

## ОСОБЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО НА ФОНЕ ПРОВОДИМОЙ ИММУНОТЕРАПИИ С РАЗЛИЧНОЙ ЕЕ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ

Сагакянц А.Б.<sup>1</sup>, Теплякова М.А.<sup>1</sup>, Владимирова Л.Ю.<sup>1</sup>, Бондаренко Е.С.<sup>1</sup>,  
Златник Е.Ю.<sup>1</sup>, Новикова И.А.<sup>1</sup>, Дженкова Е.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: teplyakova0308@gmail.com

**Цель:** изучить особенности клеточных показателей периферической крови больных для прогнозирования ответа на лечение НМРЛ препаратами ИКТ. Исследовались образцы периферической крови 30 пациентов с верифицированным диагнозом «немелкоклеточный рак легкого», получивших лечение с использованием анти-PD-1 терапии (пембролизумаб и ниволумаб). В зависимости от ответа на лечение больные были разделены на две группы: 1-я группа – общий ответ (n=23), 2-я группа – прогрессирование заболевания (n=7). В образцах крови, полученных до начала терапии, после 4-го и 8-го курса терапии, методом проточной цитометрии определяли относительное содержание основных и минорных популяций иммунокомпетентных клеток. У больных НМРЛ прогрессирование заболевания на фоне иммунотерапии характеризуется увеличением уровней Treg и DN T-клеток при отсутствии изменений количества эффекторных клеток врожденного и адаптивного иммунитета, включая активированные и клетки памяти, а также снижением содержания В-лимфоцитов при увеличении процента «истощенной» (CD19+CD86+) и апоптотической (CD19+CD95+) субпопуляций. Ответ на иммунотерапию при НМРЛ связан с увеличением в крови числа лимфоцитов, моноцитов, активированных В-лимфоцитов (CD19+CD25+), снижением количества CD4+ и CD8+ лимфоцитов, включая активированные, «наивных» CD8+ и NKT-лимфоцитов при возрастании процента DN клеток и цитотоксических CD8+ клеток эффекторной памяти. В качестве потенциально прогностически значимых показателей положительного ответа на ингибиторы PD-1 у больных НМРЛ можно рассматривать уровни DN, CD4+, CD8+, выше 29%, 31% и 41% соответственно, CD8+naïv, CD4+CD62L+, CD19+CD86+, NKT клеток ниже 62%, 63%, 73% и 51% соответственно.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, ингибиторы контрольных точек, клеточный иммунитет, лимфоциты.

## FEATURES OF THE POPULATION REMAINING OF PERIPHERAL BLOOD IMMUNE CELLS IN PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER DURING IMMUNOTHERAPY WITH DIFFERENT EFFECTIVENESS

Sagakyants A.B.<sup>1</sup>, Teplyakova M.A.<sup>1</sup>, Vladimirova L.Yu.<sup>1</sup>, Bondarenko E.S.<sup>1</sup>, Zlatnik E.U.<sup>1</sup>,  
Novikova I.A.<sup>1</sup>, Dzhenkova E.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution «National medical research centre for oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation («National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia»), Rostov-on-Don, e-mail: teplyakova0308@gmail.com

**The aim:** To study the characteristics of cellular parameters of peripheral blood of patients to predict the response to NSCLC treatment with ICI drugs. Peripheral blood samples from 30 patients with a verified diagnosis of non-small cell lung cancer treated with anti-PD-1 therapy (pembrolizumab and nivolumab) were studied. Depending on the response to treatment, the patients were divided into two groups: 1st general response (n=23), 2nd disease progression (n=7). In blood samples obtained before the start of therapy, after the 4th and 8th courses of therapy, the relative content of the main and minor populations of immunocompetent cells was determined by flow cytometry. In patients with NSCLC, the progression of the disease on the background of immunotherapy is characterized by an increase in the levels of Treg and DN T-cells in the absence of changes in the number of effector cells of innate and adaptive immunity, including activated and memory cells, as well as a decrease in the content of B-lymphocytes with an increase in the percentage of «depleted» (CD19+ CD86+) and apoptotic (CD19+CD95+) subpopulations. The response to immunotherapy in NSCLC is associated with an increase in the number of lymphocytes, monocytes, activated B-lymphocytes (CD19 + CD25 +) in the blood, a decrease in the number of CD4 + and CD8 + lymphocytes, including activated, «naïve» CD8 + and NKT lymphocytes with an increase in the percentage of DN cells and cytotoxic CD8+ effector memory cells. As potentially prognostically significant

indicators of a positive response to PD-1 inhibitors in patients with NSCLC, we can consider the levels of DN, CD4+, CD8+, above 29%, 31% and 41%, respectively, CD8+naiv, CD4+CD62L+, CD19+CD86+, NKT cells are below 62%, 63%, 73% and 51%, respectively.

Keywords: non-small cell lung cancer, checkpoint inhibitors, cellular immunity, lymphocytes.

*Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания по теме «Разработка прогностических и предиктивных алгоритмов на основе выявления новых иммунологических и молекулярно-генетических характеристик злокачественных опухолей и их микроокружения», рег. №121031100251-9.*

За последнее десятилетие иммунотерапевтические стратегии, нацеленные на белки иммунных контрольных точек, такие как запрограммированная гибель-1 (PD-1)/лиганд запрограммированной гибели-1 (PD-L1), изменили парадигму лечения рака легкого [1]. В нескольких знаковых рандомизированных контролируемых исследованиях фазы III была рекомендована монотерапия ингибиторами контрольных точек (ИКТ) в качестве стандартной терапии второй линии для пациентов с распространенным немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) [2, 3]. По сравнению с традиционной химиотерапией лечение ИКТ привело к увеличению выживаемости у части пациентов с распространенным НМРЛ. Исторически 5-летняя общая выживаемость (ОВ) пациентов с раком легкого IV стадии составляет всего 6% [4]. Интересно, что результаты 5-летнего наблюдения в исследовании CA209-003 продемонстрировали 5-летнюю выживаемость в 16% случаев у ранее пролеченных пациентов с распространенным НМРЛ, получавших ниволумаб [5]. Пембролизумаб также улучшал ОВ как у пациентов с распространенным НМРЛ, ранее не получавших лечения 23,2% [6]. Примечательно, что среди пациентов с показателем PD-L1 (TPS)  $\geq 50\%$  примерно треть пациентов, ранее не получавших лечения, и четверть пациентов, ранее получавших лечение, добились улучшения долгосрочной выживаемости с показателями 5-летней выживаемости 29,6% и 25,0% соответственно [6]. В совокупности успешное введение ИКТ для лечения пациентов с метастатическим раком легкого произвело революцию в терапевтическом ландшафте пациентов с этим злокачественным заболеванием и привело к стойкому ответу и долгосрочной выживаемости у части пациентов.

Цель исследования: изучить особенности клеточных показателей периферической крови больных для прогнозирования ответа на лечение НМРЛ препаратами ИКТ.

