

*На правах рукописи*

**ТАБАКОВ ДМИТРИЙ ВЯЧЕСЛАВОВИЧ**

**ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК  
ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**

14.01.12 – онкология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН Стилиди Иван Сократович).

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук

**Заботина Татьяна Николаевна**

**Официальные оппоненты:**

**Кулинич Татьяна Михайловна**, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией иммунологии, онкоцитологии и клеточных технологий в онкологии научно-исследовательского отдела молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей федерального государственного бюджетного учреждения "Российский научный центр рентгенорадиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Пинегин Борис Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом №90 иммунодиагностики и иммунокоррекции федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства».

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «30» мая 2019 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24. и на сайте [www.ronc.ru](http://www.ronc.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 года.

Учёный секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

**Кадагидзе Заира Григорьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы и степень ее разработанности

Успехи в лечении онкологических больных зависят от уровня и точности диагностических мероприятий, в том числе от результатов клинико-лабораторных исследований. Методом предпочтения в научной и практической работе клинико-иммунологической лаборатории сегодня является проточная цитометрия, которая позволяет проводить многопараметровые количественные исследования на уровне «единственной клетки» в пределах многоклеточного организма.

Разработка и создание широкого спектра высокоспецифичных иммунодиагностических зондов и тест-систем на основе моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорофорами, а так же усовершенствование технических характеристик проточных цитометров в сочетании с возможностями программного обеспечения и цифровой обработки данных, послужили толчком для проведения мультипараметрического субпопуляционного анализа клеток иммунной системы.

До недавнего времени, изучение структуры клеточного звена иммунитета проводилось с применением однопараметрового анализа поверхностных антигенов цитоплазматической мембраны. Однако, согласно современным представлениям, отличительной особенностью клеток иммунной системы является их фенотипическая гетерогенность. Оказалось, что для большинства иммунокомпетентных клеток, участвующих в генерации как специфического, так и неспецифического иммунного ответа, не существует единичного специфического белка-маркера, а их идентификация возможна только при одновременном изучении коэкспрессии антигенов с применением стратегии последовательного гейтирования белок-специфических клеток (Chang, P.P., 2015).

Например, установлено, что поверхностный антиген CD8 не является строго специфичным для цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) и представлен не только на ЦТЛ, но и на Т-лимфоцитах с супрессорной активностью (Korecka-Polak A., 2016). Известно так же, что молекулу CD8 экспрессируют не только эти субпопуляции лимфоцитов, но и отдельные клоны других клеток: макрофаги, тучные клетки, дендритные клетки, а также натуральные киллеры (NK-клетки). Не существует также единственного белка, характерного для NK-клеток и для фенотипической идентификации этих клеток требуется наличие целого ряда дополнительных маркеров (Tarazona R., 2015).

При столь высокой степени фенотипической гетерогенности, тем не менее, основные механизмы цитотоксического действия ЦТЛ и NK-клеток сходны и реализуются путем экзоцитоза литических гранул, в частности, перфорина и гранзимов, с последующим

осмотическим «взрывом» и гибелью клеток мишеней. Известно, что действие тандема этих молекул необратимо. Функционирование цитотоксических эффекторных Т-лимфоцитов является антигенспецифическим, в то время как, НК клетки не обладают иммунологической памятью, и проявление их функциональной активности не связано с антигенами главного комплекса гистосовместимости МНС (Zamora, A.E., 2015). Более того, обнаружено, что и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, и НК-клетки, в зависимости от количества белка или степени (плотности) экспрессии антигенов на мембране, наличия на поверхности клеток ко-стимулирующих, адгезивных молекул и многих других факторов, способны к реализации различной функциональной активности (Kienzle N, 2002).

Известно, что эффекторное звено клеточного иммунитета является одним из важнейших компонентов противоопухолевой защиты при солидных новообразованиях, что делает планируемое исследование структурной и функциональной гетерогенности субпопуляций клеток-эффекторов периферической крови в норме и у онкологических больных актуальным, высокотехнологичным и своевременным.

### **Цель исследования**

Цель работы – выявить фенотипическую гетерогенность, опосредующую функциональную активность эффекторных клеток у здоровых доноров и онкологических больных.

### **Задачи исследования**

1. Изучить субпопуляционное соотношение CD45<sup>+</sup> лимфоидных клеток с высокой и низкой плотностью поверхностного антигена CD8 у здоровых доноров и онкологических больных.
2. Изучить субпопуляционное соотношение CD45<sup>+</sup> лимфоидных клеток с высокой и низкой плотностью поверхностного антигена CD16 у здоровых доноров и онкологических больных.
3. Определить коэкспрессию CD8, CD16 и CD3 на лимфоидных CD45<sup>+</sup> клетках у здоровых доноров и онкологических больных.
4. Изучить цитотоксический потенциал эффекторных лимфоцитов с различной плотностью поверхностных антигенов CD8 и CD16 по оценке уровня внутриклеточного перфорины у доноров и онкологических больных.
5. Выявить особенности популяционной и субпопуляционной структуры эффекторных клеток (ЭК) у онкологических больных различных нозологических форм (рак яичников, рак молочной железы, рак слизистой оболочки полости рта, меланома).

## **Научная новизна**

Впервые подробно описана фенотипическая и функциональная гетерогенность эффекторных иммунокомпетентных клеток у здоровых доноров и онкологических больных, что делает эту работу базовой для дальнейших исследований субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток.

## **Практическая и теоретическая значимость**

Полученные знания о субпопуляционной структуре, особенностях иммунофенотипа и функциональной активности эффекторных клеток иммунной системы при различных нозологиях позволяют установить направление генерации иммунных реакций у больных онкологическими заболеваниями. Выявлены отличия структуры эффекторных субпопуляций онкологических больных различных нозологических форм опухолей и здоровых лиц. Выяснение баланса иммунокомпетентных клеток, контролирующих процессы активации и/или супрессии, в сочетании с клинико-патологическими данными послужит основой для определения прогностических факторов клинического течения заболевания и противоопухолевого контроля заболевания.

