако в клинической практике не всегда удается отложить общепринятые методы лечения, рассматриваемые как основные. В ряде случаев иммунотерапия проводится совместно с химио- и/или лучевой терапией. Фундаментальные исследования последних лет показывают, что при иммунотерапии, основанной на активированных НК-клетках и Т-клетках, больных меланомой в комбинации с химио- и/или лучевой терапией позволяет достигнуть лучших результатов в показателях выживаемости, чем при проведении монотерапии [21].

Целью настоящего исследования явилось внедрение в клиническую практику методов сопроводительной иммунотерапии с использованием активированных *in vitro* цитотоксических лимфоцитов, а также оценка субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у больных метастатической меланомой кожи и экспрессии маркеров активации лимфоцитов на этапах сопроводительной иммунотерапии.

Материалы и методы

В исследование включены 24 больных метастатической меланомой кожи IIIС(N3)-IV стадии в возрасте от 31 до 85 лет, которым в качестве базисного лечения проводилось хирургическое лечение, лучевая и/или химиотерапия. В работе у всех больных оценен фенотип В-, Т-, НКТ-, НК-лимфоцитов периферической крови и маркеры активации (HLA-DR, CD38, CD69, CD314,

CD25) до иммунотерапии и у 15 пациентов через 3-4 недели после нее. В качестве объекта исследования была использована периферическая кровь больных данной группы после получения письменного информированного согласия на данный вид лечения.

Периферические мононуклеары (ПМН) выделяли из 30 мл гепаринизированной крови на градиенте плотности (Nystopague-1077, Sigma-Aldrich, США) по стандартной методике. Лимфоциты культивировали в концентрации $1-2 \times 10^6$ кл/мл на протяжении 7-8 дней в полной питательной среде X-Vivo20 (Lonza, США) с гентамицином и L-глутамином, 5% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, Великобритания) или аутологичной сыворотки, с 250 ед/мл ИЛ-2 (ронколейкин, Биотех, Россия) и 50 нг/мл ИЛ-15 (ImmunoTools, Германия) в CO₂ инкубаторе при 37 °С. Каждые 72 часа культивирования половину питательной среды заменяли на новую. На 3, 5 и 7-8 день культивирования собирали необходимое количество клеток для иммунотерапии, центрифугировали и разводили стерильным физиологическим раствором в объеме 1-2 мл. Активированные лимфоциты в количестве 5-20 млн вводили внутрикожно паравертебрально в 4-6 точек. Фенотипирование флуоресцентно-меченых лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США) до и после иммунотерапии. Использовали конъюгированные с PE или FITC антитела к CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25, HLA-DR, CD38, CD56, CD69, CD95 (Beckman Coulter, Франция) и CD314 (eBioScience, США).

Статистический анализ данных проводили с помощью программ Microsoft Excel 2003 и Statsoft Statistica 6.0. Данные представляли как среднее по группе. Для сравнения показателей фенотипа лимфоцитов до иммунотерапии и после нее использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Первоначальной задачей исследования было определение динамики нарастания экспрессии маркеров активации на культуре периферических мононуклеаров и оценка пролиферативной активности лимфоцитов. В ходе исследования была подобрана панель маркеров активации лимфоцитов и налажен оригинальный метод культивирования лимфоцитов

с использованием полной питательной среды, содержащей ростовые факторы (инсулин, трансферин) и цитокины (IL-2 и IL-15), которые обладают стимулирующим влиянием на пролиферацию и активацию цитотоксических Т-лимфоцитов и NK-клеток. Показано, что клетки активируются уже на 3 день культивирования. Дальнейшее выращивание приводит к незначительному повышению уровня экспрессии активационных маркеров и сохраняется на протяжении 10 дней. Показано, что на 3-й день культивирования экспрессия маркеров самой ранней (CD38), ранней (CD69) и поздней активации (HLA-DR), на всех лимфоцитах в среднем увеличилась в 1,7; 5,8 и 2,3 раза соответственно. Экспрессия альфа цепи рецептора IL-2 (CD25) на лимфоцитах увеличилась в 3,2 раза до 28,3%. Среднее содержание