**Материалы и методы исследования.** В исследование включены данные о 30 пациентах с верифицированным диагнозом «генерализованный НМРЛ», получивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии» МЗ РФ с 2019 по 2021 гг. Средний возраст больных составил 61

год. Лечение пациентов проводили с применением анти-PD-1 терапии (пембролизумаб 200 мг в/в, цикл 21 день, или ниволумаб 480 мг в/в, цикл 28 дней) до появления достоверных признаков прогрессирования процесса или непереносимой токсичности лечения. В зависимости от ответа на лечение больные были поделены на две группы: 1-я группа – общий ответ (n=23), 2-я группа – прогрессирование заболевания (n=7). Образцы КзЭДТА-крови пациентов для определения клеточных параметров иммунитета получали до начала лечения; после проведения 4 курсов терапии и после проведения 8-го курса иммунотерапии.

В соответствии с инструкцией фирмы-производителя (Becton Dickinson, США) осуществляли окрашивание образцов крови. На каждого обследованного приходилось 7 пробирок со следующими наборами моноклональных антител:

CD3 FITC /CD15+56 PE /CD45 PerCP /CD4 PE-Cy7/CD19 APC/CD8 APC-Cy7.

CD45RA FITC/CD62L PE/CD3 PerCP/CD4 PE-Cy7/CD45RO APC/CD45 APC-Cy7.

CD4 FITC /CD127 PE /CD3 PerCP /CD25 APC-Cy7.

CD4 FITC /CD38 PE /CD3 PerCP /HLADR APC.

TCR $\alpha\beta$  FITC/TCR $\gamma\delta$  PE/ CD3 PerCP /CD8 PE-Cy7/CD45 APC-Cy7.

CD19 FITC/CD86 PE/ CD20 PerCP-Cy5.5/CD95 APC/CD25 APC-Cy7.

CD279 FITC/CD274 PerCP-Cy5.5/CD4 PE-Cy7/CD3 APC/CD45 APC-Cy7

Измерения проводились на проточном цитометре FACS Canto II (Becton Dickinson, США). В каждом образце для анализа данных накапливали не менее 50 000 клеток. Результаты определения указанных популяций и субпопуляций клеток выражали в процентах от общего количества лимфоцитов, T-regs – в процентах от CD3+CD4+ клеток.

Формирование первичной базы данных, содержащей количественные значения определяемых параметров, осуществляли с использованием пакета программ MS Office Excel 2016. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета STATISTICA 13,3 (StatSoft Inc., США), что предполагало расчет основных статистических характеристик выборок, определение характера распределения определяемых показателей с использованием критерия Шапиро–Уилка. В связи с тем, что полученные результаты не соответствовали нормальному распределению, они представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха – 25-го и 75-го перцентилей (Me [LQ; UQ]). Достоверность отличий между выборками оценивалась с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Результаты будут считаться статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Накопленный к настоящему времени практический опыт использования новых терапевтических подходов к лечению больных раком легкого, предполагающих использование ингибиторов контрольных точек, показывает, что далеко не у всех пациентов

наблюдается ответ на терапию. Проведение иммунотерапии у 30 больных НМРЛ позволило получить у 23 пациентов (77%) ответ на лечение, что сопровождалось такими клиническими проявлениями, как стабилизация или полный ответ. В соответствии с рассматриваемыми механизмами действия препаратов данной группы можно заключить, что в наблюдаемый клинический эффект вносят изменения функциональной активности иммунокомпетентных клеток.

У больных *первой группы* с ответом на проводимую ИТ после 4-го курса в периферической крови не выявлено значимых изменений по сравнению с исходными значениями относительного количества большинства определяемых основных популяций ИКТ (рис. 1А, 1Б), за исключением увеличения на 29% ( $p=0,046$ ) DP-лимфоцитов и снижения количества НКТ лимфоцитов на 51% ( $p=0,025$ ) по сравнению с значениями до начала терапии (рис. 1Б).