## **Методология и методы исследования**

Исследованы образцы периферической крови 389 больных, находившихся на обследовании и лечении в НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н.Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, среди них 91 больной первично-операбельным раком яичника (РЯ), 82 – диссеминированной меланомой, 72 – первично-операбельным раком слизистой оболочки полости рта (РСОПР) и 144 – первично-операбельным раком молочной железы (РМЖ). Средний возраст пациентов составил 52,9. Группы онкологических больных раком молочной железы и раком яичников составили женщины со средним возрастом 56,7 и 51,1 соответственно. Среди пациентов, страдающих раком слизистой полости рта, было 39 женщин (54,1%) и 33 мужчины (45,9%). Средний возраст составил 54,8. В группе больных меланомой средний возраст равнялся 49,3, количество женщин составило 50 (60,9%), а мужчин – 32 (39,1%). Большинство пациентов имело T1-T3 стадии опухолевого роста. Контрольную группу составили 64 практически здоровых донора. Кровь забирали из локтевой вены натощак, в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА.

Выделение мононуклеарных клеток осуществляли стандартным методом разделения на градиенте плотности фиколла-верографина (1,077г/см). Окрашивание выделенных клеток проводили методом реакции прямой иммунофлуоресценции, для чего использовались моноклональные антитела производства Beckman Coulter и BD Biosciences (США). Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови больных онкологическими

заболеваниями и здоровых доноров проводили методом многопараметрового цитометрического анализа. В работе использовали двухлазерный пятипараметровый проточный цитометр аналитического типа FACSCalibur BD Biosciences (США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистической программы «Statistica 7.0». Данные анамнеза, клинических проявлений, местного статуса, лабораторных иммунологических исследований, операций, а также цитологических и гистологических заключений для каждого пациента были внесены в специально разработанную базу, на основе которой проводился анализ полученного материала и результатов.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Фенотипические, функциональные характеристики клеток адаптивного и приобретенного иммунитета, их субпопуляционная структура, сильно варьируют у онкологических больных.

2. У онкологических больных выявлен широкий диапазон значений  $CD8^+$  лимфоцитов от 7% до 60%, при этом для большинства (>45%) пациентов каждой нозологической формы характерны повышенные уровни маркера, 20-40% пациентов – нормальные значения. Установлено, что высокая плотность антигена CD8 характерна для  $CD3^+CD8^+$  ЦТЛ, низкая плотность CD8 – для НК-клеток.  $CD3^+CD16^+CD56^+$  NKT-лимфоциты экспрессируют CD8 как с высокой, так и низкой плотностью.

3. НК-лимфоциты экспрессируют антиген CD16 со средней и низкой плотностью и характеризуются фенотипом  $CD3^-CD16^{low}$ . NKT-лимфоциты экспрессируют CD16 с низкой плотностью и представлены фенотипом  $CD3^+CD16^{low}$ . У больных раком молочной железы выявлено повышенное процентное содержание  $CD3^+CD16^+$  NKT-лимфоцитов. Для больных раком яичников характерно повышение  $CD3^-CD16^{low}$  НК-клеток.

4. У онкологических больных всех нозологических форм с высокими уровнями маркера CD8 повышено число  $CD8^+CD16^+$  клеток за счет увеличения содержания НК- и/или  $CD3^+CD8^{high}CD16^{low}$  NKT-клеток.

5. У онкологических больных выявлено наличие перфорин-содержащей популяции  $CD8^{low}$  лимфоцитов (7,7 (5,4; 12)%), отсутствующей у здоровых лиц.

6. Для онкологических больных с различным уровнем CD8-клеток характерна определенная субпопуляционная структура эффекторных клеток.

7. Для онкологических больных с высоким уровнем CD8-клеток выявлены статистически достоверные повышенные значения  $CD8^+Perforin^+$  клеток. При нормальном содержании  $CD8^+$  лимфоцитов количество перфорин-содержащих  $CD8^+Perforin^+$  клеток снижено или соответствует показателям здоровых. У больных с низким уровнем  $CD8^+$  клеток количество

CD8<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> лимфоцитов резко снижено по сравнению с донорами.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – онкология («медицинские науки»), конкретно пункту 2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)»

### **Степень достоверности и апробация результатов**

При проведении исследований использовано сертифицированное современное оборудование. Для иммунофенотипического анализа применялись антитела, предназначенные для клинических исследований с помощью проточной цитометрии. Методами статистической обработки установлена воспроизводимость и достоверность результатов исследования.

Полученные данные были изложены в трех статьях, пяти тезисах, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК, и представлены на конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» в 2016 году. Полученная в результате исследования информация используется в работе лаборатории.

Апробация диссертации состоялась 22 июня 2018 года на совместной научной конференции лаборатории клинической иммунологии опухолей, лаборатории иммунологии гемопоэза централизованного клиничко-лабораторного отдела, отделения хирургического №10 (биотерапии опухолей), отделения хирургического №11 (опухолей верхних дыхательно-пищеварительных путей), отделения радиохирургии, отделения хирургического №5 (опухолей молочной железы) НИИ КО им. академика РАН и РАМН Н.Н.Трапезникова, лаборатории клеточного иммунитета НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

### **Личный вклад автора**

Автором самостоятельно проведён анализ отечественной и зарубежной литературы, посвящённой изучаемой в представленной работе проблеме. Все экспериментальные данные и результаты, содержащиеся в диссертации, получены автором лично. Автором определены факторы для создания базы данных и сформированы электронные таблицы для проведения статистического анализа. Автором проведена статистическая обработка и интерпретация данных, полученных в результате исследования, сформулированы выводы и оформлена диссертационная работа.

## Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 работы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

## Объём и структура работы

Диссертационная работа изложена на 138 страницах машинописного текста, иллюстрирована 13 таблицами, и 12 рисунками. Состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы. Список использованных литературных источников состоит из 254 работ, из них 240 иностранных авторов.

## СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

### Материалы и методы

В исследование включены образцы периферической крови (ПК) 389 онкологических больных: первично-операбельным раком яичников (РЯ) – 91, раком слизистой оболочки полости рта (РСОПР) – 72, раком молочной железы (РМЖ) – 144, диссеминированной меланомой – 82 и 64 доноров.

Иммунофенотипирование лимфоцитов ПК больных и доноров проводили методом многопараметрового цитометрического анализа. Выделение лимфоцитов из периферической крови осуществляли с помощью стандартной методики разделения клеток на градиенте плотности фиколла-урографина (1,077 г/см).