рецептора NKG2D (CD314) на всех лимфоцитах было 69,2% (рис. 1). Количество NK-клеток в культуре увеличилось в 2,4 раза и составило 31,3%, CTL в 3 раза и составило 41,2%, NKT-лимфоцитов в 5,8 раз и составило 16%. Таким образом, доля лимфоцитов обладающих цитотоксической активностью в культуре ПМН составила более 70%. Экспрессия маркера активации CD314⁺ на NK-клетках возросла в 2,5 раза, а CD69⁺ в 5,4 раза. Рецептор NKG2D на своей поверхности несут 79,4% из них, а рецептор CD69 – 78%. Число активированных HLA-DR⁺Т-лимфоцитов увеличилось в 3,8 раз и составило 28,2%, CD69⁺Т-лимфоцитов – в 6,6 раз до 47,6%, а незрелых CD38⁺Т-лимфоцитов – в 2,2 раза до 40,8% (рис. 1). Показано, что в культуре больший прирост и активация наблюдается у цитотоксических лимфоцитов,

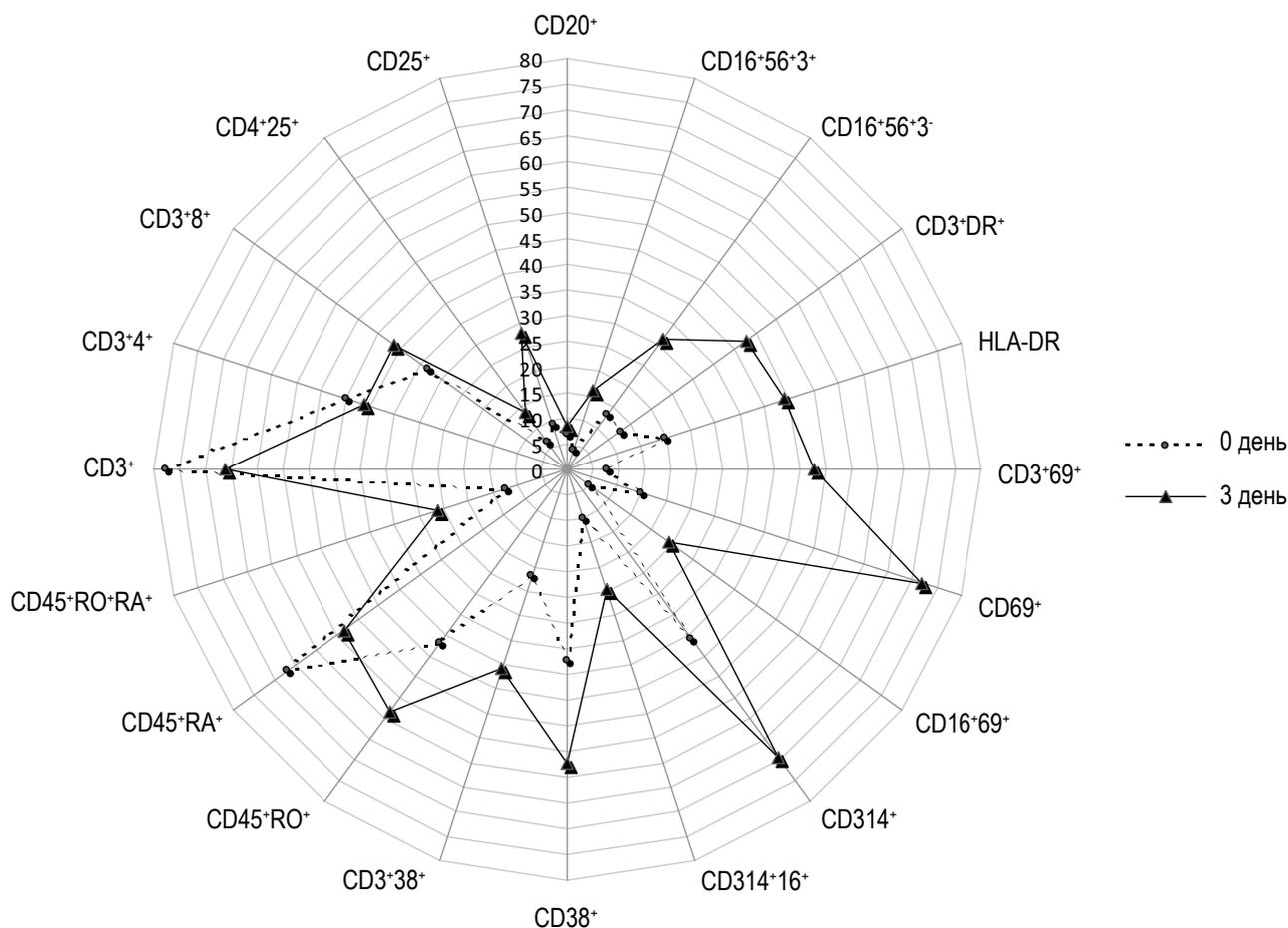


Рисунок 1. Поверхностная экспрессия CD маркеров лимфоцитов периферической крови больных метастатической меланомой сразу после выделения и через 3 дня культивирования *in vitro* (в %)

которые и будут использоваться для иммунотерапии. При выращивании ПМН увеличение количества клеток на 7 день культивирования в среднем составило 142,8%. Было показано, что лимфоциты хорошо активируются и пролиферируют *in vitro* и могут быть использованы для иммунотерапии онкологических больных.

Субпопуляционный состав лимфоцитов и экспрессия маркеров активации были оценены у 24 больных метастатической меланомой кожи до лечения. В периферической крови у данной группы больных отмечено увеличение абсолютного и относительного содержания Трег-клеток ($CD4^{+}25^{bright}$) у 50% больных (12 из 24), всех активированных лимфоцитов ($HLA-DR^{+}$) у 