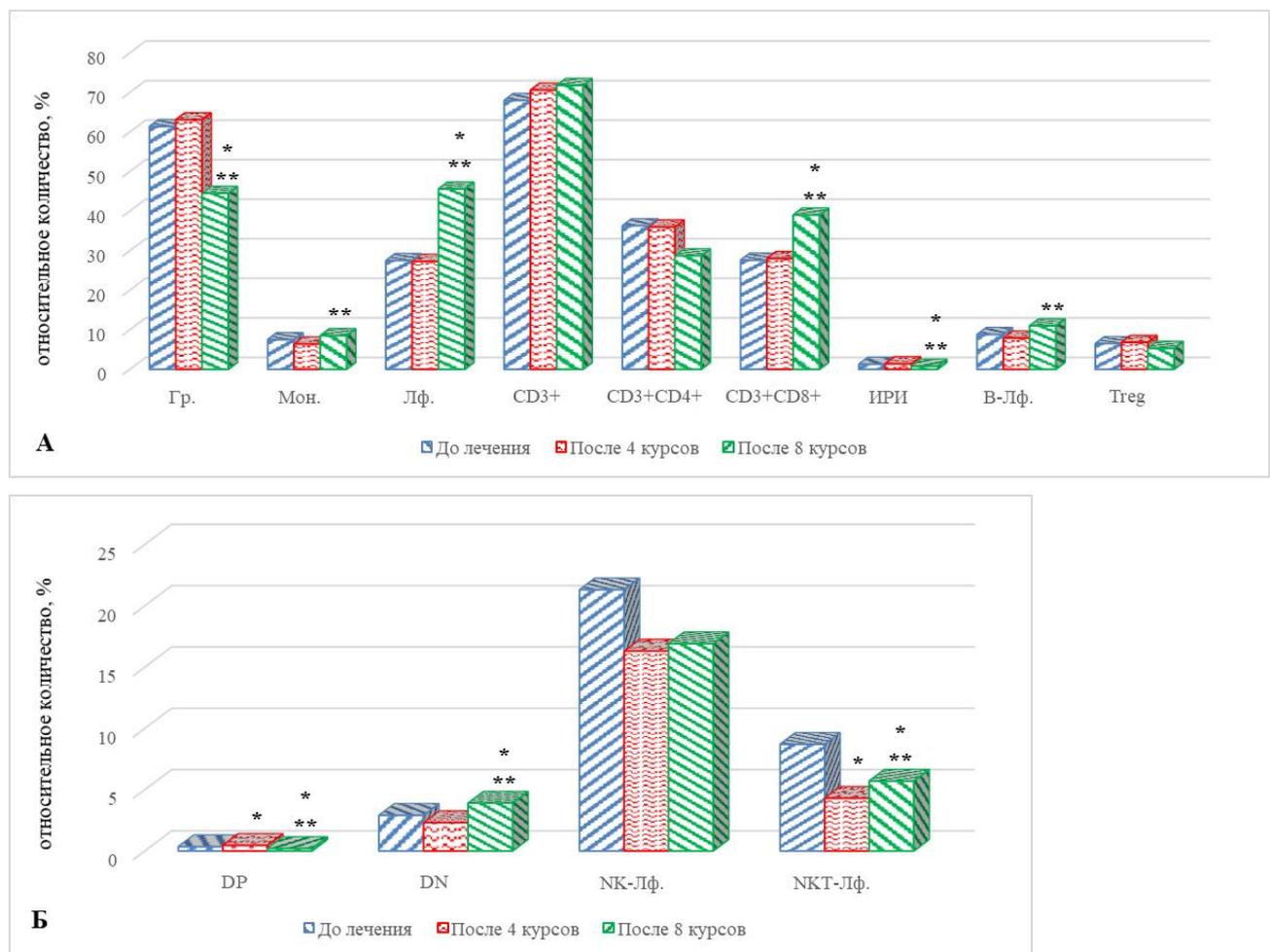


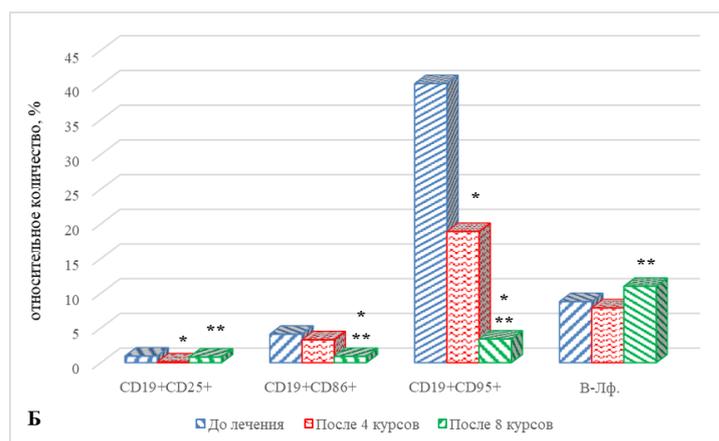
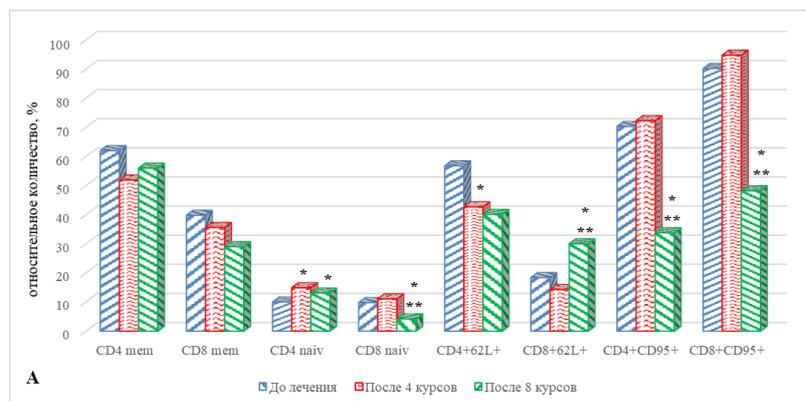
Рис. 1. Особенности параметров клеточного иммунитета больных с НМРЛ в ходе проводимой иммунотерапии: группа 1 – ответ на терапию;

\* – статистически значимо по сравнению со значением показателя до лечения;

\*\* – статистически значимо по сравнению со значением показателя после 4-го курса ИТ

В результате проведенного исследования обнаружено статистически значимое увеличение на 49% ( $p=0,043$ ) содержания наивных CD4+ Т-лимфоцитов (рис. 2А), сочетаемое с выраженным снижением ряда субпопуляций В-лимфоцитов: на 89% ( $p=0,033$ ) CD19+CD25+ В-лимфоцитов и на 53% ( $p=0,027$ ) CD19+CD95+ В-лимфоцитов, по сравнению с показателем до проведения терапии (рис. 2Б), что, вероятно, может указывать на определенные изменения в периферической крови В-лимфоцитов, находящихся на различных этапах дифференцировки и реализации функциональной активности, связанной с продукцией антиген-специфических антител на фоне проводимого лечения.

В рассматриваемые сроки терапии большая часть субпопуляций Т-лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации не претерпевала изменений, за исключением статистически значимого увеличения на 83% ( $p=0,038$ ) количества цитотоксических Т-лимфоцитов с маркерами поздней активации CD8+CDHLA-DR+ по сравнению с исходными показателями (рис. 2В).



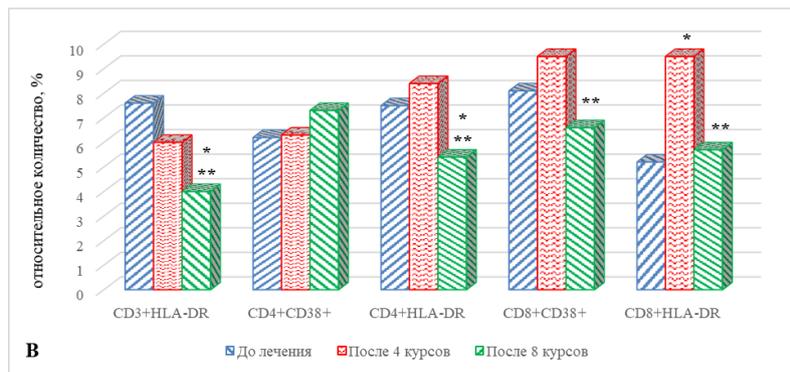


Рис. 2. Особенности параметров клеточного иммунитета больных с НМКРЛ в ходе проводимой иммунотерапии: группа I – ответ на терапию;

\* – статистически значимо по сравнению со значением показателя до лечения;

\*\* – статистически значимо по сравнению со значением показателя после 4-го курса ИТ

Определение выбранных показателей периферической крови после проведения 8 курсов терапии выявило ряд изменений в содержании основных популяций ИКК. По сравнению с исходными значениями, до начала проведения терапии, выявлено значимое увеличение общего количества лимфоцитов, главным образом за счет увеличения CD8+ цитотоксических лимфоцитов, данные показатели превышали исходные соответственно на 66% ( $p=0,034$ ) и 41% ( $p=0,039$ ). В условиях увеличения содержания ЦТЛ без изменения уровня Т-лимфоцитов хелперов наблюдается закономерное снижение ИРИ на 38% ( $p=0,047$ ). Кроме того, отмечено снижение количества гранулоцитов на 28% ( $p=0,041$ ) (рис. 1А). При этом наблюдаются увеличение на 29% ( $p=0,046$ ) содержания DP-лимфоцитов, а также значимое снижение на 51% ( $p=0,025$ ) НКТ-клеток (рис. 1Б).

При сравнении полученных значений в рассматриваемые сроки наблюдения определяемых показателей с их уровнем после 4-го курса ИТ выявлено увеличение ряда основных популяций ИКК. В частности, в данные сроки наблюдения увеличивалось количество моноцитов, лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов соответственно на 33% ( $p=0,04$ ), 67% ( $p=0,035$ ), 39% ( $p=0,041$ ) и 39% ( $p=0,045$ ). На этом фоне количество гранулоцитов и ИРИ оказалось ниже значений соответствующих показателей после 4 курсов ИТ соответственно на 29% ( $p=0,042$ ) и 43% ( $p=0,041$ ) (рис. 1А). Обращает на себя внимание разнонаправленный характер изменения содержания предшественников Т-лимфоцитов: если число DP-лимфоцитов оказалась ниже на 56% ( $p=0,034$ ), то число DN-клеток, напротив, было выше на 70% ( $p=0,039$ ), на фоне чего количество НКТ-лимфоцитов также повышалось на 33%,  $p=0,045$  (рис. 1Б).