Окрашивание клеток осуществляли в стандартной прямой реакции иммунофлуоресценции с применением моноклональных антител (МКА), конъюгированных различными флуорохромами: FITC, PE, PE-Cy5 (производства Beckman Coulter, BD Biosciences, США). Использовали следующие комбинации МКА к дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека: CD45/CD14, CD3/CD8, CD3/CD16+CD56, CD8/Perforin/CD16.

Цитометрический анализ проводили на двухлазерном проточном цитометре аналитического типа FACSCalibur с применением пакета программного обеспечения сбора и анализа данных CELLQuest (BD Biosciences, США). Выделение гейта клеток осуществляли в смешанном линейно-логарифмическом режиме SSC vs CD45.

В каждом образце накапливали и анализировали не менее 3000 событий в гейте лимфоцитов. Обработку файлов первичных цитометрических данных проводили с использованием программного пакета WinMDI 2.8, учитывали относительное число антигенпозитивных клеток (%). Для статистической обработки результатов использовали программу «Statistica 7.0».

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Структура эффекторного звена доноров и онкологических больных

Определен субпопуляционный состав ЭК у доноров: CD8 —35,5%, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> — 27%, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> — 8,1 %, CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> — 15,9%, CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> — 9,4% клеток (таблица 1). У здоровых доноров большинство эффекторных клеток представляют собой ЦТЛ (51,6% от ЭК). НК-лимфоциты составляют почти треть от всех ЭК (30,4%), на долю НКТ-лимфоцитов приходится 17,9% (таблица 2). Полученные данные соответствуют результатам более ранних исследований нашей лаборатории и других авторов (Заботина Т.Н. 2015, Селимова Л.М. 2014, Хайдуков С.В., 2009).

**Таблица 1** — Основные субпопуляции эффекторных лимфоцитов у доноров и онкологических больных (% от CD45<sup>+</sup> клеток). Данные представлены в форме медианы и квартилей. P - уровень значимости при сравнении: 1 - больных РЯ с донорами, 2 – больных меланомой с донорами, 3 - больных РСОПР с донорами, 4 – больных РМЖ с донорами.

	доноры	РЯ	Мелано ма	РСО ПР	РМЖ	p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>	p <sup>4</sup>
CD8 <sup>+</sup>	35,5 (30,6; 41,1)	34,7 (27,3; 40)	35,4 (28,6; 41,1)	36,3 (29,1; 45,4)	38,6 (33,4; 45,8)	0,82	0,76	0,49	0,33
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	27 (22,3; 30,7)	20,8 (12,5; 29,7)	27,3 (16,3; 22,6)	27,9 (19,4; 39,7)	26 (19; 30,7)	<b>0,04</b>	0,79	0,12	0,05
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup>	15,9 (11,5; 19)	22,6 (14,5; 31,3)	14 (10,2; 20,5)	14,4 (10,3; 24,7)	19,3 (11,4; 26,3)	<b>0,00</b>	0,93	<b>0,02</b>	0,07
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup>	9,4 (5,3; 14,2)	8,5 (4,6; 14,8)	9,7 (6,1; 14,7)	12,7 (8; 19)	14,8 (8,9; 19,2)	0,94	0,19	0,19	<b>0,01</b>

**Таблица 2** — Доля основных субпопуляций ЭК у доноров и онкологических больных

	доноры	РЯ	Меланома	РСОПР	РМЖ
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	51,6%	40,1%	53,5%	50,7%	43,3%
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup>	30,4%	43,5%	27,4%	26,1%	32,1%
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup>	17,9%	16,3%	19,0%	23,1%	24,6%

Количество CD8-положительных клеток (общего CD8) составило у больных раком яичников – 34,7 (27,3; 40)%, у больных меланомой – 35,4 (28,6; 41,1)%, у больных РСОПР – 36,3 (29,1; 45,4)%, у больных РМЖ – 38,6 (33,4; 45,8)%, что практически совпадает с нормальными значениями. Также было выявлено, что содержание популяций эффекторных клеток онкологических больных в большинстве случаев находится в диапазоне нормы, и большая часть ЭК представляет собой ЦТЛ (>43% от ЭК, таблица 2). Отсутствие заметного

изменения содержания основных популяций ЭК у онкологических больных отмечалось и другими авторами (Wang W.J., 2013; Laytragoon-Lewin N. 2014, Абакушина Е.В. 2014, Alves P.C., 2011). На основании этих наблюдений многие авторы делают вывод о том, что опухоль не оказывает влияния на системный иммунитет (Riazi R.F., 2015).

В нашем исследовании при анализе групп доноров и онкологических больных обнаружены различия в содержании НКТ-лимфоцитов у больных раком слизистой оболочки полости рта и раком молочной железы (РЯ – 8,5 (4,6; 14,8)%, меланома – 9,7 (6,1; 14,7)%, РСОПР – 12,7 (8; 19)%, РМЖ - 14,8 (8,9; 19,2)%). Это подтверждается и литературными данными, так, описано увеличение количества НКТ-лимфоцитов в эпителиальных опухолях, к которым относятся и приведенные выше нозологические формы (Zdrzilova-Dubska L., 2012).

При анализе НК-лимфоцитов нами показано увеличение количества данной популяции у больных раком яичников (22,6 (14,5; 31,3)%) и повышение доли их в структуре ЭК до 43,5% за счет снижения доли ЦТЛ. Это позволяет сделать вывод, что основную роль в противоопухолевом ответе у больных раком яичников играют именно НК-лимфоциты.

### **Характеристика пациентов по уровню экспрессии маркера CD8**

При изучении структуры ЭК онкологических больных был выявлен широкий диапазон количества CD8<sup>+</sup> клеток (от 7% до 60% лимфоцитов), в связи с этим больные каждой нозологической формой были разделены на подгруппы по значению этого маркера. Были отобраны подгруппы с высокими значениями количества CD8<sup>+</sup> клеток (>35%), нормальными (25-35%) и низкими (<25%) согласно принятым в лаборатории нормам данного маркера. Большинство пациентов вошли в группу с повышенным количеством CD8<sup>+</sup> клеток (рак яичников – 44(48,3%), меланома – 43(52,4%), РСОПР – 50(69,4%), РМЖ – 75(52,1%)). В подгруппах с нормальными значениями CD8-положительных клеток средние значения экспрессии CD8 оказались меньше показателей здоровых лиц (таблица 3).

