

Ф.В. Фильчаков  
С.Н. Кукушкина  
А.Д. Лён  
Е.С. Шумилина  
С.И. Коровин  
М.Н. Кукушкина  
Т.С. Витрук

Национальный институт рака  
МЗ Украины, Киев, Украина

**Ключевые слова:** дважды позитивные Т-лимфоциты, меланома кожи, изъязвление первичной опухоли, интерферонотерапия.

## ДВАЖДЫ ПОЗИТИВНЫЕ Т-ЛИМФОЦИТЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ

**Цель:** изучить содержание дважды позитивных (ДП) Т-лимфоцитов и их субпопуляций в периферической крови больных меланомой кожи (МК) с учетом распространенности опухолевого процесса и патогистологических особенностей первичной опухоли. **Объект и методы:** обследовано 70 больных МК туловища и конечностей I–IV стадии. Содержание ДП Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD4^+CD8^+$ ) и их субпопуляций ( $CD3^+CD4^{dim}CD8^{bright}$  и  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$ ) в периферической крови изучали методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител CD3-PC5/CD4-RD1/CD8-FITC («Beckman Coulter», США). Учет результатов проводили на проточном цитофлуориметре FACScan («Becton Dickinson», США). У пациентов с МК IB–IC и IIIA–IIIB стадий (микрометастазы) проанализированы результаты адъювантной интерферонотерапии с учетом количества  $CD3^+CD4^+CD8^+$ -,  $CD3^+CD4^{dim}CD8^{bright}$ - и  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$ -лимфоцитов в периферической крови, определяемого до лечения. Период наблюдения составил 3 года. В качестве контрольной группы обследовано 37 практически здоровых людей (ПЗЛ). **Результаты:** в крови больных первично-локализованной МК абсолютное количество  $CD3^+CD4^+CD8^+$ -лимфоцитов увеличено, однако содержание  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$ - и  $CD3^+CD4^{dim}CD8^{bright}$ -клеток находится в пределах нормальных значений. С прогрессированием заболевания количество  $CD3^+CD4^+CD8^+$ -лимфоцитов уменьшается до уровня ПЗЛ, при этом развивается выраженный дефицит  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$ - и  $CD3^+CD4^{dim}CD8^{bright}$ -клеток. Высокое содержание  $CD3^+CD4^+CD8^+$ -лимфоцитов у пациентов с МК I–II стадии в большинстве случаев наблюдается при наличии изъязвления первичной опухоли и связано с увеличением количества  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$ -клеток. Количество ДП Т-лимфоцитов у больных с регионарными метастазами не зависит от биологических особенностей первичной МК, однако у пациентов с макрометастазами при наличии изъязвления опухоли существенно уменьшается количество  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$ -клеток. У больных с ремиссией до лечения выявлен повышенный уровень  $CD3^+CD4^+CD8^+$ -лимфоцитов, у пациентов с рецидивом он не отличался от такового у ПЗЛ. У больных, не проживших 3 года, до лечения регистрировали низкое содержание  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$ -клеток. **Вывод:** дальнейшее изучение ДП Т-лимфоцитов у больных МК позволит разработать потенциальные терапевтические стратегии лечения этой категории пациентов и даст возможность прогнозировать ответ на иммунотерапию.

### ВВЕДЕНИЕ

Меланома кожи (МК) — крайне гетерогенная опухоль, состоящая из большого количества клеточных субклонов с различными гено- и фенотипическими признаками [1], что обуславливает низкую чувствительность ее клеток к химиотерапевтическим агентам [2]. Особенности клинического течения, включающие случаи спонтанной регрессии, развитие аутоиммунных нарушений (в том числе на фоне иммунотерапии), а также многочисленные факты выявления у пациентов меланомаспецифических иммунных реакций указывают на важную роль иммунных механизмов в патогенезе этого за-

болевания. Вместе с тем для больных МК до сих пор не определены иммунологические параметры, на основании которых можно было бы судить о характере течения заболевания или прогнозировать риск его прогрессирования. Имеются довольно противоречивые данные о содержании основных популяций лимфоцитов в периферической крови пациентов с МК и проявлениях активационной дисфункции иммунной системы, выраженность которой зависит от стадии заболевания и биологических особенностей опухоли [3]. Описаны изменения в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов периферической крови, в том числе минорных популяций [4,

5]. В частности, исследуется роль CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (дважды позитивных — ДП) Т-лимфоцитов в патогенезе злокачественных новообразований [6].

Первоначально полагали, что одновременная экспрессия CD4- и CD8-молекул на зрелых периферических Т-клетках — взаимоисключающие события, а появление ДП Т-лимфоцитов в циркуляции объясняли выбросом незрелых CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Т-клеток из тимуса [7], предполагая их последующую дифференцировку на периферии [8]. В дальнейшем было установлено, что ДП Т-лимфоциты периферической крови отличаются от таковых в тимусе отсутствием на поверхности типичного для тимоцитов CD1-антигена [9, 10] и особенностью экспрессии корецепторов CD4 и CD8 [9]. Возможность индукции (митогенами, аллоантигенами, суперантигенами, анти-CD3/CD28 антителами) *de novo* экспрессии второго корецептора на CD4<sup>+</sup>- или CD8<sup>+</sup>-лимфоцитах свидетельствует в пользу их генерации на периферии [9, 11, 12].