Значимым оказалось увеличение на 31% ( $p=0,045$ ) количества наивных CD4+ Т клеток, а также на 63% ( $p=0,027$ ) CD8+ клеток эффекторной памяти. На фоне отмеченных изменений

значимым является снижение целого ряда показателей: CD8+ наивных Т-лимфоцитов – на 57% ( $p=0,021$ ), CD4+ клеток эффекторной памяти – на 29% ( $p=0,042$ ), CD4+CD95+ и CD8+CD95+ лимфоцитов, соответственно на 52% ( $p=0,023$ ) и 47% ( $p=0,047$ ). Отмечено снижение относительного содержания ряда субпопуляций В-лимфоцитов: CD19+CD86+ клеток – на 78%,  $p=0,031$ , а CD19+CD95+В-лимфоцитов – на 91%,  $p=0,029$  (рис. 2А, 2Б).

При сравнении полученных результатов с аналогичными показателями после проведения 4 курсов терапии обнаружено значимое увеличение относительного количества CD8+ Т-лимфоцитов эффекторной памяти и CD19+CD25+ клеток – соответственно на 110% ( $p=0,021$ ) и в 7 раз ( $p=0,0001$ ). Выявлено значимое снижение ряда других субпопуляций лимфоцитов: наивных CD8+ Т клеток – на 62%,  $p=0,021$ , CD4+CD95+ и CD8+CD95+ лимфоцитов – соответственно на 53% ( $p=0,021$ ) и 49% ( $p=0,021$ ) (рис. 2А). Кроме того, выявлено снижение CD19+CD86+ и CD19+CD95+ популяций В-лимфоцитов – соответственно на 73% ( $p=0,034$ ) и на 82%,  $p=0,032$  (рис. 2Б).

В случае определения отдельных популяций лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации после проведения 8 курсов терапии и их сравнения с аналогичными показателями до начала лечения значимым оказалось снижение на 47% ( $p=0,036$ ) и 28% ( $p=0,047$ ) соответственно CD3+ Т-лимфоцитов и CD4+ Т-лимфоцитов с маркерами поздней активации. При этом при сравнении полученных результатов со значениями показателей после 4 курсов лечения обнаружено снижение содержания CD3+, CD4+ и CD8+ клеток с маркерами поздней активации соответственно на 33% ( $p=0,045$ ), 36% ( $p=0,044$ ) и 40% ( $p=0,044$ ), а также на 31% ( $p=0,042$ ) CD8+CD38+ Т-лимфоцитов (рис. 2В).

Известно, что применение ингибиторов контрольных точек при лечении рака легкого не во всех случаях сопровождается положительным результатом. В нашем исследовании у 7 больных наблюдалось прогрессирование заболевания. В связи с этим определенный интерес представляет рассмотрение особенностей иммунологических показателей у пациентов данной группы.

В результате проведенного исследования выявлено, что у пациентов *второй группы* после проведения как 4, так и 8 курсов терапии не наблюдается значимых отличий от аналогичных показателей до начала лечения в случае большинства показателей, за исключением выраженного увеличения содержания Treg, DP- и DN-лимфоцитов, количество которых оказалось выше относительно всех рассматриваемых сроков соответственно на 30% ( $p=0,046$ ) и 42% ( $p=0,042$ ), 80% ( $p=0,037$ ) и 87% ( $p=0,031$ ), 35% ( $p=0,045$ ) и 70% ( $p=0,039$ ) (рис. 3А, 3Б).

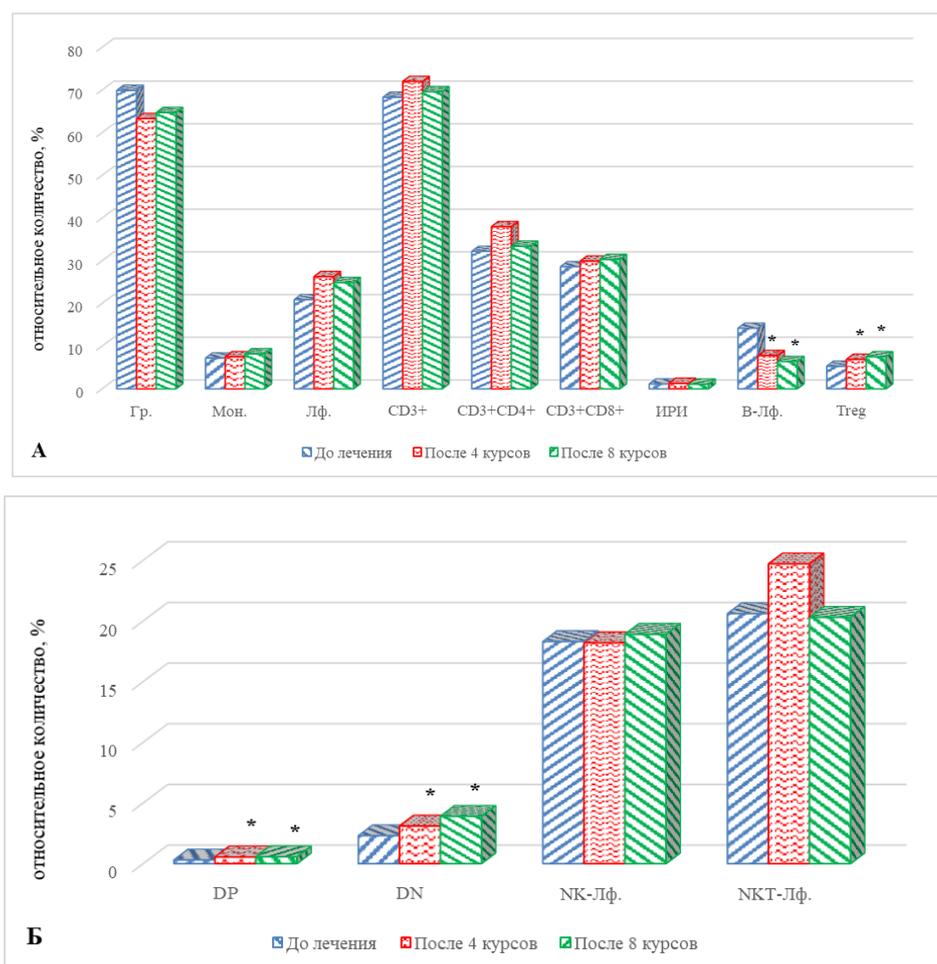


Рис. 3. Особенности параметров клеточного иммунитета больных раком легкого в ходе проводимой иммунотерапии: группа 2 – прогрессия

\* – статистически значимо по сравнению со значением показателя до лечения;

\*\* – статистически значимо по сравнению со значением показателя после 4-го курса ИТ

При этом выявлено снижение количества В-лимфоцитов как после 4, так и после 8 курсов ИТ, соответственно 45% ( $p=0,039$ ) и 55% ( $p=0,034$ ), по сравнению с исходными значениями (рис. 3А). Обращает на себя внимание отсутствие изменений в случае прогрессии заболевания на фоне проводимой терапии количества эффекторных клеток как врожденного, так и адаптивного иммунитета.