33% больных (8 из 24) и экспрессии альфа цепи рецептора IL-2 $CD25^{+}$ у 42% больных (10 из 24), выше верхней границы нормы [14], что подтверждает ранее полученные нами данные [8, 10]. Содержание основных субпопуляций В-, Т- и NK-лимфоцитов находилось в пределах референсных значений. Была оценена поверхностная экспрессия ранних ($CD38$, $CD69$) и поздних ($HLA-DR$, $CD25$) маркеров активации на всех лимфоцитах и на Т- ($CD3^{+}CD38^{+}$, $CD3^{+}HLA-DR^{+}$) и NK-клетках ($CD16^{+}CD69^{+}$, $CD16^{+}CD314^{+}$) (табл. 1). Экспрессия активирующего рецептора NKG2D ($CD314$) на всех лимфоцитах в среднем составила 39,56%, а на NK-клетках – 9,77%. Таким образом, в среднем 71,6% NK-клеток несут на поверхности рецептор NKG2D, а 37,2% несут $CD69$. Экспрессия специализированного рецептора $CD95$ запускающего апоптоз выявлена на 58% Т-лимфоцитов.

После оценки субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови 15 пациентам из данной группы была проведена адоптивная иммунотерапия собственными активированными *in vitro* лимфоцитами. Одному больному было сделано 3 курса, пятерым по 2 курса, остальным по 1 курсу адоптивной иммунотерапии после или на фоне стандартного химиотерапевтического лечения. Через 3-4 недели после иммунотерапии у пациентов снизилось абсолютное содержание лимфоцитов крови. Также достоверно уменьшилось и стало ниже границы нормы абсолютное и относительное количество В-лимфоцитов ($CD20^{+}$), абсолютное число Т-лимфоцитов ($CD3^{+}$), Т-хелперов ($CD3^{+}CD4^{+}$), CTL ($CD3^{+}CD8^{+}$) и NKT-клеток ($CD3^{+}CD16^{+}CD56^{+}$) ($p < 0,05$). Несмотря на это, сохранилось повышенное содержание