Основываясь на особенности экспрессии корецепторов CD4 и CD8, выделяют несколько субпопуляций ДП Т-лимфоцитов, в их числе CD4<sup>dim</sup>CD8<sup>bright</sup>- и CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup>-клетки [13, 14]. Согласно данным A. Zloza и L. Al-Harhi [14], в состав ДП Т-клеток входят натуральные киллерные Т-клетки I и II типа, при этом в пуле CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup> Т-лимфоцитов их доля составляет около 50%. Особенностью CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup> Т-лимфоцитов является экспрессия CD8 в виде αα-гомодимера, в то время как на цитотоксических Т-клетках этот корецептор представлен αβ-гетеродимером [7].

О функции ДП Т-лимфоцитов известно мало [6, 7, 15]. В частности, показано, что большинство периферических ДП Т-лимфоцитов являются высокодифференцированными клетками памяти [15]. На их поверхности выявляют активационные маркеры (CD95, CD25, CD38, CD69) [10, 16, 17]. ДП Т-лимфоциты способны продуцировать различные цитокины (интерлейкин-5, -13, -4, -10, гамма-интерферон (ИФН), фактор некроза опухоли альфа), уровень секреции которых может превышать таковой у обычных Т-лимфоцитов, однако секреция ими интерлейкина-2 подтверждена не всеми авторами [9, 16–20]. Эти клетки обладают значительным цитолитическим потенциалом, опосредованным гранзимом и перфорином, на уровне CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов [6, 7, 9]. Мнение о ДП Т-лимфоцитах как о разновидности регуляторных клеток высказали авторы [12], изучавшие их отдельные субпопуляции. Согласно данным G. Sarrahouise и соавторов [18], CD4<sup>+</sup>CD8αα Т-клетки угнетают *in vitro* пролиферацию CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов и созревание дендритных клеток. По мнению авторов цитируемой работы, такие свойства CD4<sup>+</sup>CD8αα Т-клеток обусловлены секрецией интерлейкина-10. Подавление пролиферации Т-лимфоцитов под влиянием ДП Т-клеток было подтверждено также A. Eljaafari и соавторами [21], однако обработка антителами

к интерлейкину-10 не устраняла их ингибирующий эффект.

В периферической крови практически здоровых людей (ПЗЛ) выявляют до 3% ДП Т-лимфоцитов [7, 9]. С возрастом их количество увеличивается [22]. При различных патологических процессах и состояниях, в том числе при злокачественных новообразованиях, число ДП Т-клеток в периферической крови и/или в тканях возрастает [6]. Высокое содержание (до 18%) ДП Т-лимфоцитов с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup> выявлено у больных колоректальным раком в пуле лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль [19]. У больных раком молочной железы относительное содержание ДП Т-лимфоцитов в периферической крови соответствовало нормальным значениям [16]. Увеличение количества ДП Т-лимфоцитов в ткани опухоли при их нормальном содержании в периферической крови выявлено у пациентов с метастатической МК [17]. Согласно результатам других авторов [23], в периферической крови больных метастатической МК регистрировали увеличение числа CD4<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, коэкспрессирующих, в отличие от подобных клеток ПЗЛ, низкий уровень CD8αβ.

Изложенное выше послужило основанием для изучения содержания ДП Т-лимфоцитов и их субпопуляций в периферической крови больных МК с учетом распространенности опухолевого процесса и патогистологических особенностей первичной опухоли.

## ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 70 больных МК I–IV стадии, находившихся на лечении в отделении опухолей кожи и мягких тканей Национального института рака в 2011–2012 гг. Общая характеристика пациентов с МК представлена в табл. 1.

Таблица 1

Общая характеристика больных МК

Показатели		Количество больных, n		
		I–II стадия	III стадия	IV стадия
Пол	Женский	12	18	12
	Мужской	9	12	7
Возраст, лет	18–30	1	1	2
	31–50	6	12	8
	> 50	14	17	9
Локализация опухоли	Конечности	11	13	7
	Туловище	10	17	12
Всего		21	30	19

Критерии включения в исследование: предоставление письменного информированного согласия пациента на участие в исследовании; мужчины и женщины; возраст больных от 18 до 75 лет; локализация первичной опухоли на коже туловища и конечностей.

Критерии исключения из исследования: серьезная сопутствующая патология; наличие другого онкологического заболевания в анамнезе; для больных женского пола — беременность и лактация; для больных МК III стадии — транзитные метаста-

зы без поражения регионарных лимфатических узлов; для больных МК IV стадии — метастатическое поражение головного мозга, химиотерапия в анамнезе болезни.

Больным с клиническими признаками первично-локализованной МК для уточнения стадии заболевания выполняли биопсию «сторожевого» лимфатического узла, идентификацию которого проводили радиологическим методом с использованием радиофармпрепаратов  $^{99m}\text{Tc}$ .

Пациенты с МК I—III стадии (51 человек) были распределены по группам в зависимости от степени вовлечения регионарных лимфатических узлов в злокачественный процесс и патогистологической верификации поверхностного изъязвления первичной меланомы (табл. 2). Группа больных МК с интактными «сторожевыми» лимфатическими узлами (I—II стадия) и без изъязвления опухоли включала 15 человек, группа с изъязвлением — 6 человек. Группа пациентов с МК с микрометастазами в «сторожевых» лимфатических узлах (IIIА—IIIВ стадия) и без изъязвления опухоли состояла из 5 лиц, с изъязвлением — 7. Группы больных с регионарными макрометастазами МК (IIIВ—IIIС стадия) без и с изъязвлением первичной МК включали по 9 человек каждая.

Больные МК, которым проводили биопсию «сторожевого» лимфатического узла и верифицировали IV—IVС и IIIА—IIIВ стадии заболевания, получали хирургическое лечение (широкое иссечение первичной опухоли с отступом от края 1–2 см и использованием при необходимости кожной пластики) с последующим курсом профилактической интерферонотерапии (ИФН-терапии; рекомбинантный ИФН- $\alpha 2\text{b}$  по 3 млн МЕ 3 раза в неделю подкожно в течение 12 мес). Период наблюдения за этими пациентами составил 3 года.

