

ПАРАМЕТРЫ СИСТЕМНОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С МЕЛАНОМОЙ КОЖИ НА ФОНЕ ПРОВОДИМОЙ ИММУНОТЕРАПИИ С РАЗЛИЧНОЙ ЕЕ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ

Сагакянц А.Б.¹, Теплякова М.А.¹, Владимиров Л.Ю.¹, Бондаренко Е.С.¹,
Златник Е.Ю.¹, Новикова И.А.¹, Дженкова Е.А.¹

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

Цель: определить показатели системного клеточного иммунитета больных меланомой кожи для прогнозирования ответа на лечение препаратами ИКТ. В образцах периферической крови 30 пациентов с генерализованной меланомой кожи, получивших лечение с использованием анти – PD-1 терапии (пембролизумаб и ниволумаб). Больные были разделены на две группы: 1-я общий - ответ (n=21), 2-я - прогрессирование заболевания (n=9). Исследование крови осуществляли до начала терапии, после 4-го и 8-го курса терапии. Определяли относительное содержание основных и минорных популяций иммунных клеток методом проточной цитометрии. Показано, что прогрессирование меланомы кожи после иммунотерапии отличается снижением количества CD4+ Т-лимфоцитов, увеличением содержания Treg и DN-клеток, а также CD8+ лимфоцитов с маркером поздней активации (CD8+HLA-DR+), повышением процента NKT-лимфоцитов, увеличением числа В-лимфоцитов за счет субпопуляции клеток, готовых к апоптозу (CD19+CD95+). Ответ на иммунотерапию при МК связан со стимуляцией цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+), обеспечивающих иммунологическую память при угнетении врожденной цитотоксичности (NKT-лимфоцитов), а также с угнетением иммуносупрессивных субпопуляций Т-клеток (Treg, DN) и активацией В-лимфоцитов, т.е., со стимуляцией адаптивного иммунитета. В качестве прогностически значимых показателей ответа на терапию с использованием ингибиторов PD-1 у больных МК могут быть использованы уровни CD3+, CD4+, CD4+m, CD8+m, превышающие 78%, 50%, 66% и 30% соответственно, CD8+CD95+, CD19+CD86+, CD19+CD95+, клеток ниже 60%, 12% и 21% соответственно.

Ключевые слова: меланома кожи, ингибиторы контрольных точек, клеточный иммунитет, лимфоциты.

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.

PARAMETERS OF SYSTEMIC CELLULAR IMMUNE IN PATIENTS WITH SKIN MELANOMA DURING IMMUNOTHERAPY WITH DIFFERENT EFFECTIVENESS

Sagakyants A.B.¹, Teplyakova M.A.¹, Vladimirova L.Yu.¹, Bondarenko E.S.¹,
Zlatnik E.Yu.¹, Novikova I.A.¹, Dzhenkova E.A.¹

¹Federal 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

Aims: to determine the indicators of systemic cellular immunity of melanoma patients to predict the response to treatment with ICI drugs. Are in peripheral blood samples of 30 patients with generalized skin melanoma treated with anti-PD-1 therapy (pembrolizumab and nivolumab). The patients were divided into two groups: 1st overall response (n=21), 2nd disease progression (n=9). Blood tests had been made before the therapy started, and also after the 4th and 8th courses of therapy. We determined the relative content of major and minor populations of immune cells by flow cytometry. As a result, it was shown that the progression of skin melanoma on the background of immunotherapy is characterized by a decrease in the number of CD4+ T-lymphocytes, an increase in the content of Treg and DN cells, as well as CD8+ lymphocytes with a marker of late activation (CD8+HLA-DR+), an increase in the percentage of NKT-lymphocytes, an increase in the number of B-lymphocytes due to the subpopulation of cells ready for apoptosis (CD19+CD95+). The response to immunotherapy in MK is associated with the stimulation of cytotoxic T-lymphocytes (CD8+), which provide immunological memory in case of suppression of innate cytotoxicity (NKT-lymphocytes), as well as with the suppression of immunosuppressive subpopulations of T-cells (Treg, DN) and the activation of B-lymphocytes, t .e., with stimulation of adaptive

immunity. CD3+, CD4+, CD4+m, CD8+m levels exceeding 78%, 50%, 66 and 30%, respectively, CD8+CD95+, CD19+CD86+, CD19+CD95+ cells below 60%, 12% and 21%, respectively, may be used as prognostically significant indicators of response to therapy with PD-1 inhibitors in patients with skin melanoma.

Keywords: skin melanoma, checkpoint inhibitors, cellular immunity, lymphocytes.

The work was carried out within the framework of the state task on the topic "Development of prognostic and predictive algorithms based on the identification of new immunological and molecular genetic characteristics of malignant tumors and their microenvironment", reg. № 121031100251-9.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Меланома кожи относится к одним из самых агрессивных видов рака кожи. Меланома кожи (МК) встречается наиболее часто, как правило, связана с воздействием УФ-излучения и повышенной мутационной нагрузкой опухоли (ТМВ), которые способствуют высокой иммуногенности. Около 5% пациентов с меланомой имеют метастатическое заболевание, которое генотипически напоминает меланому кожи, но без первичного очага, что позволяет предположить, что первичная опухоль могла спонтанно регрессировать [1]. Также меланому часто связывают с витилиго - проявлением аутоиммунной реакции против меланоцитов, что указывает на перекрестные иммунные реакции, нацеленные на меланому и нормальные меланоциты. Было продемонстрировано, что витилиго является благоприятным прогностическим признаком у пациентов, предполагая, что антимеланоцитарный иммунный ответ помогает контролировать рост меланомы. Отмечено также, что меланома может быть инфильтрирована реактивными лимфоцитами [2], при этом плотная инфильтрация перипухолевыми лимфоцитами связана с лучшим прогнозом, и классификация меланомы, основанная на распределении инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) (активное, неактивное и отсутствующее), все еще используется сегодня [3]. Однако меланома очень быстро метастазирует, что указывает на то, что активная иммунная супрессия должна компенсировать ее иммуногенность. Механизм уклонения от иммунного ответа при прогрессировании заболевания может подчеркивать специфическую уязвимость меланомы к иммунотерапии, что объясняет ее уникальную реакцию на эти методы лечения.