Проведение ИТ в случае отсутствия ожидаемого положительного ответа на него не сопровождается изменением относительного содержания в периферической крови пациентов большинства субпопуляций лимфоцитов. В нашем исследовании показано только увеличение по сравнению со значениями до начала лечения количества ряда В-лимфоцитов как после 4-го, так и после 8-го курса ИТ.

В частности, отмечено увеличение содержания CD19+CD86+ и CD19+CD95+ В-лимфоцитов соответственно на 72% ( $p=0,037$ ) и 64% ( $p=0,039$ ), 164% ( $p=0,028$ ) и 133%

( $p=0,033$ ) (рис. 4А, 4Б). Обращает также на себя внимание отсутствие изменений в содержании лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации (рис. 4В).

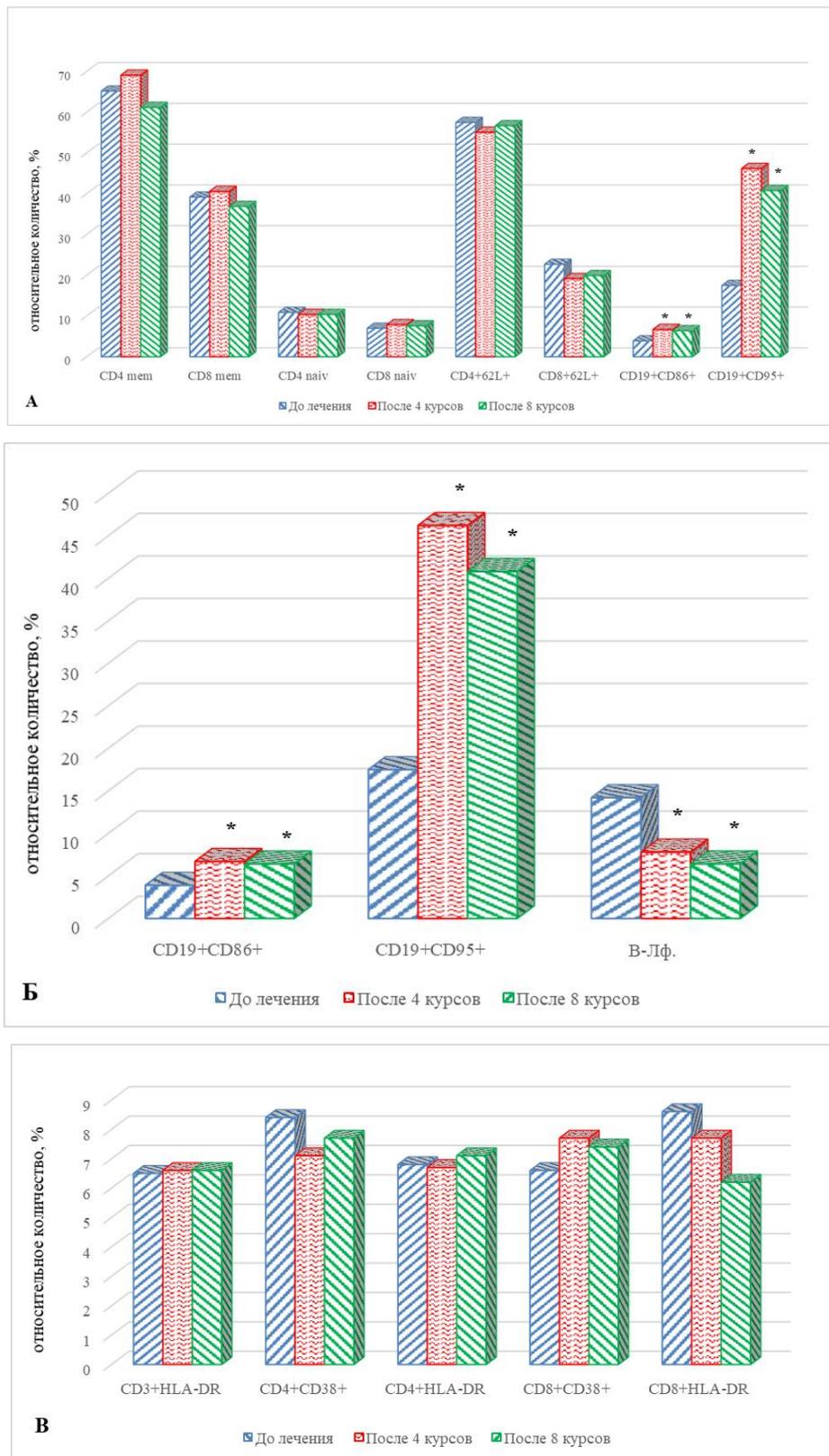


Рис. 4. Особенности параметров клеточного иммунитета больных раком легкого в ходе проводимой иммунотерапии: группа 2 – прогрессия;

\* – статистически значимо по сравнению со значением показателя до лечения;

*\*\* – статистически значимо по сравнению со значением показателя после 4-го курса ИТ*

Важным вопросом является определение тех особенностей в клеточных показателях периферической крови, которые сопутствуют неблагоприятному ответу с прогрессированием заболевания (группа 2), по сравнению с аналогичными показателями при благоприятном ответе (группа 1) на проведенное лечение с использованием PD-1 ингибиторов.

В результате проведенной работы обнаружено, что до начала ИТ у пациентов группы 2 наблюдается увеличение содержания В-лимфоцитов на 61% ( $p=0,031$ ), что сопряжено с увеличением количества НКТ-лимфоцитов на 137% ( $p=0,023$ ), CD4+CD38+ и CD8+HLADR+ Т-лимфоцитов соответственно на 35% ( $p=0,042$ ) и 65% ( $p=0,04$ ). Однако на этом фоне выявлено снижение числа CD19+CD95+ В-клеток на 56% ( $p=0,028$ ).

После проведения 4 курсов ИТ у пациентов 2-й группы статистически значимым оказалось увеличение на 35% ( $p=0,046$ ) числа DN-лимфоцитов, что сочеталось с выраженным дальнейшим накоплением в крови НКТ-клеток, относительное количество которых превышало значения в 1-й группе в 5 раз ( $p=0,009$ ). В эти сроки у пациентов с прогрессированием заболевания обнаружено увеличение некоторых субпопуляций В-лимфоцитов на 103% ( $p=0,04$ ) и 144% ( $p=0,027$ ) соответственно CD19+CD86+ и CD19+CD95+ клеток. При этом отличий в количестве отдельных лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней и поздней активации, в рассматриваемые сроки не выявлено.

После 8-го курса у больных 2-й группы по сравнению с группой 1 отмечаются увеличение количества в крови гранулоцитов на 45% ( $p=0,037$ ), тенденция к снижению цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов, которая без изменения CD4+ клеток приводит к сдвигу ИРИ в сторону преобладания регуляторных Т-лимфоцитов. Это находит также отражение в увеличении на 42% ( $p=0,039$ ) к данному сроку наблюдения относительного содержания Treg клеток. Кроме того, показано увеличение на 180% ( $p=0,021$ ) и в 2,5 раза ( $p=0,0012$ ) количества DP- и НКТ-лимфоцитов соответственно. Также выявлено увеличение на 81% ( $p=0,033$ ) наивных CD8+ клеток и на 41% ( $p=0,029$ ) CD4+ клеток эффекторной памяти, что сопровождается снижением на 34% ( $p=0,032$ ) CD8+ Т-лимфоцитов эффекторной памяти и на 65% ( $p=0,043$ ) CD3+ клеток, экспрессирующих маркеры поздней активации.