В качестве контрольной группы обследовано 37 ПЗЛ.

Иммунологические исследования у больных МК проводили до лечения. Изучено содержа-

ние ДП Т-клеток ( $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{CD}8^-$ -лимфоцитов) и их субпопуляций ( $\text{CD}3^+\text{CD}4^{\text{dim}}\text{CD}8^{\text{bright}}$ - и  $\text{CD}3^+\text{CD}4^{\text{bright}}\text{CD}8^{\text{dim}}$ -лимфоцитов) в периферической крови методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител  $\text{CD}3\text{-PC}5/\text{CD}4\text{-RD}1/\text{CD}8\text{-FITC}$  («Beckman Coulter», США). Учет результатов проводили на проточном цитофлуориметре FACScan («Becton Dickinson», США) с использованием программы «Cell Quest».

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием программ Excel (MS Office 2003, XP) и Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Для определения достоверности различий ( $p$ ) между показателями в исследуемых группах использовали непараметрический критерий Манна — Уитни. Различия оценивали как достоверные при  $p < 0,05$ . Результаты исследований представлены в виде медианы и квартилей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ содержания ДП Т-лимфоцитов в периферической крови больных МК показал (табл. 3), что вне зависимости от распространенности опухолевого процесса при всех стадиях заболевания наблюдается тенденция к увеличению относительного количества  $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{CD}8^+$ -клеток, однако статистически значимых различий по сравнению с показателем у ПЗЛ не выявлено. Увеличение абсолютного количества ДП Т-лимфоцитов в циркуляции регистрируют только у пациентов с локализованной МК.

Изучение субпопуляционного состава ДП Т-лимфоцитов показало, что относительное количество  $\text{CD}3^+\text{CD}4^{\text{bright}}\text{CD}8^{\text{dim}}$ - и  $\text{CD}3^+\text{CD}4^{\text{dim}}\text{CD}8^{\text{bright}}$ -лимфоцитов в периферической крови больных при всех стадиях МК не отличается от такового у ПЗЛ. Вместе с тем при прогрессировании заболевания абсолютное количество обеих субпопуляций в циркуляции снижается: уменьшение количества  $\text{CD}3^+\text{CD}4^{\text{bright}}\text{CD}8^{\text{dim}}$ -лимфоцитов происходит уже на этапе инвазии опухоли в лимфоидную

Таблица 2

Характеристика больных МК I—III стадии

Показатели		Количество больных, n					
		I—II стадия		III стадия (микрометастазы)		III стадия (макрометастазы)	
		Изъязвление опухоли		Изъязвление опухоли		Изъязвление опухоли	
		Нет	Есть	Нет	Есть	Нет	Есть
Пол	Женский	9	3	3	5	5	4
	Мужской	6	3	2	2	4	5
Возраст, лет	18–30	1	–	–	–	1	–
	31–50	5	1	1	4	2	5
	> 50	9	5	4	3	6	4
Локализация опухоли	Конечности	8	3	2	3	2	6
	Туловище	7	3	3	4	7	3
Толщина опухоли по Breslow, мм	≤ 1,0	8	–	1	–	2	–
	1,1–2,0	6	2	–	1	1	1
	2,1–4,0	1	2	3	4	4	2
	> 4,0	–	2	1	2	2	6
Средняя толщина опухоли по Breslow, мм		1,2	3,6	3,4	3,8	2,9	4,3
Всего больных		15	6	5	7	9	9
		21		12		18	

Содержание ДП Т-лимфоцитов и их субпопуляций в периферической крови больных МК (n = 70)

Показатели	Единицы измерения	Стадия МК			ПЗЛ (n = 37)
		I–II (n = 21)	III (n = 30)	IV (n = 19)	
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	%	1,80 (1,20; 2,60)	1,60 (1,20; 2,00)	1,70 (1,40; 2,00)	1,40 (1,10; 1,80)
	· 10 <sup>9</sup> /л	0,035 (0,019; 0,044) <sup>#</sup>	0,024 (0,014; 0,035)	0,021 (0,014; 0,036)	0,023 (0,017; 0,027)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>bright</sup> CD8 <sup>dim</sup>	%	1,02 (0,34; 1,40)	0,81 (0,34; 0,98)	0,68 (0,42; 0,76)	0,80 (0,60; 1,12)
	· 10 <sup>9</sup> /л	0,016 (0,007; 0,022)	0,010 (0,005; 0,013) <sup>#*</sup>	0,009 (0,006; 0,013) <sup>#*</sup>	0,012 (0,009; 0,017)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>dim</sup> CD8 <sup>bright</sup>	%	0,25 (0,14; 0,27)	0,29 (0,16; 0,47)	0,20 (0,18; 0,26)	0,24 (0,17; 0,38)
	· 10 <sup>9</sup> /л	0,004 (0,002; 0,006)	0,004 (0,002; 0,006)	0,003 (0,002; 0,005) <sup>#</sup>	0,004 (0,003; 0,005)

<sup>#</sup>Различия при сравнении с показателем у ПЗЛ статистически достоверны (p < 0,05).

\*Различия при сравнении с показателем у больных МК I–II стадии статистически достоверны (p < 0,05).