Концепция блокады иммунных контрольных точек (ИКТ) для лечения рака была впервые предложена Джимом Эллисоном и его коллегами, показавшими, что антитела, блокирующие ко-ингибирующий рецептор Т-клеток CTLA-4, могут способствовать регрессу опухоли у мышей [4]. Затем были разработаны и испытаны на пациентах антитела, блокирующие CTLA-4 человека, при этом ипилиумаб стал первым препаратом, увеличивающим выживаемость при метастатической меланоме, что привело к его одобрению для лечения этого заболевания в 2011 году. PD-1 был признан еще одной ключевой контрольной точкой Т-клеток иммунитета [5]. Было обнаружено, что антитела, блокирующие

PD-1 или PD-L1, усиливают контроль над опухолью у мышей [6] и функциональность CD8+ Т-клеток в модели хронической вирусной инфекции [7]. Результаты клинических испытаний антител, блокирующих PD-1, в рефрактерных солидных опухолях были подтверждены в исследованиях фазы 3, где было обнаружено, что ингибиторы PD-1 пембролизумаб и ниволумаб увеличивают выживаемость по сравнению с ипилимумабом или химиотерапией [8]. Затем эти препараты были одобрены для лечения метастатической меланомы в 2014 году.

В целом успех применения ИКТ при меланоме подтвердил терапевтическое воздействие активации иммунной системы для эффективного воздействия на это заболевание. Однако контроля заболевания удастся достичь не у всех пациентов. Это указывает на необходимость поиска новых прогностических предикторов ответа. Хотя было обнаружено, что повышенная экспрессия PD-L1 в опухоли и ТМВ коррелируют с ответом на ИКТ при меланоме, эти биомаркеры не могут точно предсказать исход во всех случаях. Кроме того, обращают на себя внимание противоречивые данные относительно особенностей параметров клеточного иммунитета у пациентов с меланомой на фоне проводимой терапии ИКТ с различным ответом на неё.

Цель исследования: определить показатели системного клеточного иммунитета больных меланомой кожи для прогнозирования ответа на лечение препаратами ИКТ.

Материалы и методы исследования

В исследование включены данные о 30 пациентах с верифицированным диагнозом «генерализованная меланома кожи», получивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии» МЗ РФ с 2019 по 2021 г. Средний возраст больных составил 60 лет. 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. Больные были разделены на две группы: 1-я – пациенты с общим ответом (n=21), 2-я – пациенты с прогрессированием заболевания (n=9). Забор КЗЭДТА-крови для цитофлюориметрического исследования получали до начала лечения; после осуществления 4 и 8 курсов иммунотерапии.

Цитофлюориметрическое исследование осуществляли с использованием следующих наборов антител (Becton Dickinson, США):

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.

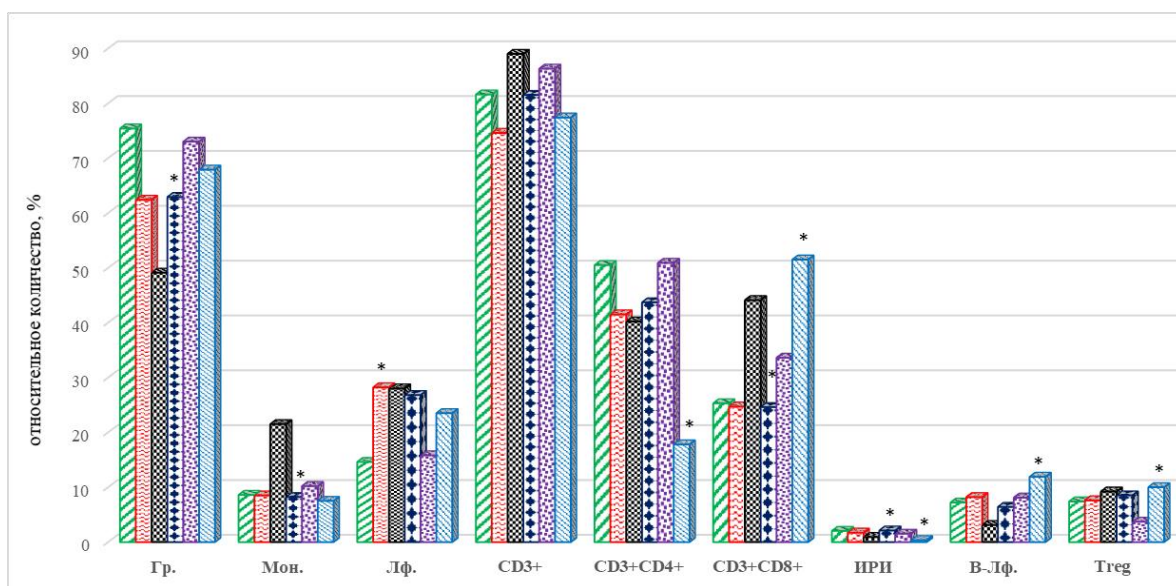
Оценка результатов фенотипирования клеток крови осуществляли на FacsCanto II (Becton Dickinson, США), при этом для анализа собирали не менее 50 000 клеток. Результаты выражали в процентах от общего количества лимфоцитов, в то время как T-regs – в процентах от CD3+CD4+ клеток.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета Statistica 13,3 (StatSoft Inc., США). С использованием критерия Шапиро - Уилка определяли характер распределения показателей, которые в результате не соответствовали нормальному распределению, в связи с чем они представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха - 25 и 75 перцентилей (Me [LQ; UQ]). Уровень значимости отличий между выборками оценивали непараметрическим критерием Манна - Уитни, а результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

На рисунках 1 и 2 представлены полученные результаты.