Трег-лимфоцитов и $CD25^{+}$ лимфоцитов, экспрессирующих альфа – цепь рецептора IL-2. Анализ индивидуальных данных пациентов выявил, что относительное количество Трег-клеток повышено у 80% (12 из 15) больных и $CD25^{+}$ лимфоцитов у 53% (8 из 15) больных. Отмечено достоверное повышение среднего уровня экспрессии позднего маркера активации $HLA-DR$ на всех лимфоцитах до 24,75% ($p < 0,05$) и на Т-клетках у 72% больных. Что касается поверхностной экспрессии маркеров активации и дифференцировки лимфоцитов, то выявлено достоверное снижение абсолютного количества $CD314^{+}$, $CD38^{+}$ лимфоцитов и $CD38^{+}$ Т-лимфоцитов ($p < 0,05$). Наблюдается некоторая положительная динамика в увеличении относительного содержания в периферической крови общего числа NK-клеток до 32% и $CD69^{+}$ NK-клеток до 21% у некоторых больных, хотя отличия от первоначальных значений не были достоверными. Экспрессия маркера апоптоза Fas ($CD95$) на всех лимфоцитах и на Т-клетках практически не изменилась после ИТ (табл. 1).

В результате проведенного лечения пациентов с метастатической меланомой через 4-6 месяцев после сопроводительной иммунотерапии активированными лимфоцитами у 53% (8 из 15) была достигнута ремиссия, у 13% больных (2 из 15) наблюдалось прогрессирование основного заболевания, а у 33% больных (5 из 15) зафиксирован летальный исход. Было замечено, что у большинства пациентов с негативным прогнозом в исходной иммунограмме отмечалось увеличение Трег-лимфоцитов и снижение маркера поздней активации $HLA-DR$ на всех лимфоцитах и/или Т-клетках. Эти изменения, возможно, связаны с длительным иммуносупрессивным воздействием опухолевых клеток на организм пациентов данной группы. В результате лечения количество Трег у части больных нормализовалось, увеличилась экспрессия $HLA-DR$ и процент NK-клеток. Однако, данные изменения не были достаточными для стабилизации онкологического процесса. У части пациентов с ремиссией основного заболевания исходно наблюдался нормальный уровень Трег, повышенное содержание $HLA-DR^{+}$ лимфоцитов и NK-клеток в периферической крови. Это может быть связано с некоторой хронической стимуляцией клеточного звена иммунитета у пациентов данной группы и меньшим супрессивным влиянием опухолевых клеток на иммунитет в целом.

ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ И МАРКЕРЫ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНМОЙ ДО И ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОТЕРАПИИ АКТИВИРОВАННЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ

	до лечения (среднее \pm SD) n = 24		через 3-4 недели после иммунотерапии (среднее \pm SD) n = 15	
	%	*10 ⁹ /л	%	*10 ⁹ /л
лимфоциты	29,63 \pm 14,17	1,89 \pm 1,04	26,10 \pm 11,39	1,21 \pm 0,61*
В-лимфоциты (CD20 ⁺)	7,20 \pm 2,76	0,14 \pm 0,10	5,68 \pm 2,91	0,07 \pm 0,07*
Т-лимфоциты (CD3 ⁺)	75,17 \pm 9,18	1,44 \pm 0,88	72,95 \pm 11,79	0,9 \pm 0,5*
Т хелперы (CD4 ⁺ CD3 ⁺)	43,60 \pm 12,30	0,84 \pm 0,61	42,40 \pm 10,22	0,52 \pm 0,31*
Treg (CD4 ⁺ CD25 ^{bright})	6,96\pm4,35	0,12\pm0,08	7,65\pm4,40	0,10\pm0,10
CTL (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	31,70 \pm 11,31	0,6 \pm 0,37	30,0 \pm 9,59	0,38 \pm 0,25*
NKT-клетки (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁺)	3,14 \pm 2,45	0,06 \pm 0,05	2,84 \pm 2,44	0,03 \pm 0,03*
NK- клетки (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁻)	14,33 \pm 7,63	0,26 \pm 0,17	16,45 \pm 8,61	0,18 \pm 0,14
Активированные Т-лимфоциты (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺)	11,43\pm7,35	0,19 \pm 0,13	15,60 \pm 7,52	0,19 \pm 0,13
Активированные лимфоциты (HLA-DR)	19,30 \pm 8,27	0,33 \pm 0,18	24,75\pm9,02*	0,30 \pm 0,19
Альфа цепь IL-2 (CD25 ⁺)	9,18\pm5,56	0,17\pm0,11	10,36\pm7,35	0,15\pm0,16
NKG2D (CD314 ⁺)	42,80 \pm 11,82	0,82 \pm 0,42	41,40 \pm 9,56	0,53 \pm 0,35*
CD16 ⁺ CD314 ⁺	11,16 \pm 6,41	0,21 \pm 0,15	11,35 \pm 7,99	0,15 \pm 0,15
CD38 ⁺	34,10 \pm 15,68	0,66 \pm 0,48	31,13 \pm 16,44	0,38 \pm 0,29*
CD3 ⁺ CD38 ⁺	18,15 \pm 13,95	0,36 \pm 0,39	13,53 \pm 9,61	0,17 \pm 0,16*
CD69 ⁺	14,48 \pm 11,0	0,26 \pm 0,24	18,76 \pm 10,06	0,22 \pm 0,17
CD16 ⁺ CD69 ⁺	5,33 \pm 4,14	0,10 \pm 0,09	7,41 \pm 5,81	0,09 \pm 0,09
Fas/APO-1 (CD95 ⁺)	53,21 \pm 21,86	0,77 \pm 0,42	55,35 \pm 19,62	0,66 \pm 0,44
CD3 ⁺ CD95 ⁺	43,67 \pm 17,61	0,64 \pm 0,34	43,65 \pm 15,81	0,54 \pm 0,39