Таблица 4

Абсолютное содержание ДП Т-лимфоцитов и их субпопуляций в периферической крови больных МК (n = 51) в зависимости от наличия изъязвления первичной опухоли

Показатели	Единицы измерения	Стадия МК						ПЗЛ (n = 37)
		I–II		III (микрометастазы)		III (макрометастазы)		
		Изъязвление опухоли		Изъязвление опухоли		Изъязвление опухоли		
		Нет (n = 15)	Есть (n = 6)	Нет (n = 5)	Есть (n = 7)	Нет (n = 9)	Есть (n = 9)	
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	· 10 <sup>9</sup> /л	0,027 (0,010; 0,044)	0,042 (0,035; 0,044) <sup>#</sup>	0,026 (0,017; 0,029)	0,031 (0,021; 0,043)	0,025 (0,022; 0,027)	0,016 (0,010; 0,018)	0,023 (0,017; 0,027)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>bright</sup> CD8 <sup>dim</sup>		0,013 (0,004; 0,020)	0,021 (0,017; 0,024) <sup>#</sup>	0,008 (0,005; 0,012)	0,009 (0,005; 0,015)	0,012 (0,011; 0,017)	0,005 (0,004; 0,008) <sup>**</sup>	0,012 (0,009; 0,017)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>dim</sup> CD8 <sup>bright</sup>		0,003 (0,002; 0,006)	0,004 (0,003; 0,005)	0,003 (0,003; 0,005)	0,004 (0,002; 0,008)	0,005 (0,004; 0,008)	0,003 (0,001; 0,006)	0,004 (0,003; 0,005)

<sup>#</sup>Различия при сравнении с показателем у ПЗЛ статистически достоверны (p < 0,05).

\*Различия при сравнении с показателем у больных без изъязвления первичной опухоли статистически достоверны (p < 0,05).

ткань, а дефицит CD3<sup>+</sup>CD4<sup>dim</sup>CD8<sup>bright</sup>-лимфоцитов проявляется при диссеминации в висцеральные органы.

При анализе иммунологических показателей в зависимости от патогистологической верификации поверхностного изъязвления первичной опухоли у больных МК с учетом состояния их регионарного лимфатического коллектора (табл. 4) выявлено, что изменение содержания ДП Т-лимфоцитов в периферической крови свойственно только больным локализованной МК с изъязвлением первичной опухоли. У этих пациентов увеличение количества ДП Т-лимфоцитов в циркуляции происходит за счет субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup>-лимфоцитов. Для больных МК с изъязвлением первичной опухоли и наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах такие изменения в содержании общей популяции ДП Т-лимфоцитов в периферической крови не характерны. Вместе с тем анализ субпопуляционного состава ДП Т-лимфоцитов показал, что в процессе прогрессирования заболевания количественные изменения претерпевает субпопуляция CD3<sup>+</sup>CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup>-лимфоцитов (рис. 1).

Как видно из данных, представленных на рис. 1, независимо от состояния регионарного лимфатического коллектора и биологических особенностей первичной опухоли содержание циркулирующих CD3<sup>+</sup>CD4<sup>dim</sup>CD8<sup>bright</sup>-лимфоцитов у больных МК находится в пределах нормальных значений, в то время как относительное количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup>-лимфоцитов существенно изменяется. Так, у пациентов с первично-локализованной МК без изъязвления первичной опу-

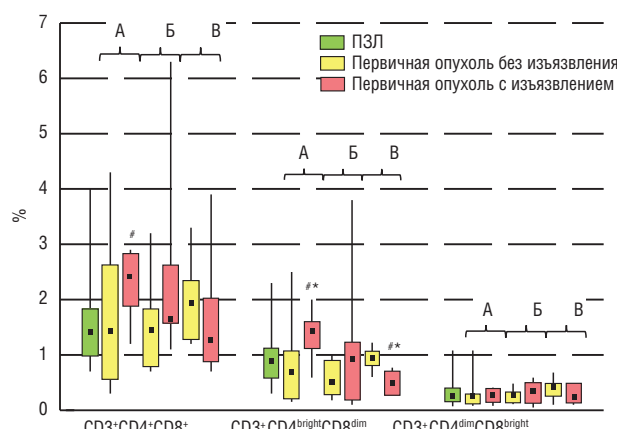


Рис. 1. Относительное содержание ДП Т-лимфоцитов и их субпопуляций в периферической крови больных МК в зависимости от наличия изъязвления первичной опухоли

<sup>#</sup>Различия при сравнении с показателем у ПЗЛ статистически достоверны (p < 0,05).

\*Различия при сравнении с показателем у больных без изъязвления первичной опухоли статистически достоверны (p < 0,05).

A — больные МК I–II стадии; B — больные МК (III стадия) с регионарными микрометастазами; C — больные МК (III стадия) с регионарными макрометастазами

холи процент CD3<sup>+</sup>CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup>-лимфоцитов в периферической крови не отличается от такового у ПЗЛ; при изъязвлении их доля существенно возрастает по сравнению с таковой у ПЗЛ и у больных без изъязвления первичной опухоли. При отсутствии изъязвления первичной опухоли у пациентов с МК с микро- или макрометастазами в регионарных лимфатических узлах, также как и у больных первично-локализованной МК, изъ-

менения относительного количества циркулирующих  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$ -клеток не наблюдаются. Напротив, у пациентов с изъязвлением первичной опухоли характер регионарного метастазирования по-разному влияет на иммунологические параметры: при микрометастазах относительное количество  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$ -лимфоцитов соответствует нормальным значениям, а при клинически определяемых метастазах их относительное и абсолютное количество существенно ниже такового не только у ПЗЛ, но и у больных без изъязвления первичной опухоли.