У пациентов *первой группы*, с положительным эффектом от терапии, после 4 курса в периферической крови больных отмечается статистически значимое увеличение количества моноцитов и лимфоцитов соответственно на 150% ($p=0,027$) и 92% ($p=0,031$) по сравнению с показателями до лечения. На этом фоне выявлено снижение на 35% ($p=0,043$) гранулоцитов. Обращает на себя внимание значимое увеличение на 74% ($p=0,028$) ЦТЛ (CD3+CD8+), которое на фоне тенденции к снижению содержания Т-лимфоцитов хелперов приводит к снижению ИРИ на 55% ($p=0,035$), что может указывать на сдвиг в популяциях клеток адаптивного иммунитета в сторону цитотоксических. Кроме того, выявлено снижение на 57% ($p=0,029$) количества В-лимфоцитов, а также тенденция к увеличению содержания Т-регуляторных лимфоцитов (рис. 1).



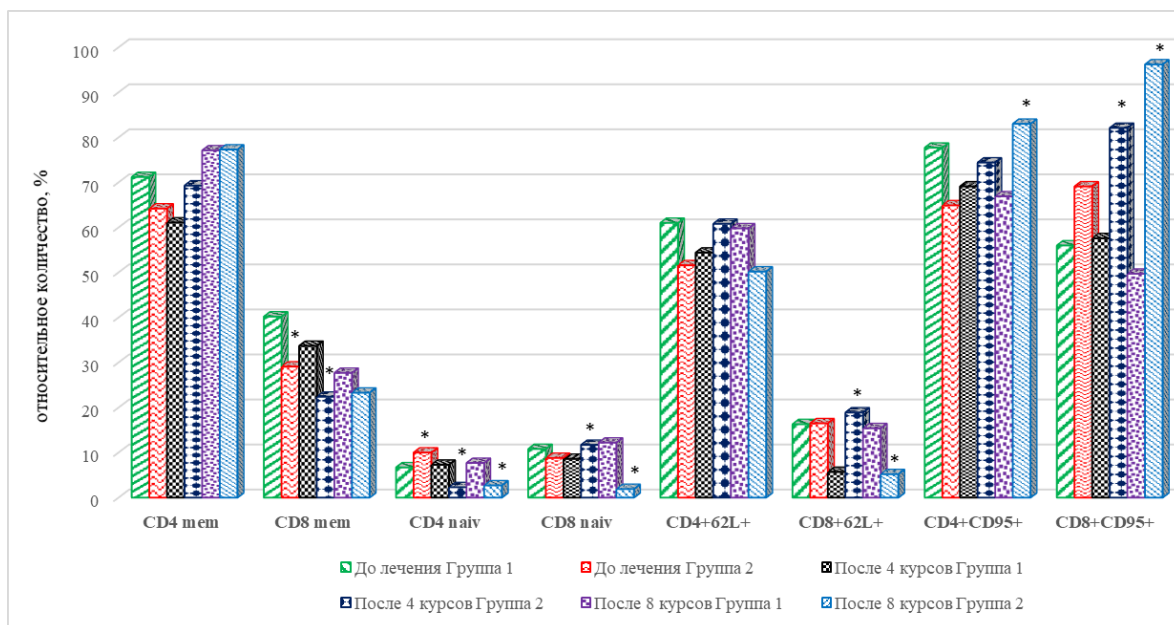
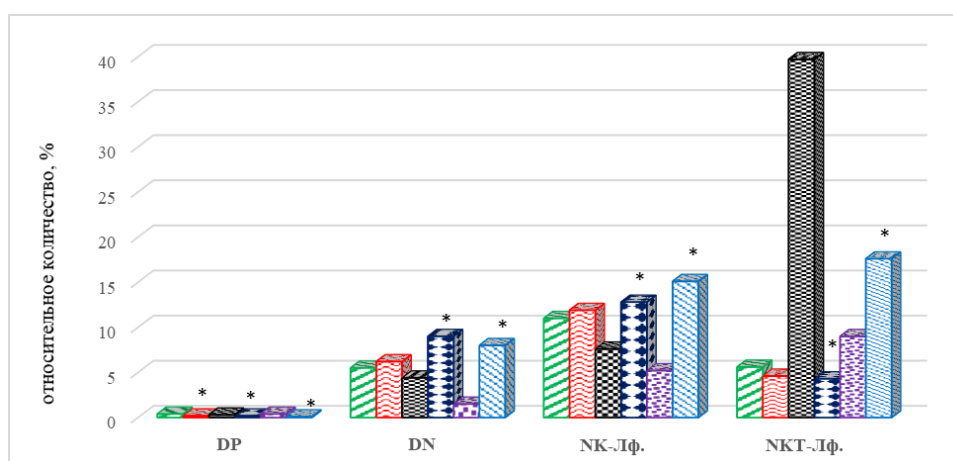


Рис. 1. Показатели клеточного иммунитета крови больных с меланомой в ходе иммунотерапии: группа 1 – ответ на терапию; группа 2 – прогрессия заболевания; * - значимо по сравнению со значением показателя у группы 1, $p < 0,05$

В рассматриваемые сроки выявлено резкое увеличение относительного количества одной из популяций клеток врожденного иммунитета – НКТ-лимфоцитов, число которых превышало исходный уровень в 6 раз ($p=0,005$), в то время как другая популяция, НК-лимфоциты, характеризовалась иным направлением изменений: их количество оказалось ниже на 31% ($p=0,048$), что может говорить о перераспределении функциональных элементов клеточного звена врожденного иммунитета. При этом отмечается тенденция к снижению по сравнению с исходным уровнем числа DP, DN-клеток (рис. 2).