**Таблица 3** — Распределение больных по уровню экспрессии маркера CD8

	Высокий уровень CD8	Нормальный уровень CD8	Низкий уровень CD8
PCOPP N CD8	50 (69,4%) 41,2 (37,6; 45,5)%	17 (23,6%) 28,5 (25,1; 31,3)%	5 (6,9%) 21,1 (16,3; 22,6)%
РЯ N CD8	44 (48,3%) 41,7 (37,8; 48,2)%	37 (40,6%) 31 (28,8; 33,3)%	10 (10,9%) 22,9 (20,5; 23,5)%
Меланома N CD8	43 (52,4%) 41,5 (38,9; 45)%	33 (40,2%) 30 (26,4; 33)%	6 (7,3%) 19,3 (14,6; 22,8)%
PMЖ N CD8	75 (52,1%) 45,3 (39,7; 49,5)%	56 (38,8%) 30,5 (27,8; 33,6)%	13 (9,0%) 18,1 (15,9; 20,8)%

Для больных всех нозологических форм выявлены общие закономерности в субпопуляционной структуре ЭК. В группе пациентов с повышенным уровнем CD8<sup>+</sup> клеток наблюдается повышение медианы популяции ЦТЛ и НКТ-клеток. Уменьшение уровня CD8<sup>+</sup> клеток сопровождается снижением количества ЦТЛ и НКТ-клеток (таблица 4).

**Таблица 4** — Субпопуляции эффекторных лимфоцитов у здоровых доноров и онкологических больных. Данные представлены в виде медианы и квартилей.

	CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>
доноры	35,5 (30,6; 41,1)	27 (22,3; 30,7)	8,1 (5,9; 12,1)	15,9 (11,5; 19)	9,4 (5,3; 14,2)
РЯ	34,7 (27,3; 40)	20,8* (12,5; 29,7)	11,1 (6,7; 15,1)	22,6* (14,5; 31,3)	8,5 (4,6; 14,8)
↑ CD8	41,7* (37,8; 48,2)	31 (25,3; 36)	11,1* (6,4; 15,5)	21,6* (15,3; 27,5)	12,8* (8,2; 20,2)
NCD8	31 (28,8; 33,3)	19,2* (9,8; 23,6)	11,7 (6,8; 16,1)	20,9* (13,4; 33,6)	8,4 (4,2; 11)
↓ CD8	22,9* (20,5; 23,5)	14,9* (12,5; 18,8)	4,6* (3,9; 7,9)	15,7 (12; 30,6)	5,5* (3,6; 7,7)
Меланома	35,4 (28,6; 41,1)	27,3 (16,3; 22,6)	7,7 (5,3; 11,1)	14 (10,2; 20,5)	9,7 (6,1; 14,7)
↑ CD8	41,5* (38,9; 45)	32,8 (28,4; 37,1)	8,9 (6,3; 11,8)	14,6 (12,2; 22,9)	12,9* (8,2; 21,3)
NCD8	30 (26,4; 33)	20,8* (13,6; 23,3)	7,4 (4,6; 13,7)	14,1 (9,3; 19,8)	7,6 (5,6; 12,7)
↓ CD8	19,3* (14,6; 22,8)	15,9* (12,2; 20,2)	2,8* (2,2; 4,5)	6,7 (5,4; 11,7)	5,3* (3,8; 8,3)
PCOПP	36,3 (29,1; 45,4)	27,9 (19,4; 39,7)	10,3* (6,2; 14,8)	14,4* (10,3; 24,7)	12,7* (8; 19)
↑ CD8	41,2* (37,6; 45,5)	29,8 (22,8; 33,5)	13,3* (8,3; 20,2)	21,4* (11,5; 26,3)	14,1* (10,3; 18,7)
NCD8	28,5 (25,1; 31,3)	18,6* (13,3; 23,1)	8,2 (7,2; 12)	15,6 (13,1; 24,6)	6,9 (3; 10,5)
↓ CD8	21,1* (16,3; 22,6)	12,9* (12,5; 13,3)	8,2 (7,3; 10,1)	17,4 (11,5; 33,9)	2,2* (1,5; 8)
PMЖ	38,6 (33,4; 45,8)	26* (19; 30,7)	12,6* (8,3; 16,8)	19,3 (11,4; 26,3)	14,8* (8,9; 19,2)
↑ CD8	45,3* (39,7; 49,5)	29,9 (25,4; 33,8)	12,8* (9,8; 19,2)	17,6 (11,4; 23,8)	15,9* (10,9; 21,4)
NCD8	30,5 (27,8; 33,6)	20,2* (15,9; 23,5)	10,6 (5,5; 14,3)	18,2 (11,5; 26,6)	11,6 (7,8; 17,9)
↓ CD8	18,1* (15,9; 20,8)	9,5* (6,1; 11,2)	7,4* (6,4; 9,4)	16,6 (9; 26,8)	6,5* (4,9; 13,4)