Примечание. * – статистически значимые различия среднего содержания лимфоцитов определенного фенотипа после иммунотерапии по сравнению с группой показателей до иммунотерапии по t-критерию Стьюдента (p < 0,05). Жирным шрифтом выделены значения, превышающие референсные.

Данное исследование показало, что сопроводительная иммунотерапия активированными лимфоцитами хорошо переносится больными меланомой и характеризуется отсутствием побочных эффектов. У некоторых пациентов наблюдалось незначительное увеличение температуры до 37,5 °С на 2-3-й день после начала лечения, зуд и гиперемия в местах введения активированных лимфоцитов, что связано с адекватным иммунным ответом на введение активированных лимфоцитов. Все пациенты отмечали положительные эмоциональные сдвиги на протяжении всего курса сопроводительной ИТ, лучше переносили химиотерапию, в ряде случаев у пациентов отмечено уменьшение диспепсических явлений, нормализация стула и улучшение настроения, что говорит об улучшении их качества жизни.

Обсуждение

На основе полученных данных, можно сделать вывод о том, что для пациентов с метастатической меланомой характерно повышенное содержание Treg, CD25⁺ лимфоцитов и HLA-DR⁺ Т-лимфоцитов. Вероятно, данные изменения связаны с увеличением иммуносупрессивного действия регуляторных Т-клеток, усилением пролиферативного ответа Т-лимфоцитов через CD25 в ответ на выработку эндогенного IL-2 у больных меланомой [9]. Взаимодействие IL-2 с высокоафинным рецептором на Т-лимфоцитах является тем ключевым моментом, который обеспечивает запуск сигнальных событий, непосредственно регулирующих вступление покоящихся лимфоцитов в клеточный цикл. Повышение экспрессии молекул HLA-DR на клеточных мембранах является одним из маркеров не только поздней, но и длительной активации клеток, т.е. HLA-DR позитивные лимфоциты продолжительно циркулируют в крови, что говорит о длительности заболевания. Также через рецепторы HLA-DR реализуется механизм апоптотической гибели клеток, обеспечивая тем самым ограничение иммунного ответа у больных.

После проведения иммунотерапии в комбинации с химиотерапией у большинства пациентов наблюдалась лимфопения за счет миелотоксического воздействия химиопрепаратов. Также достоверно уменьшилось абсолютное количество В- и Т-лимфоцитов, Т-хелперов, CTL и NKT-клеток. Несмотря на это, сохрани-

лось повышенное содержание относительного и абсолютного количества Treg-лимфоцитов и CD25⁺ лимфоцитов и несколько повысилось относительное содержание NK-клеток, экспрессия поздних маркеров активации на Т-клетках и ранних маркеров активации на NK-клетках (HLA-DR⁺ и CD69⁺). Это явление, возможно, связано с более длительной циркуляцией в кровяном русле активированных Т-клеток и началом активации и пролиферации NK-клеток. Так как CD69 трансмембранный гликопротеин семейства лектинов С-типа вовлечен в процессы ранних функциональных преобразований лимфоцитов и их активацию, можно сказать, что этот процесс у больных меланомой начинается через несколько недель после иммунотерапии. Сигналы, поступающие с CD69, вызывают увеличение продукции IL-2 и количество рецепторов к нему на иммунокомпетентных клетках [16]. С этим можно связать сохранение высокого уровня поверхностной экспрессии CD25 даже на фоне лимфопении. Возможно, это связано с запуском долгосрочных каскадных реакций активации иммунитета у части больных.