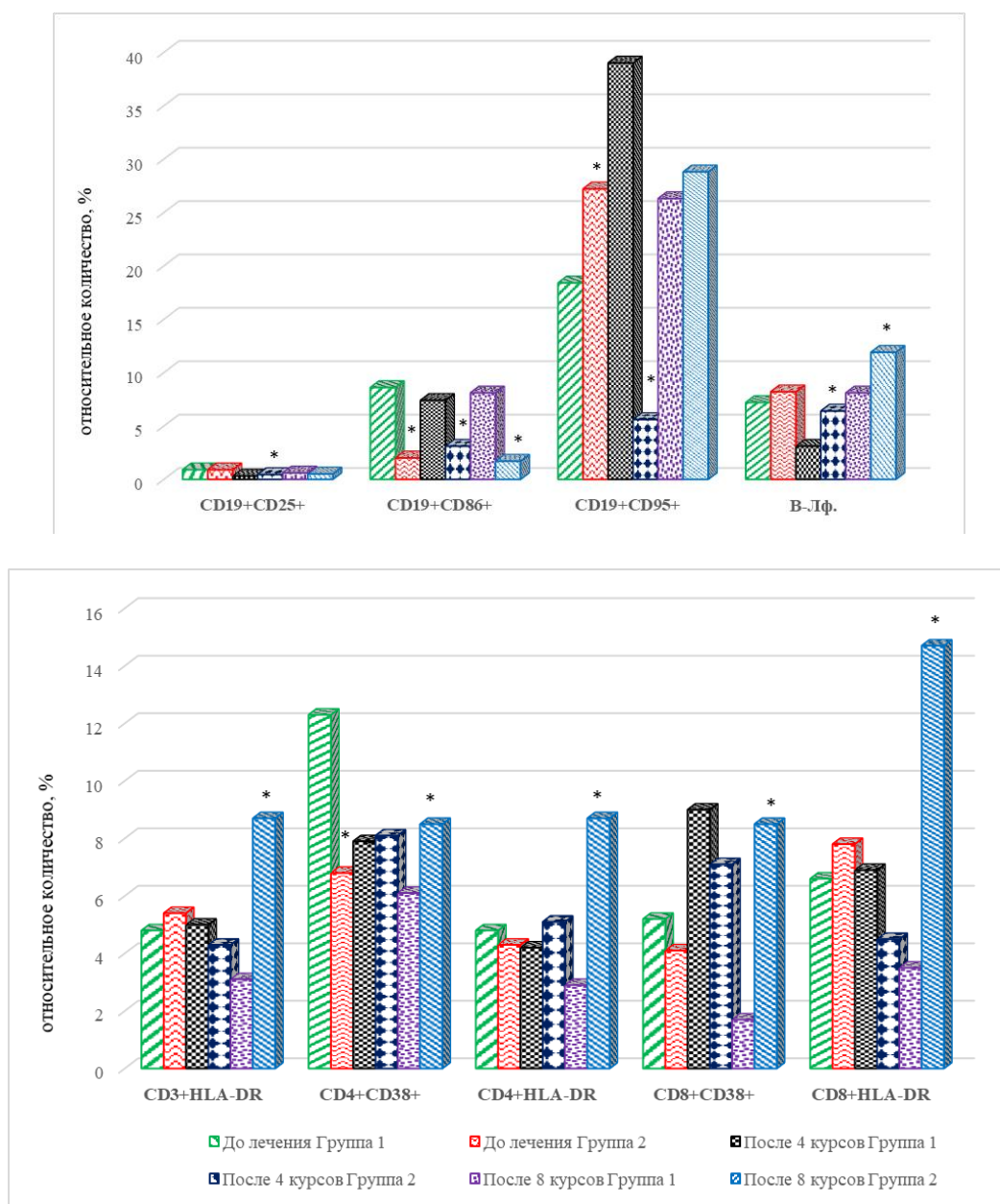


Рис. 2. Показатели клеточного иммунитета больных с меланомой в ходе иммунотерапии:

группа 1 – ответ на терапию; группа 2 – прогрессия заболевания;

* - значимо по сравнению со значением показателя у группы 1, $p < 0,05$

После 8-го курса ИТ у пациентов первой группы содержание НКТ-лимфоцитов остается выше исходных значений на 61%, $p=0,038$, однако это оказалось ниже соответствующего показателя после 4-го курса на 77%, $p=0,031$. На этом фоне количество НК-лимфоцитов продолжало уменьшаться: их число было ниже как уровня до, так и после 4 курсов ИТ, соответственно на 53%, $p=0,037$, и 32%, $p=0,045$ (рис. 2). Выявлено разнонаправленное изменение предшественников Т-лимфоцитов: если содержание DN-лимфоцитов снижалось относительно всех сравниваемых периодов (на 73% по сравнению с

исходным уровнем и 66% - после 4 курсов ИТ), то количество DP-лимфоцитов превышало показатель после 4-х курсов терапии на 33%, $p=0,047$ (рис. 2).

После завершения 4 курсов ИТ выявлено значимое снижение на 65% ($p=0,034$) количества CD8+ Т-клеток эффекторной памяти, снижение на 67% ($p=0,033$) CD19+CD25+ В-лимфоцитов и увеличение на 112% ($p=0,027$) В-клеток с фенотипом CD19+CD95+, по сравнению с их количеством до проведения лечения (рис. 2). В рассматриваемые сроки терапии отмечается значимое увеличение на 73% ($p=0,036$) цитотоксических Т-клеток с маркерами ранней активации CD8+CD38+, без изменения относительного содержания ЦТЛ с маркерами поздней активации CD8+CDHLA-DR+ по сравнению с исходными показателями. При этом обнаружено снижение на 36% ($p=0,046$) количества CD4+CD38+ (рис. 2).