Отмеченные особенности параметров периферической крови пациентов с прогрессией заболевания после проведения 8 курсов ИТ сочетаются со снижением общего числа лимфоцитов на 45% ( $p=0,035$ ) и В-лимфоцитов на 42% ( $p=0,036$ ) на фоне выраженного увеличения количества некоторых субпопуляций В-клеток: на 611% ( $p=0,001$ ) и 1100% ( $p=0,0001$ ) соответственно CD19+CD86+ и CD19+CD95+ В-лимфоцитов.

*Особенности экспрессии маркеров PD-1/PD-L1 на лимфоцитах крови больных раком легкого на фоне проведения лечения с использованием ингибиторов контрольных точек*

К настоящему времени показано, что одним из факторов, определяющих эффективность использования ингибиторов контрольных точек при лечении опухолей различной локализации, является уровень экспрессии на иммунокомпетентных клетках их мишеней, в связи с чем в нашем исследовании отдельной задачей было определение числа CD4+ и CD8+ клеток, имеющих на плазматической мембране CD279+/PD-1 и CD274+/PD-L1 молекулы. Определение данных показателей у ряда больных раком легкого осуществляли до начала терапии и после ее завершения.

У пациентов с РЛ без учета ответа на проводимое лечение количество лимфоцитов обеих популяций, экспрессирующих PD-1 после проведения лечения, оказалось ниже их исходного количества на 40% и 89%, составив соответственно 2,3 (0;7,7) против 3,8 (2,2; 5,7) для CD4+ клеток, 0,6 (0; 5,7) против 3,85 (2,68;8,4) для CD8+ клеток (рис. 5А). Статистически значимого отличия в этом случае, несмотря на достаточно выраженные отличия, получить не удалось, что может быть связано с небольшим числом обследованных в группах и большим разбросом определяемых показателей, отражающих индивидуальные особенности пациентов.

Статистически значимым оказалось изменение экспрессии на лимфоцитах PD-L1, количество CD4+ и CD8+ лимфоцитов с данными лигандами увеличивалось по завершении лечения на 100% ( $p=0,028$ ) и в 20 раз ( $p=0,023$ ).

При анализе полученных данных экспрессии PD-1, PD-L1 на лимфоцитах периферической крови пациентов с РЛ с учетом ответа на терапию были получены следующие результаты.

В группе больных с ответом на ИТ количество лимфоцитов обеих популяций, экспрессирующих PD-1, оказалось ниже исходных значений соответственно на 100% для CD4+ ( $p=0,063$ ) и на 98% ( $p=0,044$ ) для CD8+ клеток. При этом значимым оказалось увеличение по сравнению с исходными значениями количества в крови пациентов данной группы CD4+ и CD8+ лимфоцитов, экспрессирующих PD-L1, соответственно на 100% ( $p=0,024$ ) и в 20 раз ( $p=0,028$ ) (рис. 5Б).

У больных 2-й группы с прогрессией заболевания характер изменения определяемых показателей имел некоторые особенности (рис. 5В).

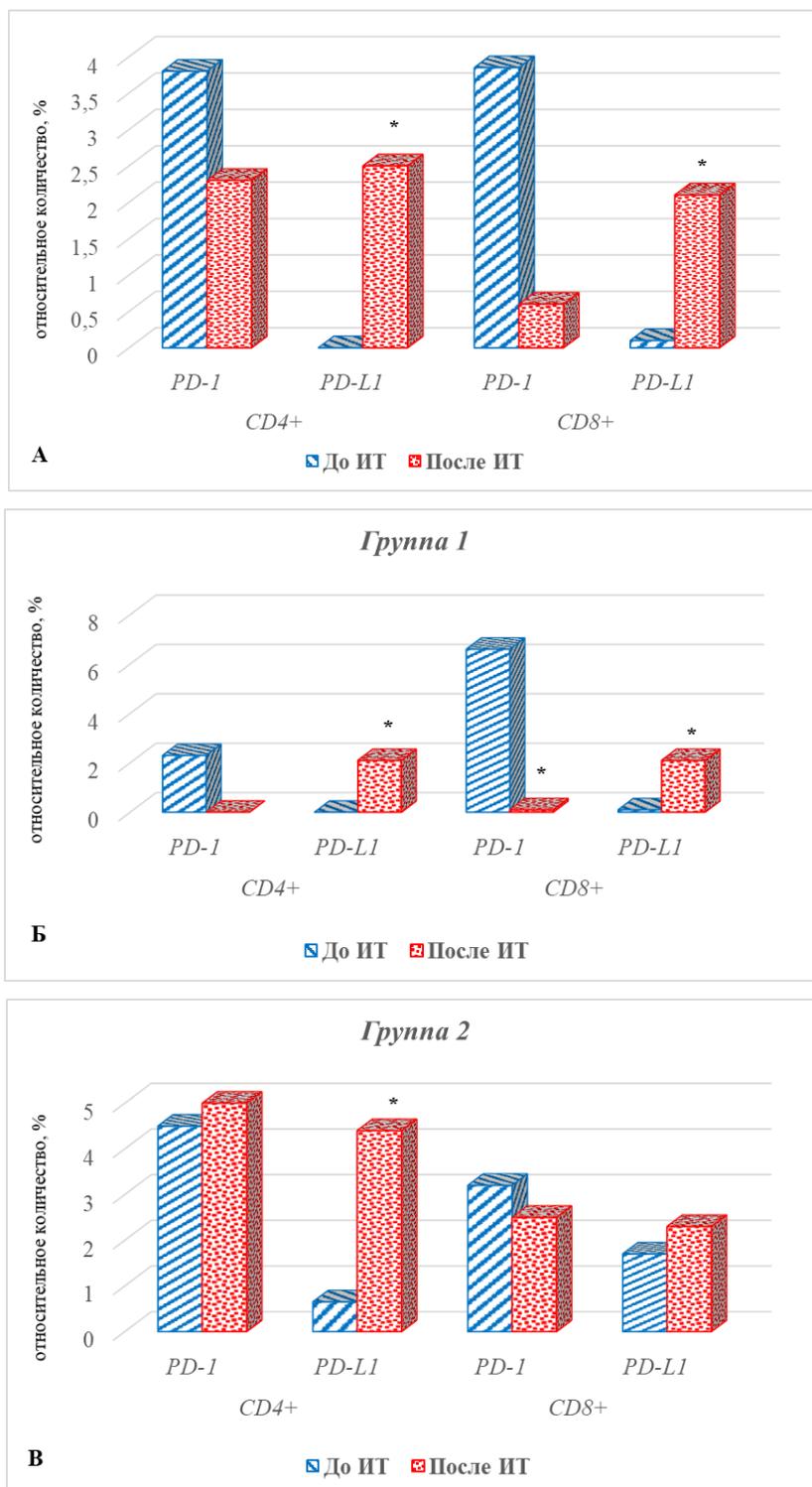


Рис. 5. Уровни Т-клеток, экспрессирующих PD-1/PD-L1 в ходе проведения ИТ, \* – статистически значимо по сравнению со значением показателя до лечения

Статистически значимым в этом случае оказалось увеличение после ИТ экспрессии только PD-L1, наиболее выраженное в случае CD4+ лимфоцитов, – увеличение в 5,7 раза (p=0,0012).