Молекула CD38 представлена на поверхности клеток в период их пролиферации и дифференцировки. Этот мембранный нуклеотид-метаболизующий фермент служит также активационным поверхностным маркером зрелых клеток [9, 18]. Статистически значимое снижение CD38⁺ лимфоцитов и CD38⁺Т-лимфоцитов, возможно, связано с высокой пролиферативной активностью и промежуточным этапом созревания этих клеток, т.к. повышенная экспрессия этого маркера регистрируется на самых ранних стадиях дифференцировки лимфоцитов и возобновляется на зрелых лимфоцитах. Косвенное подтверждение полученных данных можно получить, анализируя экспрессию CD95 (Fas/APO-1) на лимфоцитах до и после иммунотерапии (табл. 1). Показано, что у большинства пациентов экспрессия данного маркера не изменяется, а это значит, что через 3-4 недели после иммунотерапии процесс дифференцировки и активация Т-лимфоцитов еще не завершена. Логическим окончанием процесса дифференцировки лимфоцитов является активационный апоптоз, когда экспрессия CD95 увеличивается в 10 раз, что в данном исследовании не наблюдалось [9].

На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что использование подхода клеточной терапии на основе активированных *in vitro*

лимфоцитов позволяет в комплексе с химиотерапией у части онкологических больных (53%) с метастатической меланомой привести к стабилизации процесса и увеличить выживаемость пациентов. Положительные отзывы всех пациентов дают основание полагать, что иммунотерапия активированными лимфоцитами может применяться для улучшения качества жизни больных меланомой. Результаты данной работы, в том

числе выявление активированных лимфоцитов в периферической крови у онкологических больных меланомой после проведения терапии аутологичными цитотоксическими лимфоцитами, позволяют рекомендовать ее в качестве сопроводительного лечения к лучевой и химиотерапии. Динамические наблюдения за фенотипом лимфоцитов могут дополнить клиническую оценку течения основного заболевания.