↑ — повышенные значения по сравнению с нормой

↓ — пониженные значения по сравнению с нормой

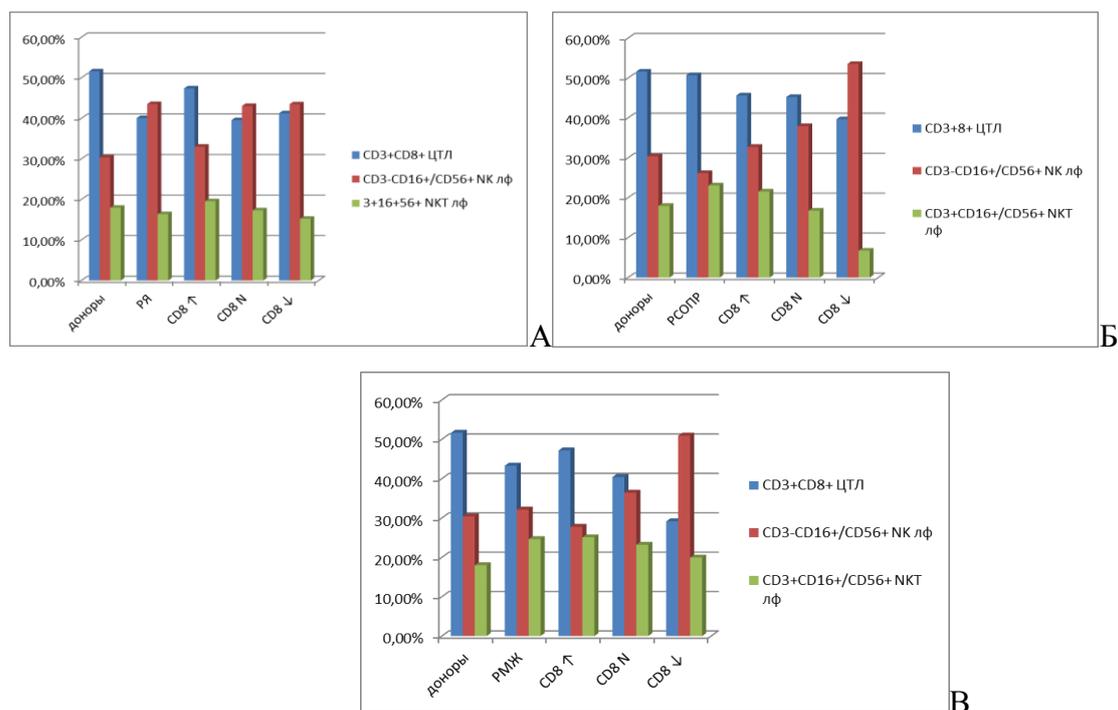
N — нормальные значения

\* - достоверная статистическая разница при сравнении с донорами (p<0,05)

При нормальных значениях CD8-положительных клеток количество ЦТЛ снижено по сравнению с донорами, а количество НКТ-клеток соответствует диапазону нормальных значений.

Количество НК-лимфоцитов слабо изменяется при уменьшении CD8-положительных клеток, не составляя статистически значимых различий с нормальными значениями (таблица 4).

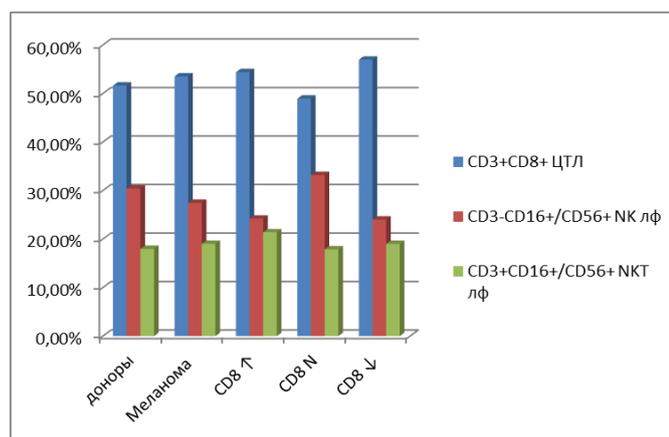
Для больных раком яичников, раком слизистой оболочки полости рта и раком молочной железы выявлена общая тенденция к уменьшению доли цитотоксических Т-лимфоцитов в структуре эффекторного звена со снижением общего количества CD8-положительных клеток (см. рис. 3). Одновременно со снижением процентного содержания ЦТЛ, уменьшалась и доля НКТ-лимфоцитов при данных заболеваниях. За счет уменьшения долей данных двух популяций, НК-лимфоциты в группе с низкими уровнями CD8<sup>+</sup> клеток составляли большую часть эффекторных клеток. По-видимому, основную роль в противоопухолевом ответе у таких групп пациентов играют CD8<sup>-</sup> НК-клетки, особенностью которых является то, что они не подвергаются апоптозу при взаимодействии с МНС-I.



**Рисунок 3** — Субпопуляционная структура эффекторных клеток при различных нозологиях онкологических заболеваний в зависимости от уровня экспрессии CD8: А – у больных раком яичников, Б – больных раком слизистой оболочки полости рта, В – больных раком молочной железы.

У больных меланомой преобладание цитотоксических Т-лимфоцитов сохранялось во всех группах по содержанию маркера CD8 (54,3%; 48,9% и 56,9% от ЭК). Уровень НК-

лимфоцитов увеличивался в группе с нормальными значениями CD8-клеток (с 24,2% до 33,1%), но при низких значениях этого маркера возвращался к исходному уровню (24,0%). Доля НКТ-лимфоцитов лишь незначительно колебалась (21,3%; 17,9% и 18,9%) во всех трех группах (рис 4). По-видимому, достаточная иммуногенность меланомы позволяет цитотоксическим Т-лимфоцитам развивать специфический иммунный ответ и оставаться ведущей популяцией ЭК во всех группах больных меланомой с различным содержанием CD8<sup>+</sup> клеток.



**Рисунок 4** — Процентное соотношение субпопуляций эффекторных клеток у больных меланомой в зависимости от уровня экспрессии CD8.

#### Субпопуляционный баланс ЭК в зависимости от стадии заболевания

Проведен анализ субпопуляционной структуры ЭК онкологических пациентов различных стадий заболевания. У большинства больных РСОПР (47) диагностирована I-II стадия заболевания, что составляет 65,2% от выборки, в то время как III-IV стадия была зафиксирована у 25 (34,8%) пациентов. Также проанализированы образцы крови 144 больных РМЖ, среди которых первая-вторая стадии диагностированы у 114 пациенток (79,2%), а третья стадия – у 30 (20,8%). Больные четвертой стадии РМЖ в нашей выборке отсутствовали.

Содержание CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов у больных РСОПР и РМЖ I-II и III-IV стадий значимо не отличаются между собой и донорами, хотя медиана количества CD8-положительных клеток на III-IV стадии была несколько выше. При анализе популяции ЦТЛ было показано, что содержание CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток у больных I-II стадий значительно ниже показателей здоровых лиц. При этом у пациентов III-IV стадий число ЦТЛ у больных РМЖ достигает нормальных значений, а у больных РСОПР превышает его.