Таким образом, проведенные исследования выявили некоторые особенности экспрессии молекул системы PD-1/PD-L1 на лимфоцитах периферической крови у

обследованных больных раком легких. В нашем исследовании в случае различных эффектов от ИТ до начала ее проведения выявлено значимое увеличение на клетках обеих популяций (CD4+ и CD8+) только PD-L1, в то время как отличий в содержании PD-1 не выявлено. По завершении лечения у больных с различным клиническим эффектом значимых отличий в относительном содержании лимфоцитов с PD-1 и PD-L1 не выявлено, что может быть связано с небольшим объемом выборки и сильной индивидуальной вариацией определяемых показателей.

Тем не менее, несмотря на указанное отсутствие статистически значимых отличий, различия в экспрессии определяемых маркеров в зависимости от эффекта ИТ обнаружены. Так, до начала терапии больных раком легких у пациентов с прогрессией заболевания количество CD4+PD-L1+ и CD8+PD-L1+ лимфоцитов превышало соответствующие значения данных показателей у пациентов 1-й группы (с положительным эффектом от лечения). При этом содержание клеток, экспрессирующих PD-1, у больных 2-й группы было различным: если количество CD4+ лимфоцитов превышало на 96%, то CD8+, напротив, оказалось ниже на 52% по сравнению с аналогичными значениями в 1-й группе. После проведения ИТ отмечено резкое увеличение (в 24 раза) количества CD8+PD-1+ в крови больных с прогрессией заболевания. Кроме того, в данном варианте ответа на терапию (у пациентов 2-й группы) обнаружено увеличение содержания CD4+PD-1+, CD4+PD-L1+ лимфоцитов соответственно на 83% и 100%.

Полученные в нашем исследовании результаты не позволяют однозначно говорить о зависимости эффекта от лечения больных раком легкого от содержания в крови лимфоцитов с маркерами системы PD-1/PD-L1 и требуют дальнейшего исследования и анализа.

#### *Обсуждение полученных результатов*

В результате проведенного исследования обнаружено, что к моменту завершения наблюдения, после 8 курсов ИТ в случае положительного эффекта от терапии, отмечается увеличение в периферической крови содержания лимфоцитов, моноцитов, В-лимфоцитов за счет клеток, имеющих активационный рецептор CD25+. Увеличение количества цитотоксических CD8+ клеток сопровождается увеличением CD8+ клеток эффекторной памяти и снижением субпопуляции наивных цитотоксических лимфоцитов. Изменения количества Treg лимфоцитов не выявлено, но обнаружен разнонаправленный характер изменения содержания в крови предшественников Т-лимфоцитов – снижения DP и увеличения DN лимфоцитов. Кроме того, обнаружено снижение количества CD4+ и CD8+ лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации, за исключением CD4+CD38+ клеток. На этом фоне не выявлено изменения содержания NK-лимфоцитов при снижении NKT-лимфоцитов.

Таким образом, у больных раком легкого в случае дальнейшего прогрессирования заболевания после 8-го курса ИТ, вероятно, отмечается формирование преимущественного иммуносупрессивного фенотипа, на что указывают увеличение Treg лимфоцитов и DN клеток, а также отсутствие изменений в эффекторных клетках врожденного и адаптивного иммунитета, изменения числа лимфоцитов с различными активационными маркерами. Особенностью иммунологических параметров крови у пациентов данной группы является снижение содержания В-лимфоцитов, которое, однако, сопровождается увеличением CD19+CD86+ и CD19+CD95+ субпопуляций.

Кроме того, при развитии ответа на лечение ИКТ происходит снижение уровня В-лимфоцитов, экспрессирующих CD95+, рассматриваемых в литературе как «истощенные» [7]. Современная литература расценивает CD95 не только как рецептор активационного апоптоза. Описаны различные механизмы усиления опухолевого роста через этот рецептор и его лиганд, в частности стимуляция им опухолевых стволовых клеток и эпителиально-мезенхимального перехода, что способствует выживанию и распространению опухоли в организме хозяина [8]. Есть и альтернативные данные, полученные на больных с опухолями головы и шеи и РЛ: авторы, хотя и придают некоторое значение CD8+CD95+ клеткам в разрушении опухоли, считают наиболее важным для этого содержащийся в их гранулах перфорин [9, 10]. Учитывая данные литературы об усилении экспрессии CD95L на эндотелии сосудов опухоли [8], можно полагать, что его возможности взаимодействовать с рецептором будут тем больше, чем выше количество экспрессирующих CD95 клеток. Следовательно, наблюдаемое нами двукратное снижение процента CD95+ В-лимфоцитов после лечения ИКТ в группе больных с положительным эффектом, по-видимому, отражает ослабление такого механизма избегания опухолью действия иммунной системы в результате проведенного лечения.

При сравнении ответа на лечение у различных больных в связи с их иммунным статусом нами также было выявлено более высокое количество активированных CD8+ клеток при развитии клинического эффекта. Однако отмеченное у этих же больных более низкое содержание центральных CD8+ клеток памяти говорит о возможном истощении системы цитотоксических Т-лимфоцитов при хронической стимуляции опухолевыми антигенами, о чем есть многочисленные сообщения в литературе [11, 12]. В последнее время стали появляться данные о воздействии микробиоты кишечника на дифференцировку лимфоцитов памяти, прежде всего, полученные при исследовании на локальном уровне [13]. Следует отметить, что вопрос о специфичности изученных нами Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в отношении как опухолевых, так и микробных антигенов остается открытым, а в литературе приводятся единичные и неоднозначные сведения.

Таким образом, найденные нами различия иммунного статуса больных РЛ касаются не только Т-клеток, играющих ведущую роль в противоопухолевом иммунитете, но и моноцитов и В-лимфоцитов, роль которых известна, прежде всего, в антибактериальном иммунитете, но привлекающих внимание и в плане влияния на опухолевый рост [14, 15].

### **Заключение**

Отмечен ряд статистически значимых отличий при различном клиническом эффекте иммунотерапии. Общий ответ сопровождается снижением уровня НКТ-клеток после 4-го курса, а после 8-го курса дополнительно происходит повышение уровня CD8+ клеток, что можно расценить как положительную иммунологическую динамику. При этом выявлены волнообразное изменение уровня DP-клеток (повышение их уровня после 4-го и снижение после 8-го курса), повышение уровня DN- и снижение НК-клеток после 8-го курса.

Прогрессия заболевания на фоне проводимой иммунотерапии характеризуется повышением Tregs, DP- и DN-Т-клеток после 4-го курса; после 8-го курса такие изменения сохраняются. После окончания 4-го курса у больных с прогрессированием процент НКТ-клеток был выше во все сроки исследования.