Убежденность в необходимости поиска иммунологических критериев для отбора пациентов, подлежащих ИФН-терапии, побудил нас оценить результаты лечения в зависимости от исходного содержания ДП Т-клеток в периферической крови больных МК. В исследование включены 25 больных, у которых после биопсии «сторожевого» лимфатического узла верифицировали ИВ–ПС (13 пациентов) или IIIA–IIIB (12 пациентов) стадию. Всем пациентам, независимо от наличия или отсутствия микрометастазов в лимфатических узлах, было проведено адъювантное лечение рекомбинантным ИФН- $\alpha 2b$  по схеме: 3 млн МЕ 3 раза в неделю подкожно в течение 12 мес. Анализ 3-летней выживаемости больных показал, что прогрессирование заболевания отмечено в 7 из 25 случаев: у 1 пациента без метастазов и у 6 пациентов с микрометастазами в регионарных лимфатических узлах. Среди них не пережили 3-летний рубеж 5 пациентов (1 с первично-локализованной МК и 4 с метастазами МК в регионарных лимфатических узлах).

В ходе анализа иммунологических параметров установлено, что у больных (ИВ–IIIB стадии) без прогрессирования заболевания в циркуляции регистрировали повышенное содержание ДП Т-лимфоцитов. При этом процент  $CD3^+CD4^+CD8^+$ -клеток значительно превышал нормальные значения (2,20 (1,50; 3,20) против 1,40 (1,10; 1,80)% у ПЗЛ;  $p = 0,004$ ), но не отличался от такового у больных с рецидивом (1,60 (1,10; 2,30)%;  $p = 0,198$ ). В то же время анализ абсолютных значений показал (рис. 2), что у больных с благоприятным течением заболевания количество ДП Т-лимфоцитов существенно превышает их уровень как у ПЗЛ, так и у больных с прогрессированием заболевания. Вместе с тем анализ субпопуляционного состава ДП Т-лимфоцитов не выявил существенных различий (данные не приведены).

В контексте проведенной ИФН-терапии представляли интерес результаты 3-летней безрецидивной выживаемости пациентов с микрометастазами МК в «сторожевых» лимфатических узлах (рис. 3, а). Как видно, исходный уровень  $CD3^+CD4^+CD8^+$ -лимфоцитов у больных без прогрессирования заболевания существенно превышал таковой у ПЗЛ (соответственно  $0,041 (0,025; 0,066) \cdot 10^9/л$

и  $0,023 (0,017; 0,027) \cdot 10^9/л$ ;  $p = 0,040$ ), однако не отличался от значений, регистрируемых до лечения у пациентов с рецидивом заболевания (соответственно  $0,041 (0,025; 0,066) \cdot 10^9/л$  и  $0,021 (0,012; 0,024) \cdot 10^9/л$ ,  $p = 0,093$ ). Следует отметить, что при анализе всей когорты пациентов с регионарными микрометастазами до лечения количество циркулирующих  $CD3^+CD4^+CD8^+$ -клеток было в пределах нормальных значений ( $0,024 (0,017; 0,044) \cdot 10^9/л$  против  $0,023 (0,017; 0,027) \cdot 10^9/л$  у ПЗЛ;  $p = 0,328$ ).

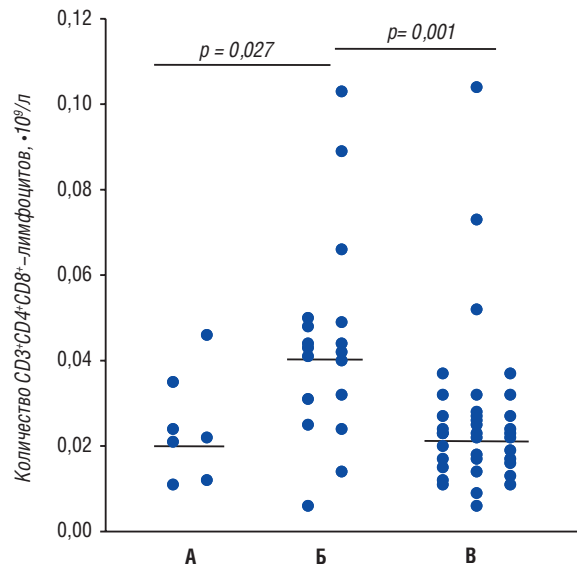
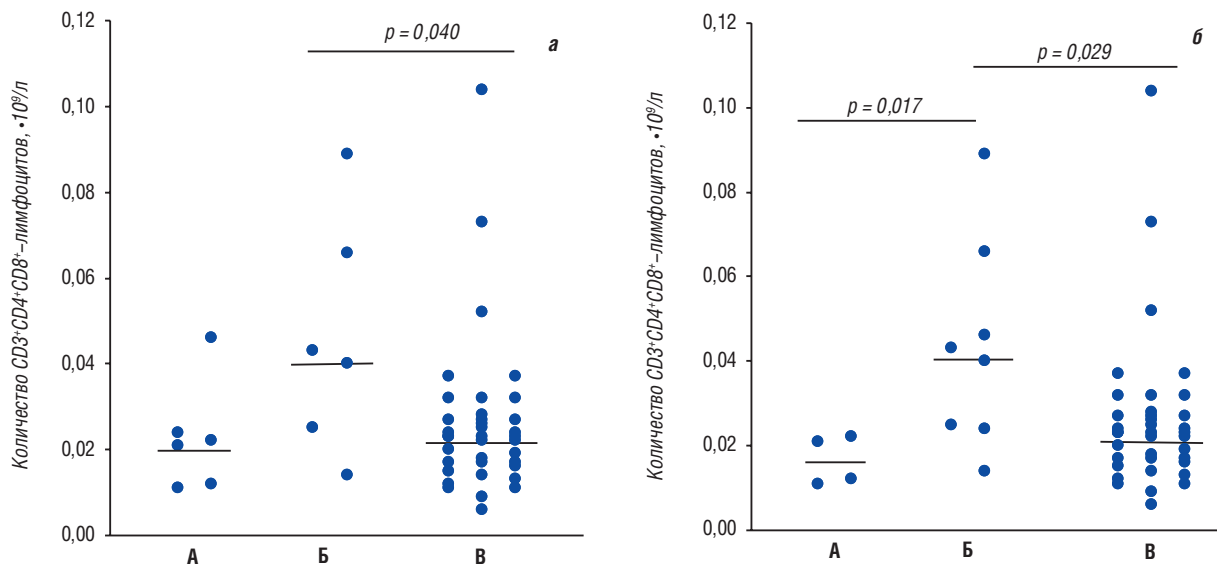