Список литературы / References

1. Абакушина Е.В., Кузьмина Е.Г., Коваленко Е.И. Основные свойства и функции NK-клеток человека // Иммунология, 2012. № 4. С. 220-224. [Abakushina E.V., Kuzmina E.G., Kovalenko E.I. The main characteristics of human natural killer cells. *Immunologiya = Immunology*, 2012, no. 4, pp. 220-224. (In Russ.)]
2. Закурдяева И.Г., Цыб А.Ф. Диссеминированная меланома кожи (обзор литературы) // Сибирский онкологический журнал, 2011. Т. 43, №1. С. 70-76. [Zkurdyayeva I.G., Tsyb A.F. Disseminated skin melanoma (review). *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2011, Vol. 43, no. 1, pp. 70-76. (In Russ.)]
3. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность) // Под редакцией В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2012. 260 с. [Malignancies in Russia in 2010 (morbidity and mortality). Eds.: Chissov V.I., Starinsky V.V., Petrova G.V.]. Moscow, FGBU «MNIIOI after P. A. Hertzen» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2012. 260 p.
4. Исмаил-заде Р.С., Белевцев М.В., Потапнев М.П., Савицкий В.П., Жаврид Э.А., Буглова С.Е. Иммуномодулирующее действие препаратов ИЛ-2 и ИФН- α в комбинации с сеансами общей гипертермии на этапах интенсивной химиотерапии у детей с далеко зашедшими злокачественными новообразованиями // Медицинская иммунология. 2006. Т. 8, № 4. С. 561-566. [Ismail-zade R.S., Belevtsev M.V., Potapnev M.P., Savitskiy V.P., Zhavrid E.A., Buglova S.E. IL-2 and IFN-alpha induced changes of peripheral blood lymphocyte subpopulations in children with advanced malignancies, treated with chemotherapy and whole body hyperthermia. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology*, 2006, Vol. 8, no. 4, pp. 561-566. (In Russ.)]
5. Киселевский М.В. Адоптивная иммунотерапия при злокачественных новообразованиях // Вестник Российской академии наук, 2003. №1. С. 40-44. [Kiselevskiy M.V. Adoptive immunotherapy for malignant tumors. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk = Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 2003, no. 1, pp. 40-44. (In Russ.)]
6. Козлов В.А., Черных Е.Р. Современные проблемы иммунотерапии в онкологии // Бюллетень СО РАМН, 2004. Т. 112, № 2. С. 13-19. [Kozlov V.A., Chernykh E.R. Modern problems of cancer immunotherapy. *Byulleten' SO RAMN = Bulletin SD RAMS*, Vol. 112, no. 2, 2004, pp. 13-19. (In Russ.)]
7. Кудрявцев Д.В., Мардынский Ю.С., Двинских Н.Ю., Кудрявцева Г.Т. Экспрессия Fas-рецептора (Fas) и Fas-лиганда (FasL) клетками первичной меланомы, влияние на формирование лимфоидной инфильтрации ложа опухоли и отдаленные результаты лечения // Вопросы онкологии, 2008. Т. 54, № 5. С. 582-587. [Kudryavtsev D.V., Mardynskiy Yu.S., Dvinskikh N.Yu., Kudryavtseva G.T. Relationships of Fas-receptor and Fas-ligand expression by cells of primary melanoma, effect on lymphoid infiltration through tumor bed and end results. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology*, 2004, Vol. 54, no. 5, pp. 582-587. (In Russ.)]
8. Кудрявцев Д.В., Абакушина Е.В., Неприна Г.С., Кудрявцева Г.Т., Селиванова Н.В. Опыт применения терапии лимфокин-активированными киллерами (ЛАК) в лечении метастатической меланомы кожи // Злокачественные опухоли, 2013. Т. 6, № 2. С. 142. [Kudryavtsev D.V., Abakushina E.V., Neprina G.S., Kudryavtseva G.T., Selivanova N.V. Experience of using lymphokine activated killer cells (LAK) therapy in the treatment of metastatic melanoma. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors*, 2013, Vol. 6, no. 2, p. 142. (In Russ.)]

9. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Кайгородова Е.В., Гончаров А.Г. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 1. С. 7-26. [Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sokhonevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Kaigorodova E.V., Goncharov A.G. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 7-26. (In Russ.)]
10. Маризина Ю.В., Неприна Г.С., Кудрявцев Д.В., Селиванова Н.В., Абакушина Е.В. Фенотип лимфоцитов у больных меланомой после иммунотерапии // Российский биотерапевтический журнал, 2014. Т. 13, № 1. С. 109. [Marizina Yu.V., Neprina G.S., Kudryavtsev D.V., Selivanova N.V., Abakushina E.V. Phenotype of lymphocytes in patients with melanoma after immunotherapy. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, 2014, Vol. 13, no. 1, p. 109. (In Russ.)]
11. Нехаева Т.Л. Оптимизация аутологичных дендритно-клеточных вакцин для лечения больных злокачественными новообразованиями // Сибирский онкологический журнал, 2013. Т. 57, № 3. С. 52-56. [Nekhayeva T.L. Autologous dendritic cell vaccine optimization for therapy of patients with disseminated malignant neoplasms. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2013, Vol. 57, no. 3, pp. 52-56. (In Russ.)]
12. Смирнова А.В., Лукашина М.И., Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Огородникова Е.В., Вишнякова Л.Ю., Никитин К.Д., Барышников А.Ю. Исследование роли экспрессии молекул HLA-I и HLA-II классов в активации лимфоцитов // Российский биотерапевтический журнал, 2006. Т.5, № 4. С. 8-14. [Smirnova A.V., Lukashina M.I., Mikhailova I.N., Demidov L.V., Ogorodnikova E.V., Vishnyakova L.Yu., Nikitin K.D., Baryshnikov A.Yu. Role of HLA-I and HLA-II class molecules in lymphocyte activation. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, 2006, Vol. 5, no. 4, pp. 8-14. (In Russ.)]
13. Титов К.С., Киселевский М.В., Демидов Л.В., Сельчук В.Ю., Грицай А.Н., Кучмезов Э.Х. Внутривентрикулярная биотерапия с использованием ИЛ-2 и донорских ЛАК-клеток при метастатических асцитсах у больных раком яичников // Российский биотерапевтический журнал, 2011. Т. 10, № 2. С. 51-54. [Titov K.S., Kiselevskiy M.V., Demidov L.V., Selchuk V.Yu., Gritsay A.N., Kuchmezov E.K. Intraperitoneal IL-2 and allogeneic lymphokine activated killers biotherapy of malignant peritoneal effusions in ovarian cancer patients. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, 2011, Vol. 10, no. 2, pp. 51-54. (In Russ.)]
14. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян Арег А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) // Медицинская Иммунология, 2009. Т. 11, № 2-3. С. 227-238. [Khaidukov S.V., Zurochka A.V., Totolian Areg A., Chereshnev V.A. Major and lymphocyte populations of human peripheral blood lymphocytes and their reference values, as assayed by multi-colour cytometry. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology*, 2009, Vol. 11, no. 2-3, pp. 227-238. (In Russ.)]
15. Cheng M., Chen Y., Xiao W., Sun R., Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol. Immunol.*, 2013, Vol. 3, no. 10, pp. 1-23.
16. Clausen J., Vergeiner B., Enk M., Petzer A.L., Gastl G., Gunsilius E. Functional significance of the activation-associated receptor CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. *Immunobiology*, 2003, Vol. 207, no. 2, pp. 85-93.
17. Ives N.J., Stowe R.L., Lorigan P., Wheatley K. Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: a meta-analysis of 18 trials involving 2,621 Patients. *J. Clin. Oncol.*, 2007, Vol. 25, no. 34, pp. 5426-5434.
18. Sandoval-Montes C., Santos-Argumedo L. CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T-cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines. *Leukocyte Biol.*, 2005, Vol. 77, pp. 513-521.
19. Sangiolo D., Martinuzzi E., Todorovic M., Vitaggio K., Vallario A., Jordaney N., Carnevale-Schianca F., Capaldi A., Geuna M., Casorzo L., Nash R., Aglietta M., Cignetti A. Alloreactivity and anti-tumor activity segregate within two distinct subsets of cytokine-induced killer (CIK) cells: implications for their infusion across major HLA barriers. *Int. Immunol.*, 2008, Vol. 20, no. 7, pp. 841-848.
20. Terunuma H., Deng X., Nishino N., Watanabe K. NK cells-based autologous immune enhancement therapy for cancer. *JSRM*, 2013, Vol. 9, no. 1, pp. 9-13.

21. van der Vliet H.J., Balk S.P., Exley M.A. Natural Killer T Cell–Based Cancer Immunotherapy. *J. Clin. Cancer. Res.*, 2006, Vol. 12, no. 20, pp. 5921–5923.

22. Whitaker D.K., Sinclair W. Melanoma Advisory Board. Guideline on the management of melanoma. *J. S. Afr. Med.*, 2004, Vol. 94, no. 8, pp. 699–707.

Авторы:

Абакушина Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

Маризина Ю.В. — лаборант-исследователь научно-организационного отдела ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

Неприна Г.С. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

Кудрявцев Д.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник отделения дистанционной лучевой терапии, ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

Кудрявцева Г.Т. — д.м.н., профессор, заведующая радиологическим отделением с группой лечения опухолей костей, ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

Селиванова Н.В. — научный сотрудник радиологического отделения с группой лечения опухолей костей, ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

Authors:

Abakushina E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, Medical Radiological Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation

Marizina Yu.V., Laboratory Research Assistant, Science Organization Department, Medical Radiological Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation

Neprina G.S., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, Medical Radiological Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation

Kudryavtsev D.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Remote Radiation Therapy, Medical Radiological Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation

Kudryavtseva G.T., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Radiology Department with a Group Treatment of Bone Tumors, Medical Radiological Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation

Selivanova N.V., Research Associate, Radiology Department with a Group Treatment of Bone Tumors, Medical Radiological Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation

Поступила 09.06.2014
Принята к печати 22.06.2014

Received 09.06.2014
Accepted 22.06.2014