Исследование Т-клеток памяти и «наивных» Т-лимфоцитов, проведенное в тех же группах, показало, что общий ответ сопровождается статистически значимым повышением процента CD4<sup>naïv</sup>, развивающимся уже после 4-го курса и продолжающимся после 8-го курса; после 8-го курса выявлено снижение количества CD8+<sup>naïv</sup> клеток. При этом направленность изменений содержания центральных клеток памяти противоположна: после 8-го курса отмечены снижение CD4+CD62L<sup>+</sup> и повышение CD8+CD62L<sup>+</sup> клеток. При прогрессии НМРЛ статистически значимых различий уровней этих субпопуляций не отмечено.

В целом у больных НМРЛ при лечении отмечено статистически значимое снижение содержания Т-клеток обеих основных субпопуляций, экспрессирующих PD-1 (CD279), и повышение содержания Т-клеток, экспрессирующих PD-L1 (CD274). Ответ на иммунотерапию сопровождался статистически значимым снижением процента PD-1 (CD4+CD279<sup>+</sup> и CD8+CD279<sup>+</sup>) лимфоцитов наряду с возрастанием количества PD-L1 (CD4+CD274<sup>+</sup> и CD8+CD274<sup>+</sup>). Напротив, при отсутствии эффекта уровни PD-1 (CD4+CD279<sup>+</sup> и CD8+CD279<sup>+</sup>) не отличались от исходных, а PD-L1 (CD4+CD274<sup>+</sup> и CD8+CD274<sup>+</sup>) статистически значимо повышались.

Таким образом, прогрессирование заболевания и отсутствие эффекта от ИТ сопровождаются целым рядом особенностей изменения популяционного и субпопуляционного состава клеток врожденного и адаптивного иммунитета, что вносит определенный вклад в ответ организма на проводимое лечение.

В качестве потенциально прогностически значимых показателей положительного ответа на ингибиторы PD-1 у больных НМРЛ можно рассматривать уровни DN, CD4+, CD8+ выше 29%, 31% и 41% соответственно, CD8+naïv, CD4+CD62L+, CD19+CD86+, NKT клеток ниже 62%, 63%, 73% и 51% соответственно.

### Список литературы

1. Doroshow D.B., Sanmamed M.F., Hastings K., Politi K., Rimm D.L., Chen L., Melero I., Schalper K.A., Herbst R.S. Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: Facts and Hopes // *Clin. Cancer Res.* 2019. Vol. 25(15). P. 4592-4602. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1538.
2. Borghaei H., Paz-Ares L., Horn L., Spigel D.R., Steins M., Ready N.E., Chow L.Q., Vokes E.E., Felip E., Holgado E., Barlesi F., Kohlhäufel M., Arrieta O., Burgio M.A., Fayette J., Lena H., Poddubskaya E., Gerber D.E., Gettinger S.N., Rudin C.M., Rizvi N., Crinò L., Blumenschein G.R. Jr, Antonia S.J., Dorange C., Harbison C.T., Graf Finckenstein F., Brahmer J.R. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer // *N. Engl. J. Med.* 2015. Vol. 373(17). P. 1627-1639. DOI: 10.1056/NEJMoa1507643.
3. Herbst R.S., Baas P., Kim D.W., Felip E., Pérez-Gracia J.L., Han J.Y., Molina J., Kim J.H., Arvis C.D., Ahn M.J., Majem M., Fidler M.J., de Castro G. Jr., Garrido M., Lubiniecki G.M., Shentu Y., Im E., Dolled-Filhart M., Garon E.B. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial // *Lancet.* 2016. Vol. 387(10027). P. 1540-1550. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)01281-7.
4. Goldstraw P., Chansky K., Crowley J., Rami-Porta R., Asamura H., Eberhardt W.E., Nicholson A.G., Groome P., Mitchell A., Bolejack V. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer // *J. Thorac. Oncol.* 2016. Vol. 11(1). P. 39-51. DOI: 10.1016/j.jtho.2015.09.009.
5. Gettinger S, Horn L., Jackman D., Spigel D., Antonia S., Hellmann M., Powderly J., Heist R., Lecia V. Sequist, David C. Smith, Leming P., William J. Geese, Yoon D., Li A., Brahmer J. Five-year follow-up of nivolumab in previously treated advanced non-small-cell lung cancer: results from the CA209-003 study // *J. Clin. Oncol.* 2018. Vol. 36. P. 1675–1684.
6. Garon E.B., Hellmann M.D., Rizvi N.A., Carcereny E., Leighl N.B., Ahn M.J., Eder J.P., Balmanoukian A.S., Aggarwal C., Horn L., Patnaik A., Gubens M., Ramalingam S.S., Felip E., Goldman J.W., Scalzo C., Jensen E., Kusch D.A., Hui R. Five-Year Overall Survival for Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With Pembrolizumab: Results From the Phase I

KEYNOTE-001 Study // *J. Clin. Oncol.* 2019. Vol. 37(28). P. 2518-2527. DOI: 10.1200/JCO.19.00934

7. Zhao P.W., Ma L., Ji H.F., Yu L., Feng J.Y., Wang J., Liu M.Y., Jiang Y.F. The expression of TLR-9, CD86, and CD95 phenotypes in circulating B cells of patients with chronic viral hepatitis B or C before and after antiviral therapy // *Mediators Inflamm.* 2015. Vol. 2015. P. 762709. DOI: 10.1155/2015/762709.

8. Peter M.E., Hadji A., Murmann A.E., Brockway S., Putzbach W., Pattanayak A., Ceppi P. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer // *Cell. Death Differ.* 2015. Vol. 22(4). P. 549-559. DOI: 10.1038/cdd.2015.3.

9. Xu L., Chen D., Lu C., Liu X., Wu G., Zhang Y. Advanced Lung Cancer Is Associated with Decreased Expression of Perforin, CD95, CD38 by Circulating CD3+CD8+ T Lymphocytes // *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2015. Vol. 45(5). P. 528-532.

10. Laytragoon-Lewin N., Jönson F., Lundgren J., Rutqvist L.E., Wikby A., Löfgren S., Lewin F. Perforin, CD28 and CD95 expression in circulating CD4 and CD8 cells as predictors of head and neck (H&N) cancer patient survival // *Med Oncol.* 2014. Vol. 31(12). P. 290. DOI: 10.1007/s12032-014-0290-3.

11. Klebanoff Ch.A., Gattinoni L., Restifo N.P. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy // *Immunol Rev.* 2006. Vol. 211. P. 214–224. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2006.00391.x.

12. Liu Q., Sun Zh., Chen L. Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy // *Protein Cell.* 2020. Vol. 11(8). P. 549–564. DOI: 10.1007/s13238-020-00707-9.

13. Olingy Cl.E., Dinh H.Q., Hedrick C.C. Monocyte heterogeneity and functions in cancer // *J. Leukoc. Biol.* 2019. Vol. 106(2). P. 309–322. DOI: 10.1002/JLB.4RI0818-311R.

14. Yuen G.J., Demissie E., Pillai Sh. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship // *Trends Cancer.* 2016. Vol. 2(12). P. 747–757. DOI: 10.1016/j.trecan.2016.10.010.

15. Yiu J.H.C., Dorweiler B., Woo C.W. Interaction between gut microbiota and toll-like receptor: from immunity to metabolism // *J. Mol. Med. (Berl).* 2017. Vol. 95(1). P. 13–20. DOI: 10.1007/s00109-016-1474-4.