После проведения 8 курсов иммунотерапии выявлен ряд особенностей рассматриваемых показателей субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови. В рассматриваемые сроки по сравнению с соответствующими показателями до начала терапии статистически значимым оказалось снижение на 31% CD8+ лимфоцитов центральной памяти, а также В-клеток фенотипа CD19+CD25+ на 67% ($p=0,033$). Показано увеличение на 43% ($p=0,039$) CD19+CD95+В-лимфоцитов (рис. 2), что может указывать на превалирование функционально зрелых типов данных ИКК.

Сравнение результатов с показателями после 4 курсов лечения выявило увеличение относительного количества наивных ЦТЛ в сочетании с увеличением CD8+ Т-клеток эффекторной памяти на 42% ($p=0,041$) и 170% ($p=0,029$) соответственно. При этом отмечен разнонаправленный характер изменения популяций В-лимфоцитов: увеличение на 100% CD19+CD25+ лимфоцитов ($p=0,021$) и снижение на 32% ($p=0,045$) клеток фенотипа CD19+CD95+ (рис. 1, 2). Сравнение отдельных популяций лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации после проведения 8 курсов лечения и их исходными значениями выявило выраженное и однонаправленное изменение этих показателей: число CD4+, CD8+ лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации были ниже на 50% ($p=0,038$), 40% ($p=0,043$) и 67% ($p=0,041$), 47% ($p=0,037$). Рассматриваемые показатели также оказались ниже и по сравнению с аналогичными значениями после 4 курсов ТИ (рис. 1).

Определение выбранных показателей у пациентов второй группы не выявило отличий после проведения 4 курсов терапии от аналогичных показателей до начала лечения в случае большинства показателей, за исключением количества DN-клеток, количество которых оказалось выше исходных значений на 45%, $p=0,039$ (рис. 2).

После 8 курсов терапии отмечаются изменения, которые, как правило, имеют одинаковую направленность по сравнению как с исходными, так и со значениями аналогичных показателей после 4-го курса ИТ. В периферической крови пациентов в случае

прогрессирования заболевания выявлено снижение Т-лимфоцитов хелперно-индукторной популяции и, напротив, увеличение количества цитотоксических Т-лимфоцитов соответственно на 57% ($p=0,033$) и 59% ($p=0,032$), в 2,08 раза ($p=0,029$) и 2,09 раза ($p=0,027$). Указанные изменения находят отражение и в снижении ИРИ на 80% ($p=0,034$) и 83% ($p=0,032$) соответственно по сравнению с исходными значениями и после 4 курсов лечения (рис. 1). Кроме того, обнаружено увеличение количества В-лимфоцитов – данный показатель оказался выше на 45% ($p=0,043$) и 86% ($p=0,039$) как по сравнению с исходными, так и по сравнению со значениями после 4 курсов ИТ (рис. 1). Выявлено значимое увеличение на 32% ($p=0,046$) содержания в крови Трег-лимфоцитов по сравнению с исходными значениями.

В рассматриваемые сроки после начала лечения у пациентов с прогрессированием заболевания обнаружен дисбаланс в образовании предшественников Т-лимфоцитов. Так, по сравнению с исходными значениями содержание DP-лимфоцитов было ниже на 50% ($p=0,039$), в то время как количество DN-клеток, напротив, оказалось выше на 29%, $p=0,048$ (рис. 2).

По сравнению с аналогичными показателями после 4 курсов указанное направление изменения содержания данных популяций клеток сохраняется. В рассматриваемые сроки наблюдения у больных меланомой в случае прогрессирования заболевания обнаруживается выраженное увеличение относительного количества клеток врожденного иммунитета с цитолитической активностью: резкое увеличение НКТ-клеток – на 283% ($p=0,023$) по сравнению с исходными значениями и 309% ($p=0,018$) по сравнению с показателями после 4 курсов терапии (рис. 2). На этом фоне количество НК-лимфоцитов по завершении терапии значимо превышало на 27% ($p=0,048$) исходные значения. После проведения 4 курсов терапии выявлено увеличение на 33% ($p=0,046$) количества наивных CD8⁺ Т-лимфоцитов, что сопровождалось снижением числа наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов на 77%, $p=0,034$, по сравнению с исходными значениями до лечения (рис. 1).

В рассматриваемые сроки наблюдения выявлен разнонаправленный характер изменения количества отдельных популяций В-лимфоцитов. Обнаружено увеличение по сравнению с исходными значениями на 55% ($p=0,039$) содержания CD19⁺CD86⁺ В-лимфоцитов и снижение на 50% ($p=0,04$) и 79% ($p=0,035$) соответственно количества CD19⁺CD25⁺ и CD19⁺CD95⁺ В-лимфоцитов (рис. 2).

Определение особенностей популяционного состава клеток периферической крови после 8-го курса ИТ по отношению к исходным данным, до начала лечения выявило снижение на 73% ($p=0,039$) и 78% ($p=0,037$) относительного количества наивных Т-лимфоцитов обеих основных популяций, соответственно CD4⁺ и CD8⁺ клеток. На этом фоне обнаружено увеличение количества клеток с повышенной готовностью к апоптозу – CD4⁺CD95⁺ и

CD8+CD95+, соответственно на 28% ($p=0,047$) и 39% ($p=0,045$). Кроме того, выявлено снижение количества CD8+CD62L+ эффекторных клеток памяти на 68% ($p=0,038$) по сравнению с исходными значениями. Среди популяций В-лимфоцитов значимым оказалось снижение на 44% ($p=0,043$) клеток, несущих активационный маркер CD25+ (рис. 1).

Статистически значимыми оказались следующие отличия в популяционном составе клеток крови по сравнению с аналогичными значениями после 4-го курса терапии. Относительное число наивных CD8+ Т-лимфоцитов и CD8+ клеток эффекторной памяти было ниже на 84% ($p=0,031$) и 72% ($p=0,038$) соответственно. Кроме того, отмечен разнонаправленный характер изменений в некоторых субпопуляциях В-лимфоцитов: выявлено резкое увеличение на 414% ($p=0,019$) числа клеток с фенотипом CD19+CD95+ и, наоборот, снижение на 45% ($p=0,042$) количества CD19+CD86+ клеток (рис. 2).