Рис. 2. Абсолютное содержание ДП Т-лимфоцитов в периферической крови у больных МК ИВ–IIIB стадии в зависимости от результатов ИФН-терапии

А — больные с рецидивом заболевания; Б — больные без прогрессирования заболевания; В — ПЗЛ

При анализе общей 3-летней выживаемости оказалось (рис. 3, б), что у больных с микрометастазами в «сторожевых» лимфатических узлах, переживших 3-летний рубеж, абсолютное количество  $CD3^+CD4^+CD8^+$ -лимфоцитов в периферической крови до лечения превышало значения как у ПЗЛ (соответственно  $0,041 (0,025; 0,056) \cdot 10^9/л$  и  $0,023 (0,017; 0,027) \cdot 10^9/л$ ;  $p = 0,029$ ), так и у больных, умерших в течение периода наблюдения (соответственно  $0,041 (0,025; 0,056) \cdot 10^9/л$  и  $0,017 (0,012; 0,021) \cdot 10^9/л$ ;  $p = 0,017$ ). До лечения в периферической крови последних выявлено низкое содержание субпопуляции  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$ -клеток ( $0,006 (0,003; 0,010) \cdot 10^9/л$  против  $0,012 (0,009; 0,017) \cdot 10^9/л$  у ПЗЛ;  $p = 0,043$ ).

По полученным данным можно заключить, что абсолютное количество ДП Т-лимфоцитов в периферической крови больных МК на ранних стадиях заболевания повышено. При этом содержание  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$ - и  $CD3^+CD4^{dim}CD8^{bright}$ -лимфоцитов находится в пределах нормальных значений, что предполагает увеличение количества  $CD3^+CD4^+CD8^+$ -лимфоцитов в циркуляции за счет других клеточных субпопуляций (в частно-



**Рис. 3.** Абсолютное содержание ДП Т-лимфоцитов в периферической крови у больных МК с микрометастазами в «сторожевых» лимфатических узлах на основании анализа 3-летней безрецидивной (а) и общей (б) выживаемости: а: А — больные с рецидивом заболевания; Б — больные без прогрессирования заболевания; В — ПЗЛ. б: А — больные, умершие в течение 3 лет; Б — больные, пережившие 3-летний рубеж; В — ПЗЛ

сти CD3<sup>+</sup>CD4<sup>dim</sup>CD8<sup>med</sup> и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>bright</sup> [14]), которые нами не изучались.

Дальнейшее прогрессирование заболевания не приводит к существенному изменению процентного содержания ДП Т-лимфоцитов в периферической крови больных МК, однако на фоне развития лимфоцитопении их абсолютное количество уменьшается до уровня у ПЗЛ, что согласуется с данными других авторов [17], изучавших содержание этих клеток у больных метастатической МК. Тем не менее, как установлено нами, у пациентов с III–IV стадией МК проявляются признаки выраженного дефицита отдельных субпопуляций ДП Т-лимфоцитов — CD3<sup>+</sup>CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup>- и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>dim</sup>CD8<sup>bright</sup>-клеток. Уменьшение количества ДП Т-лимфоцитов отдельных субпопуляций в периферической крови больных МК на поздних стадиях может быть обусловлено накоплением этих клеток в ткани опухоли. Об этом свидетельствует высокое содержание ДП Т-лимфоцитов в злокачественном плевральном экссудате у пациентов с раком молочной железы [16] и в ткани опухоли у больных метастатической МК [17].

Известно, что изъязвление первичной МК является важным прогностическим фактором высокого риска прогрессирования заболевания и в то же время выступает в качестве благоприятного предиктивного критерия эффективности ИФН-терапии [24–27]. Причем, как было показано [26], эффективность адъювантной ИФН-терапии у больных с клинически определяемыми регионарными метастазами, в отличие от больных без метастазов или с микрометастазами в «сторожевых» лимфатических узлах, не зависела от этого критерия.

В связи с этим нами изучено содержание циркулирующих ДП Т-лимфоцитов и их субпопуля-

ций у больных МК с высоким риском развития рецидива в зависимости от патогистологической верификации поверхностного изъязвления первичной опухоли с учетом состояния их регионарного лимфатического коллектора. В ходе исследования выявлено, что изъязвление первичной опухоли при I–II стадии заболевания ассоциируется с высоким содержанием CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, обусловленным увеличением численности субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup>-клеток. Возникновение микрометастазов в регионарных лимфатических узлах у пациентов с изъязвлением первичной опухоли не влияет на численность минорной популяции ДП Т-лимфоцитов в периферической крови. Напротив, у больных с изъязвлением первичной опухоли и клинически определяемыми метастазами МК в регионарных лимфатических узлах развивается выраженный дефицит CD3<sup>+</sup>CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup>-клеток в циркуляции.