При сравнении показателей врожденного иммунитета были выявлены достоверные различия содержания CD16-позитивных клеток между онкологическими больными I-II стадий и донорами (25,0 (21,0; 30,0)% и 18,8 (14,4; 23,9)% соответственно) (таблицы 5,6).

**Таблица 5** — Субпопуляции эффекторных лимфоцитов у больных различных стадий рака слизистой оболочки полости рта и доноров. P – уровень значимости при сравнении значений по критерию Манна-Уитни.

Показатель	Стадии 1-2 (Ме и квартили)	Стадии 3-4 (Ме и квартили)	Доноры (Ме и квартили)	P <sup>1-2</sup> с донорами	P <sup>3-4</sup> с донорами	p(1-2 с 3-4)
CD3+	76,4 (58,8; 81,8)	76,0 (72,2; 79,7)	72,8 (67,7; 78,7)	0,391429	0,327441	0,606498
CD3+CD8+	19,4 (13,3; 26,8)	32,2 (28,5; 41,2)	27,1 (22,2; 31,0)	0,056844	0,238345	<b>0,035735</b>
CD3-CD8+	9,5 (6,6; 14,8)	7,8 (6,2; 11,0)	8,1 (5,9; 12,3)	0,595736	0,645758	0,500589
CD8+	36,2 (25,7; 41,1)	41,3 (34,7; 44,9)	35,6 (30,5; 41,2)	0,327352	0,337410	0,122290
CD3-CD16+CD56+	14,4 (9,7; 26,1)	12,7 (10,1; 17,0)	16,0 (11,5; 19,0)	0,138129	0,810467	0,362142
CD3+CD16+CD56+	9,6 (7,7; 12,8)	17,2 (9,0; 20,8)	9,4 (5,1; 14,3)	<b>0,022289</b>	0,984055	0,191041
CD16+	25,0 (21,0; 30,0)	17,3 (16,2; 18,8)	18,8 (14,4; 23,9)	<b>0,009139</b>	0,537555	0,062575

**Таблица 6** — Субпопуляции эффекторных лимфоцитов у больных РМЖ различных стадий и доноров. P – уровень значимости при сравнении значений по критерию Манна-Уитни.

Показатель	Стадии 1-2(Ме и квартили)	Стадия 3(Ме и квартили)	Доноры (Ме и квартили)	P <sup>1-2</sup> с донорами	P <sup>3-4</sup> с донорами	p(1-2 с 3-4)
CD3+	54,4 (52; 59,1)	71,0 (57,3; 76,5)	72,8 (67,7; 78,7)	<b>0,000000</b>	0,158849	<b>0,000484</b>
CD3+CD8+	16,95 (14,0; 24,1)	21,55 (16,9; 29,6)	27,1 (22,2; 31,0)	<b>0,000053</b>	0,066372	0,131531
CD3-CD8+	17,15 (14,0; 27,9)	11,5 (6,9; 14,8)	8,1 (5,9; 12,3)	<b>0,000000</b>	0,081087	<b>0,002964</b>
CD8+	37,6 (30,1; 47,4)	34,2 (28,7; 42,0)	35,6 (30,5; 41,2)	0,151341	0,774365	0,198309
CD3-CD16+CD56+	29,35 (26,1; 34,5)	16,3 (10,1; 23,1)	16,0 (11,5; 19,0)	<b>0,000000</b>	0,558185	0,000137
CD3+CD16+CD56+	10,9 (7,6; 18,0)	9,65 (6,3; 16,6)	9,4 (5,1; 14,3)	0,276308	0,687273	0,524930
CD16+	30,25 (23,9; 35,3)	18,1 (14,7; 25,5)	18,8 (14,4; 23,9)	<b>0,000007</b>	0,890157	0,002690

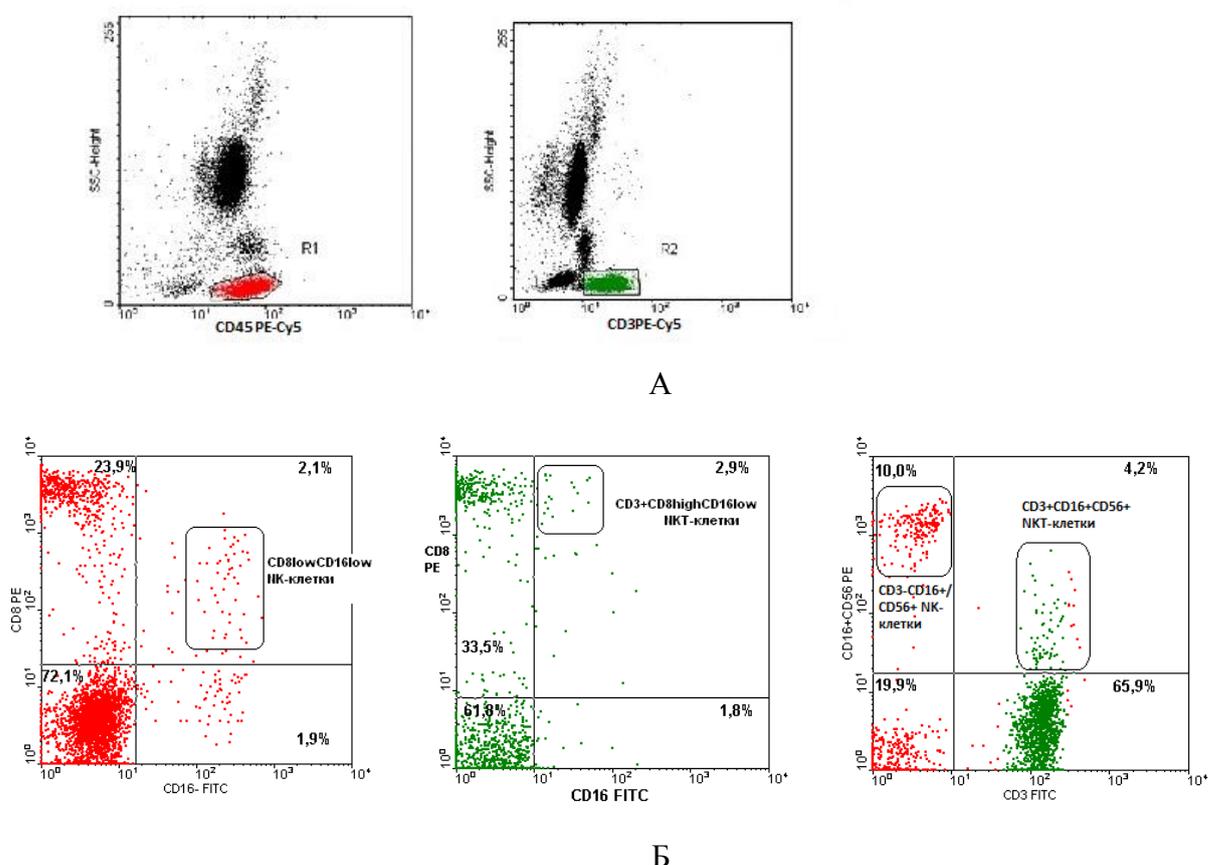
При этом у пациентов III-IV стадий количество  $CD16^+$  лимфоцитов соответствовало нормальным значениям (17,3(16,2; 18,8)% — РСОПР; 18,1 (14,7; 25,5)% — РМЖ). У больных РСОПР количество НКТ-лимфоцитов при I-II стадиях составило 9,6 (7,7; 12,8)% при значении нормы 9,4 (5,1; 14,3)%, что оказалось статистически значимым различием. Число НКТ-клеток у больных III-IV стадий составило 17,2 (9,0; 20,8)%, но различие оказалось недостоверным как при сравнении с донорами, так и с больными I-II стадий. У больных РМЖ значения НК-лимфоцитов у больных I-II стадий (29,4 (26,1; 34,5)%) были повышены по сравнению с донорами и пациентами III стадии опухолевого роста (16,0 (11,5; 19,0)% и 16,3 (10,1; 23,1)%), количество НКТ-лимфоцитов не изменялось.