После 4-го курса терапии статистически значимым по сравнению с исходными значениями оказалось только увеличение на 73% ($p=0,038$) числа ЦТЛ с маркерами ранней активации (CD8+CD38+) и уменьшение на 42% ($p=0,042$) данных клеток с маркерами поздней активации - CD8+HLA-DR+ (рис. 2).

По завершении лечения выявлено увеличение относительного количества Т-лимфоцитов, несущих маркер поздней активации (CD3+HLA-DR+) как по отношению к исходным значениям, так и по отношению к значениям показателя после 4 курсов ИТ, соответственно на 61% ($p=0,043$) и в 2 раза ($p=0,037$). Увеличение числа данной популяции, вероятно, обусловлено увеличением всех основных типов клеток – Т-лимфоцитов хелперов (CD4+HLA-DR+) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+HLA-DR+), соответственно в 2 раза ($p=0,024$) и 71% ($p=0,033$), 89% ($p=0,031$) и в 2,3 раза ($p=0,011$), что отражает повышение числа клеток адаптивного иммунитета с повышенной функциональной активностью (рис. 2). Обращает на себя внимание тот факт, что на фоне отмеченных изменений не наблюдается изменения числа клеток, несущих маркеры ранней активации, за исключением увеличения на 107% ($p=0,035$) количества CD8+CD38+ клеток.

Несомненно, особый интерес представляет выявление тех клеточных показателей периферической крови, которые потенциально могут обуславливать неблагоприятный ответ на лечение препаратами PD-1 ингибиторов, т.е. в случае прогрессирования заболевания (группа 2) по сравнению с аналогичными показателями при благоприятном ответе (группа 1).

Выявлено, что до начала терапии у больных 2-й группы наблюдается увеличение количества лимфоцитов на 93% ($p=0,029$), что сопровождается увеличением наивных CD4+ Т-клеток и CD19+CD95+ В-лимфоцитов соответственно на 49% ($p=0,037$) и 48% ($p=0,038$). При этом число DP-лимфоцитов, CD8+ клеток центральной памяти, CD19+CD86+ В-лимфоцитов,

а также CD4+CD38+ Т-клеток оказалось ниже соответственно на 50% ($p=0,039$), 28% ($p=0,043$), 77% ($p=0,032$) и 45% ($p=0,035$).

По завершении 4 курсов лечения у больных 2-й группы отмечено увеличение числа гранулоцитов на 28% ($p=0,047$), что сочеталось с уменьшением относительного количества моноцитов периферической крови на 62% ($p=0,035$), рис. 1. В эти сроки у пациентов с прогрессирующим в дальнейшем заболеванием обнаружено снижение цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов на 44% ($p=0,039$), что без изменения содержания Т-лимфоцитов хелперно-индукторной группы приводит к увеличению ИРИ на 131% ($p=0,027$). При этом выявлен разнонаправленный характер изменения количества предшественников Т-лимфоцитов у пациентов 2-й группы: снижение на 33% ($p=0,045$) числа DP-лимфоцитов и увеличение на 104% ($p=0,031$) – DN-лимфоцитов (рис. 2). Следует обратить внимание на увеличение количества В-лимфоцитов на 106% ($p=0,029$), причем если содержание субпопуляции CD19+CD25+ увеличивалось на 50% ($p=0,04$), то CD19+CD85+ и CD19+CD95+, напротив, в данные сроки оказались ниже на 58% ($p=0,039$) и 85% ($p=0,035$) соответственно у пациентов с дальнейшей прогрессией заболевания (рис. 2).

В рассматриваемые сроки наблюдения обнаруживается ряд дисбалансов в соотношении функционально значимых популяций лимфоцитов. Так, показано увеличение на 36% ($p=0,046$) количества наивных CD8+ Т-лимфоцитов, в то время как содержание наивных CD4+ Т-клеток, напротив, оказалось ниже на 68% ($p=0,034$). Кроме того, если содержание CD4+ клеток центральной и эффекторной памяти не претерпевало изменений, то обнаружено снижение на 33% ($p=0,044$) числа CD8+ клеток центральной, но резкое увеличение на в 2,3 раза ($p=0,004$) клеток CD8+ клеток эффекторной памяти. Кроме того, наблюдается увеличение на 42% ($p=0,042$) числа ЦТЛ, готовых к апоптозу (CD8+CD95+), что может указывать на определенную функциональную неполноценность эффекторных клеток адаптивного иммунитета (рис. 1).

Интересным, на наш взгляд, является также тот факт, что у пациентов с отсутствием положительного эффекта от ИТ к завершению наблюдения в периферической крови наблюдается накопление NK-лимфоцитов, которых было больше на 68% ($p=0,037$), и более выраженное снижение на 89% ($p=0,033$) количества НКТ-лимфоцитов (рис. 2).

В завершение проведения ИТ, после 8-го курса, у больных 2-й группы отмечается тенденция к снижению на 27% ($p=0,051$) содержания в крови моноцитов (рис. 1). В это время обнаруживается дисбаланс в количестве основных популяций клеток адаптивного иммунитета: снижение на 65% ($p=0,034$) числа CD4+ Т-лимфоцитов хелперов и увеличение на 53% ($p=0,036$) CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов, в результате чего ИРИ оказывается

снижен на 77% ($p=0,033$). Обращает на себя внимание выраженное увеличение на 170% ($p=0,028$) в периферической крови иммуносупрессивных Трег-лимфоцитов (рис. 1).

У больных 2-й группы после 8-го курса ИТ выявлено увеличение относительного количества В-клеток на 47% ($p=0,043$), а В-лимфоцитов с фенотипом CD19+CD86+ было ниже на 79% ($p=0,031$).