Исходное содержание ДП Т-клеток в периферической крови определенным образом обуславливает эффективность адъювантного лечения у больных МК с высоким риском рецидива. Для пациентов с благоприятным течением заболевания на фоне ИФН-терапии характерно изначально высокое содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, а вероятность развития рецидива МК остается высокой при исходно нормальном уровне ДП Т-лимфоцитов. В свою очередь, в периферической крови больных, не переживших 3-летний период, регистрировали исходно малое количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup>-клеток.

Следовательно, исходно высокое содержание ДП Т-лимфоцитов в периферической крови у больных МК с изъязвлением первичной опухоли повышает вероятность ответа на ИФН-терапию с по-

следующим благоприятным течением заболевания, а исходно малое количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup>-лимфоцитов ассоциируется с неблагоприятным исходом заболевания.

## ВЫВОДЫ

1. Содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов в периферической крови больных МК с изъязвлением первичной опухоли отражает характер течения заболевания и особенности поражения регионарного лимфатического коллектора и может быть использовано в качестве дополнительного клинико-лабораторного признака инвазии опухоли в лимфоидную ткань.

2. На ранних стадиях МК регистрируют повышенное содержание циркулирующих ДП Т-лимфоцитов, а прогрессирование заболевания сопровождается их снижением за счет субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup>- лимфоцитов.

3. Повышенное содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов в периферической крови больных МК с высоким риском развития рецидива ассоциируется с лучшей выживаемостью пациентов на фоне ИФН-терапии, а исходно низкое содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>bright</sup>CD8<sup>dim</sup>-клеток — с неблагоприятным течением заболевания.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fukunaga-Kalabis M, Roesch A, Herlyn M. From cancer stem cells to tumor maintenance in melanoma. *J Invest Dermatol* 2011; **131**: 1600–4.

2. Жабина АС, Проценко СА, Ивлева АГ и др. Частота экспрессии предсказательных маркеров к цитостатику у пациентов с меланомой кожи. *Вопр онкол* 2010; **56** (6): 677–80.

3. Фильчаков ФВ, Кукушкина СН, Шумилина ЕС и др. Клинико-лабораторные критерии диагностики иммунной дисфункции у больных меланомой кожи. *Онкология* 2012; **14** (2): 139–44.

4. Re F, Donnini A, Bartozzi B, et al. Circulating  $\gamma\delta$ T cells in young/adult and old patients with cutaneous primary melanoma. *Immun Ageing* 2005; **2**: 2.

5. Van der Vliet HJJ, Koon HB, Yue SC, et al. Effects of the administration of high-dose interleukin-2 on immunoregulatory cell subsets in patients with advanced melanoma and renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 2007; **13** (7): 2010–8.

6. Overgaard NH, Jung J-W, Steptoe RJ, et al. CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J Leukoc Biol* 2015; **97** (1): 31–8.

7. Хайдуков СВ. Малые субпопуляции Т-хелперов (Th наивные тимические, Th наивные центральные, Th9, Th22 и CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> дважды положительные Т-клетки). *Мед иммунол* 2013; **15** (6): 503–12.

8. Jimenez E, Sacedon R, Vicente A, et al. Rat peripheral CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are partially immunocompetent thymus-derived cells that undergo post-thymic maturation to become functionally mature CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Immunol* 2002; **168** (10): 5005–13.

9. Quandt D, Rothe K, Scholz R, et al. Peripheral CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double positive T cells with a distinct helper cytokine profile are increased in rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2014; **9** (3): e93293.

10. Wu Y, Cai B, Feng W, et al. Double positive CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells: key suppressive role in the production of autoantibodies

in systemic lupus erythematosus. *Indian J Med Res* 2014; **140** (4): 513–9.

11. Sullivan YB, Landay AL, Zack JA, et al. Upregulation of CD4 on CD8<sup>+</sup> T cells: CD4<sup>dim</sup>CD8<sup>bright</sup> T cells constitute an activated phenotype of CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunology* 2001; **103** (3): 270–80.

12. Van Kaer L, Rabacal WAS, Algood SHM, et al. In vitro induction of regulatory CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> T cells by TGF- $\beta$ , IL-7 and IFN- $\gamma$ . *PLoS One* 2013; **8** (7): e67821.

13. Ortolani C, Forti E, Radin E, et al. Cytofluorimetric identification of two populations of double positive (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) T lymphocytes in human peripheral blood. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **191** (2): 601–9.

14. Zloza A, Al-Harhi L. Multiple populations of T lymphocytes are distinguished by the level of CD4 and CD8 coexpression and require individual consideration. *J Leukoc Biol* 2006; **79** (1): 4–6.

15. Лебедев МЮ, Шолкина МН, Живцов ОП. Содержание дубль-положительных CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в периферической крови тяжелообожженных и больных с остеомиелитом. *Фундаментальные исследования* 2013; **12**: 45–8.

16. Desfrancois J, Derre L, Corvaisier M, et al. Increased frequency of nonconventional double positive CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  cells in human breast pleural effusions. *Int J Cancer* 2009; **125** (2): 374–80.

17. Desfrancois J, Moreau-Aubry A, Vignard V, et al. Double Positive CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cells: a new tumor-reactive population in human melanomas. *PLoS One* 2010; **5** (1): e8437.

18. Sarabayrouse G, Bossard C, Chauvin JM, et al. CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha\alpha$  lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease. *PLoS Biol* 2014; **12** (4): e1001833.