Данные наблюдения могут свидетельствовать о переключении механизма противоопухолевого ответа с врожденного на адаптивный иммунитет, и свидетельствует в пользу накопления Т-клеток в опухоли как вторичного процесса.

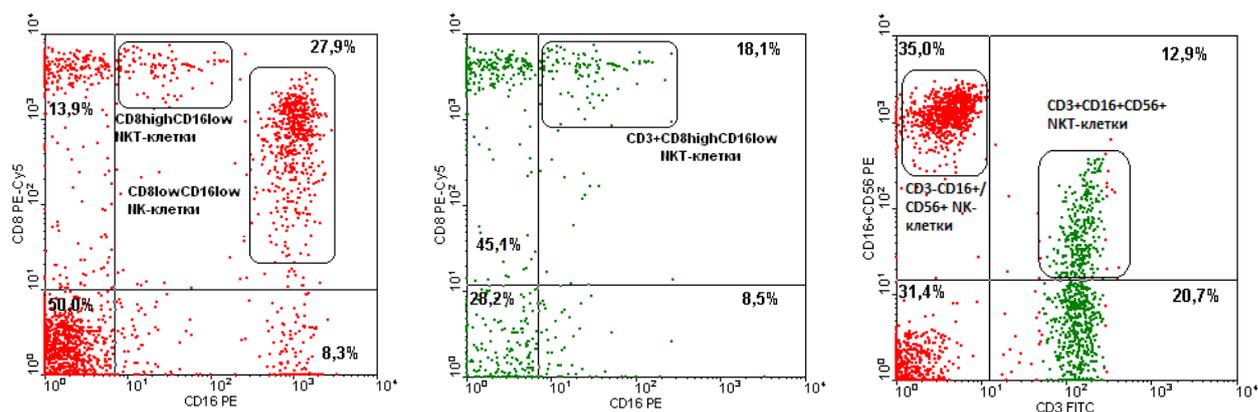
#### **Кокспрессия CD8, CD16 и CD3 на лимфоидных CD45+ клетках у здоровых доноров и онкологических больных**

В нашем исследовании проанализирована коэкспрессия CD8 с молекулой CD16 на лимфоцитах. У здоровых доноров количество двойных позитивных по этим молекулам клеток составило 9,1 (5,6; 13,7)%. Эти данные близки к результатам зарубежных исследований (Mansour I., 1990). DotPlot анализ с последовательным гейтированием  $CD3^+$  лимфоцитов позволил отнести  $CD8^{high}CD16^{low}$  популяцию к НКТ-лимфоцитам, в то время как  $CD8^{low}CD16^{low}$ -клетки представляют собой НК-лимфоциты (рисунок 5). Наибольшее количество лимфоцитов, коэкспрессирующих CD8 и CD16 составляют  $CD8^{low}CD16^{low}$  клетки. Субпопуляция лимфоцитов с фенотипом  $CD8^{high}CD16^{low}$  не превышает 5% у здоровых доноров, что связано с небольшим количеством НКТ-клеток у этой исследуемой группы. У онкологических больных было зафиксировано незначительное повышение количества двойных позитивных клеток по данным маркерам, выраженное лишь в группе больных с высоким уровнем CD8. Видимо, это связано с увеличением уровня НКТ-клеток и НК-лимфоцитов в данной группе, причем количество  $CD8^+CD16^+$  клеток в группах с различным уровнем CD8 соответствует количеству НК-лимфоцитов, так как они представляют собой наибольшую долю этих клеток. В общих группах без деления по количеству CD8-положительных клеток, как и в случаях с анализом других субпопуляций, уровень данных клеток оказывается в диапазоне нормы (таблица 7). Большинство  $CD8^+CD16^+$ -лимфоцитов так же составляют  $CD8^{low}CD16^{low}$ -клетки, однако их количество повышено (до 20% от  $CD3^+$  клеток), и данная популяция четко визуализируется на

DotPlot (рисунок 6). Увеличено и количество  $CD8^{high}CD16^{low}$ -лимфоцитов, относящихся к NKT-клеткам. При этом, у больных I-II стадий РМЖ и РСОРП количество  $CD8^{+}CD16^{+}$ -лимфоцитов выше (9,0 (7,2; 9,9)%), чем у пациентов III-IV стадий (5,1 (3,7; 6,9)%), что также указывает на снижение роли врожденного звена иммунной системы на поздних стадиях, как было описано выше. Необходимо заметить, что количество двойных позитивных клеток всегда ниже, чем количество NK- и NKT лимфоцитов, определяемых с помощью набора  $CD3/CD16\&56$ , так как не все NK и NKT-лимфоциты экспрессируют CD8 на своей поверхности (см. таблицу 7).