К данному сроку наблюдения у больных с последующей прогрессией заболевания обнаружен дисбаланс в процессах образования Т-лимфоцитов, что проявляется в разнонаправленном характере изменения количества предшественников данных клеток. Так, если относительное содержание DP-лимфоцитов было ниже на 75% ($p=0,035$), то количество DN-клеток, напротив, превышало в 4,3 раза ($p=0,0015$). Отмеченные изменения сопровождаются снижением содержания наивных Т-лимфоцитов обеих основных популяций адаптивного иммунитета – на 65% ($p=0,039$) и 84% ($p=0,037$) соответственно CD4+ и CD8+ клеток. Кроме того, обнаружено снижение у пациентов 2-й группы на 66% ($p=0,041$) CD8+ клеток эффекторной памяти. При этом количество клеток, готовых к апоптозу, обеих популяций оказалось выше у больных 2-й группы, соответственно на 24% ($p=0,047$) и 94% ($p=0,025$) для CD4+CD95+ и CD8+CD95+ клеток (рис. 1).

В периферической крови пациентов с прогрессией заболевания после 8-го курса ИТ наблюдается увеличение эффекторных клеток обеих популяций лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации: на 39% ($p=0,041$), 200% ($p=0,0014$), 400% ($p=0,0004$) и 320% ($p=0,0008$) соответственно CD4+CD38+, CD4+HLA-DR+, CD8+CD38+ и CD8+HLA-DR+ клеток, что может указывать на выраженную активацию адаптивного клеточного иммунитета (рис. 2).

Отмеченные изменения в содержании отдельных популяций клеток адаптивного иммунитета сочетаются с выраженным увеличением в крови эффекторных клеток врожденного иммунитета. Обнаружено увеличение относительного содержания NK- и NKT-лимфоцитов в 1,9 раза ($p=0,017$) и 96% ($p=0,023$) соответственно (рис. 2).

Применение препаратов, направленных на различные контрольные точки иммунитета, имеет своей целью деблокирование отдельных механизмов ингибирования активности соответствующих звеньев врожденного и адаптивного иммунитета у онкологических больных. Накопленный в настоящее время практический опыт использования данного вида терапии указывает на различную её эффективность при различных видах рака. Несомненно, важным вопросом является выявление закономерностей реагирования клеточного звена иммунной системы, на которое и направлено терапевтического воздействие, что может лежать в основе различной эффективности лечения пациентов.

В проведенном исследовании показано, что после 8-го курса, при ответе на терапию, происходит увеличение числа гранулоцитов и В-лимфоцитов за счет клеток с активационным рецептором CD25+. Обнаруживается снижение Treg-клеток, сочетающееся дисбалансом предшественников Т-лимфоцитов: увеличение DP- и снижение DN-лимфоцитов. Несмотря на снижение содержания CD4+, CD8+ лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации, обнаруживается увеличение наивных CD8+ клеток и CD8+ эффекторных клеток памяти. На этом фоне выявлено снижение количества клеток врожденного иммунитета - NK- и NKT-лимфоцитов.

У больных с меланомой в случае дальнейшего прогрессирования заболевания после 8 курса ИТ отмечается снижение количества CD4+ Т-лимфоцитов, а также дисбаланс в предшественниках Т-лимфоцитов – снижение содержания в периферической крови DP-лимфоцитов и увеличение DN-лимфоцитов. Обращает на себя внимание увеличение содержания CD8+ ЦТЛ с превалированием клеток, имеющих маркеры поздней активации (CD8+HLA-DR+). Кроме того, прогрессирование заболевания сопровождается увеличением относительного количества эффекторных клеток врожденного иммунитета, прежде всего NKT-лимфоцитов, как по отношению к исходным значениям, так и по сравнению с значениями после 4 курсов терапии. Наблюдается увеличение числа В-лимфоцитов, в том числе за счет популяции CD19+CD95+ клеток, которые, вероятно, могут обуславливать превалирование иммуносупрессивного статуса в организме совместно с Treg-лимфоцитами, количество которых также увеличивалось.

Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым худшие показатели общей выживаемости связаны с низким содержанием Т-хелперов в крови больных меланомой кожи, получавших ипилимумаб [9].

Известно, что особая роль в развитии злокачественных заболеваний отводится Treg-субпопуляции Т-хелперов. Несмотря на то что их предиктивная роль при проведении терапии анти-PD1-препаратами показана в ряде исследований [10], функциональная нагрузка этих клеток не однозначна. Так, если при глиобластоме увеличение количества данных клеток до лечения увеличивало риск смерти, то при использовании ипилимумаба у пациентов с меланомой кожи, наоборот, обнаруживалось увеличение содержания этих клеток относительно доноров у пациентов с наибольшей продолжительностью жизни.

Полученные в нашем исследовании результаты согласуются с данными других исследователей, согласно которым при меланоме наблюдалось более частое прогрессирование и худшие показатели общей выживаемости при увеличении содержания NKT-клеток в крови [11].

Несмотря на то что В-лимфоциты не относят к основным факторам противоопухолевого иммунного ответа, их увеличение может стать одним из показателей прогноза эффективности лечения, однако это взаимодействие может являться нелинейным [12].

По мнению исследователей, большую значимость могут иметь В-регуляторные лимфоциты, увеличение количества которых приводило к ухудшению показателей выживаемости больных раком желудка, получавших химиотерапию по схеме XELOX [13].

В настоящее время на основе комплексного исследования клеточных и гуморальных факторов врожденного и адаптивного иммунитета могут быть выделены несколько вариантов иммунного реагирования пациентов на злокачественную опухоль. При изучении местнораспространенной и метастатической меланомы кожи был выделен такой вариант, как гиперактивация иммунного ответа, что сопровождается как избыточной активностью факторов врожденного иммунитета, так и высокой активностью CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов [14]. Причём, как правило, содержание CD38⁺-лимфоцитов значительно превышает уровень CD8⁺-клеток. Важно, что показана наиболее неблагоприятная прогностическая значимость именно варианта гиперактивации ИС.