19. Sarabayrouse G, Corvaisier M, Ouisse L, et al. Tumor-reactive CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ T cells: a prevalent tumor-reactive T-cell subset in metastatic colorectal cancers. *Int J Cancer* 2011; **128** (12): 2923–32.

20. Pahar B, Lackner AA, Veazey RS. Intestinal double-positive CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells are highly activated memory cells with an increased capacity to produce cytokines. *Eur J Immunol* 2006; **36** (3): 583–92.

21. Eljaafari A, Yuruker O, Ferrand C, et al. Isolation of human CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> double-positive, graft-versus-host disease-protective, minor histocompatibility antigen-specific regulatory T cells and of a novel HLA-DR7-restricted HY-specific CD4 clone. *J Immunol* 2013; **190** (1): 184–94.

22. Ghia P, Prato G, Stella S, et al. Age-dependent accumulation of monoclonal CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double positive T lymphocytes in the peripheral blood of the elderly. *Br J Haematol* 2007; **139** (5): 780–90.

23. Romero AI, Chaput N, Poirier-Colame V, et al. Regulation of CD4<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> Th1 cells in patients with metastatic melanoma treated with sorafenib: role of IL-15R $\alpha$  and NKG2D triggering. *Cancer Res* 2014; **74** (1): 68–80.

24. McMasters KM, Edwards MJ, Ross MI, et al. Ulceration as a predictive marker for response to adjuvant interferon therapy in melanoma. *Ann Surg* 2010; **252** (3): 460–5.

25. Eggermont AM, Spatz A, Lazar V, et al. Is ulceration in cutaneous melanoma just a prognostic and predictive factor or is ulcerated melanoma a distinct biologic entity? *Curr Opin Oncol* 2012; **24** (2): 137–40.

26. Eggermont AM, Suci S, Testori A, et al. Ulceration and stage are predictive of interferon efficacy in melanoma: results of the phase III adjuvant trials EORTC 18952 and EORTC 18991. *Eur J Cancer* 2012; **48** (2): 218–25.

27. Suci S, Ives N, Eggermont AM, et al. Predictive importance of ulceration on the efficacy of adjuvant interferon- $\alpha$  (IFN): an individual patient data (IPD) meta-analysis of 15 randomized trials in more than 7,500 melanoma patients (pts). *J Clin Oncol* 2014; **32** (15 suppl): 9067.

## PERIPHERAL BLOOD DOUBLE POSITIVE T LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH CUTANEOUS MELANOMA

F.V. Fil'chakov, S.M. Kukushkina, G.D. Lon,  
K.S. Shumilina, S.I. Korovin, M.M. Kukushkina,  
T.S. Vitruk

**Summary.** *The purpose of the work was to study contents of double positive (DP) T lymphocytes and their subsets in peripheral blood in cutaneous melanoma patients in view of prevalence of tumoral process and pathohistology features primary tumor. **Materials and methods:** the study was performed in 70 patients with stages I–IV cutaneous melanoma of trunk and extremities. The phenotype of DP T lymphocytes ( $CD3^+CD4^+CD8^+$ ) and their subsets ( $CD3^+CD4^{dim}CD8^{bright}$  and  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$ ) in peripheral blood was determined by flow cytometry using monoclonal antibodies CD3-PC5/CD4-RD1/CD8-FITC («Beckman Coulter», USA). Data acquisition and analysis were performed using FACScan flow cytometer («Becton Dickinson», USA) and CellQuest software. The results of adjuvant interferon therapy of stages IB–IIC and IIIA–IIIB (micrometastases) melanoma patients have been analysed in view of pretreatment contents of  $CD3^+CD4^+CD8^+$ ,  $CD3^+CD4^{dim}CD8^{bright}$  and  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$  lymphocytes in peripheral blood. The period of supervision lasted 3 years. The control group included 37 healthy subjects. **Results:** it was revealed that absolute count of peripheral blood  $CD3^+CD4^+CD8^+$  lymphocytes was increased in localized melanoma patients, however content of peripheral blood  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$  and  $CD3^+CD4^{dim}CD8^{bright}$  lymphocytes was recorded at the normal level. During disease count of  $CD3^+CD4^+CD8^+$  lymphocytes*

*was decreased to healthy subject level, thus deficiency of  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$  and  $CD3^+CD4^{dim}CD8^{bright}$  lymphocytes developed. Increased count of  $CD3^+CD4^+CD8^+$  lymphocytes in stages I–II melanoma patients was observed in most cases with presence primary tumor ulceration and it was connected to increase of count of  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$  lymphocytes. The content of DP T lymphocytes didn't depend on biological features of primary tumor in regional micrometastatic melanoma patients, however number of  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$  lymphocytes was reduced in macrometastatic melanoma patients with ulcerated tumor. The analysis of interferon therapy results has shown that pretreatment level of peripheral blood  $CD3^+CD4^+CD8^+$  lymphocytes was increased in patients with remission of diseases while it did not differ in patients with relapse vs healthy subjects. Also it was found that pretreatment content of  $CD3^+CD4^{bright}CD8^{dim}$  lymphocytes in patients which died during 3 years was decreased. **Conclusion:** further study of DP lymphocytes in cutaneous melanoma patients will allow to understand better the potential therapeutic strategies of treatment for these patients and provide the ability to predict response to immunotherapy.*

**Key Words:** double positive T lymphocytes, cutaneous melanoma, primary tumor ulceration, interferon therapy.

### Адрес для переписки:

Фильчаков Ф.В.

03022, Киев, ул. Ломоносова, 33/43

Национальный институт рака

E-mail: labklimmun@i.ua

Получено: 04.05.2016