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

Заключение

Прогрессирование меланомы кожи на фоне иммунотерапии характеризуется снижением количества CD4⁺ Т-лимфоцитов, увеличением содержания Treg- и DN-клеток, а также CD8⁺ лимфоцитов с маркером поздней активации (CD8⁺HLA-DR⁺), повышением процента NKT-лимфоцитов, увеличением числа В-лимфоцитов за счет субпопуляции клеток, готовых к апоптозу (CD19⁺CD95⁺). Ответ на иммунотерапию при МК связан со стимуляцией цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺), обеспечивающих иммунологическую память при угнетении врожденной цитотоксичности (NKT-лимфоцитов), а также с угнетением иммуносупрессивных субпопуляций Т-клеток (Treg, DN) и активацией В-лимфоцитов, т.е. со стимуляцией адаптивного иммунитета.

В качестве вероятных прогностически значимых показателей ответа на терапию ингибиторами PD-1 у больных МК могут быть уровни CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺m, CD8⁺m, превышающие 78%, 50%, 66% и 30% соответственно, а также CD8⁺CD95⁺, CD19⁺CD86⁺, CD19⁺CD95⁺ клетки, количество которых ниже 60%, 12% и 21% соответственно.

Список литературы

1. Muñoz-Couselo E., Adelantado E.Z., Ortiz C., García J.S., Perez-Garcia J. NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect // *OncoTargets and therapy*. 2017. Vol. 10. P. 3941-3947. DOI: 10.2147/OTT.S117121.
2. Clark W.H Jr., From L., Bernardino E.A., Mihm M.C. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin // *Cancer research*. 1969. Vol. 29. P. 705–727.
3. Thomas N.E., Busam K.J., From L., Kricker A., Armstrong B.K., Anton-Culver H., Gruber S.B., Gallagher R.P., Zanetti R., Rosso S., Dwyer T., Venn A., Kanetsky P.A, Groben P.A., Hao H., Orlow I., Reiner A.S., Luo L., Paine S., Ollila D.W., Wilcox H., Begg C.B., Berwick M. Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study // *Journal of clinical oncology*. 2013. Vol. 31(33). P. 4252-4259. DOI: 10.1200/JCO.2013.51.3002.
4. Leach D.R., Krummel M.F., Allison J.P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996. Vol. 271. P. 1734-1736. DOI: 10.1126/science.271.5256.1734.
5. Pauken K.E., Torchia J.A., Chaudhri A., Sharpe A.H., Freeman G.J. Emerging concepts in PD-1 checkpoint biology // *Semin Immunol*. 2021. Vol. 52. P. 101480. DOI: 10.1016/j.smim.2021.101480.
6. Flies D.B., Sandler B.J., Sznol M., Chen L. Blockade of the B7-H1/PD-1 pathway for cancer immunotherapy // *The Yale journal of biology and medicine*. 2011. Vol. 84. P. 409-421.
7. Brooks D.G., Tishon A., Oldstone M.B.A., McGavern D.B. Prevention of CD8 T Cell Deletion during Chronic Viral Infection // *Viruses*. 2021. Vol. 13. P. 1189. DOI: 10.3390/v13071189.
8. Robert C., Ribas A., Schachter J., Arance A., Grob J.J., Mortier L., Daud A., Carlino M.S., McNeil C.M., Lotem M., Larkin J.M.G., Lorigan P., Neyns B., Blank C.U., Petrella T.M., Hamid O., Su S.C., Krepler C., Ibrahim N., Long G.V.. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study // *The Lancet. Oncology*. 2019. Vol. 20. P. 1239-1251. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30388-2.
9. Кадагидзе Г., Заботина Т.Н., Короткова О.В., Табаков Д.В., Черткова А.И., Борунова А.А., Панчук И.О., Самойленко И.В., Харкевич Г.Ю., Демидов Л.В. Влияние ипилимумаба на субпопуляционную структуру лимфоцитов больных диссеминированной меланомой // *Практическая онкология*. 2017. Т. 18, № 3. С. 285–297.
10. Mitsuhashi A, Okuma Y. Perspective on immune oncology with liquid biopsy, peripheral blood mononuclear cells, and microbiome with non-invasive biomarkers in cancer patients // *Clinical & translational oncology*. 2018. Vol. 20. P. 966-974. DOI: 10.1007/s12094-017-1827-7.

11. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н., Короткова О.В., Борунова А.А., Славина Е.Г. Основные субпопуляции регуляторных лимфоцитов у больных злокачественной меланомой и раком молочной железы // Иммунология. 2014. Т. 35, № 2. С. 64–67.
12. Новик А.В., Проценко С.А., Балдуева И.А., Берштейн Л.М., Анисимов В.Н., Жук И.Н., Семенова А.И., Латипова Д.Х., Ткаченко Е.В., Семиглазова Т.Ю. Оценка состояния иммунной системы у больных, получавших первую линию химиотерапии метастатической меланомы кожи в исследовании MMM-1 // Белые ночи 2019: сб. тезисов V Петербургского международного онкологического форума. 2019. С. 121.
13. Li W., Song D., Li H., Liang L., Zhao N., Liu T.. Reduction in Peripheral CD19+CD24^hCD27⁺ B Cell Frequency Predicts Favourable Clinical Course in XELOX-Treated Patients with Advanced Gastric Cancer. Cellular physiology and biochemistry // International journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology. 2017. Vol. 41. P. 2045-2052. DOI: 10.1159/000475435.
14. Muceniece A., Venskus D. How to assess immunity – the melanoma model // Riga: Ainas Mucenieces society for cancer immunotherapy. 2007. P. 1-199.