**Рисунок 5** — Анализ коэкспрессии маркеров CD8 и CD16 у здоровых доноров. А – последовательное гейтирование  $CD45^{+}$  лимфоцитов и  $CD3^{+}$  клеток. Б – Сравнение коэкспрессии маркеров в популяции  $CD45^{+}$  лимфоцитов (слева) и  $CD45^{+}CD3^{+}$  (по центру), выделенных методом последовательного гейтирования. Для сравнения представлен дот-плот, на котором визуализированы популяции NK и NKT-лимфоцитов при анализе с помощью набора антител  $CD3/CD16+CD56$  (справа).  $CD3^{+}$  лимфоциты выделены зеленым цветом.



**Рисунок 6** — Анализ коэкспрессии маркеров CD8 и CD16 у онкологических больных с повышенными значениями CD8 в популяции CD45<sup>+</sup> лимфоцитов (слева) и CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (по центру), выделенных методом последовательного гейтирования. Для сравнения представлен DotPlot, на котором визуализированы популяции NK и NKT-лимфоцитов при анализе с помощью набора антител CD3/CD16&56(справа). CD3<sup>+</sup> лимфоциты выделены зеленым цветом.

**Таблица 7** — Сравнительная характеристика коэкспрессии маркеров CD8 и CD16 у доноров и онкологических больных

	CD8+CD16+ (Me и квартили)	CD3-CD16+CD56+ (Me и квартили)
<b>доноры</b>	9,1 (5,6; 13,7)	15,9 (11,5; 19)
<b>РЯ</b>	8,0 (5,4; 11,4)	22,6 (14,5; 31,3)*
↑ CD8	10,7 (6,5; 15,6)*	21,6(15,3; 27,5)*
NCD8	7,4 (4,8; 10,7)	20,9 (13,4; 33,6)*
↓ CD8	3,2 (2,6; 5,6)*	15,7 (12; 30,6)
<b>Меланома</b>	6,7 (4,3; 9,8)	14 (10,2; 20,5)
↑ CD8	8,8 (6,5; 13,5)	14,6 (12,2; 22,9)
NCD8	5,7 (3,9; 8,8)	14,1 (9,3; 19,8)
↓ CD8	2,3 (2,0; 3,4)*	6,7(5,4; 11,7)
<b>РСОПР</b>	8,7 (5,1; 11,4)*	14,4(10,3; 24,7)*
↑ CD8	11,2 (7,0; 13,2)*	21,4 (11,5; 26,3)*
NCD8	5,5 (4,7; 7,2)*	15,6(13,1; 24,6)
↓ CD8	6,0 (5,1; 7,2)	17,4 (11,5; 33,9)
<b>РМЖ</b>	8,9 (6,0; 13,6)	19,3 (11,4; 26,3)
↑ CD8	11,5 (6,8; 15,4)*	17,6(11,4; 23,8)
NCD8	8,2 (6,2; 12,7)	18,2(11,5; 26,6)
↓ CD8	10,1 (6,7; 15,2)	16,6(9; 26,8)

↑ — повышенные значения по сравнению с нормой

↓ — пониженные значения по сравнению с нормой

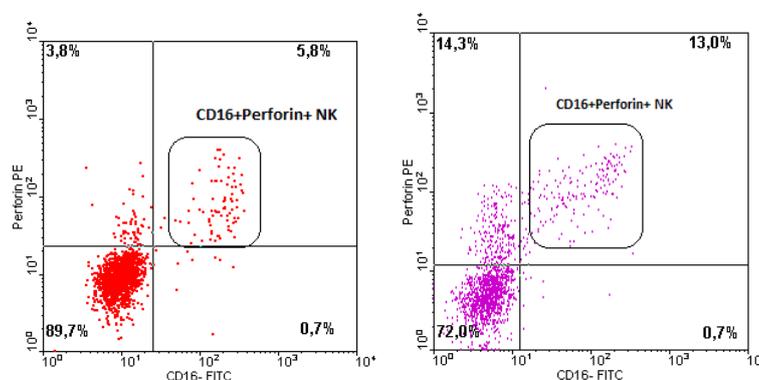
N — нормальные значения

\* - статистически значимая разница при сравнении с донорами (p<0,05)

### Субпопуляционное содержание внутриклеточного перфорина в эффекторных клетках здоровых доноров и онкологических больных

Для оценки функциональной активности эффекторных клеток было проведено исследование внутриклеточного перфорина. У доноров значения  $CD16^+$  и  $CD8^+$  перфорин-позитивных клеток составили 16,8 (13; 21,7)% и 14,8 (9,6; 19,8)% соответственно. Практически все NK-клетки доноров содержат перфорин (93 (87,8; 95,2)%), в то время как  $CD8^+$  Т-клетки (ЦТЛ и НКТ) экспрессировали перфорин в 44,8 (35,4; 56,8)% случаев.

У онкологических больных во всех подгруппах количество  $CD16^+Perforin^+$  клеток практически совпадало со значениями  $CD3^+CD16^+CD56^+$  NK клеток. Данный факт позволяет сказать, что практически все натуральные киллеры содержат перфорин и являются эффекторными (рисунок 7).



**Рисунок 7** —Коэкспрессия CD16 и перфорина у донора (слева) и больного раком слизистой оболочки полости рта (справа).

У онкологических больных зафиксирована нехарактерная для доноров популяция  $CD16^+Perforin^-$ , но она не превышала 5-10%, что отмечалось и зарубежными авторами (Mamessier E., 2011; Konjevic G., 2012). Значения  $CD16^+Perforin^+$  клеток были примерно равны донорскому уровню, как в общих группах различных нозологий, так и в группах по экспрессии маркера CD8 (см. таблицу 8). Следует заметить, что количество перфорин-позитивных  $CD16^+$  клеток было снижено лишь у больных меланомой при низких значениях CD8-положительных клеток, так как это единственная подгруппа, где наблюдалось снижение количества NK-лимфоцитов. Вышеприведенные данные позволяют сделать вывод, что содержание перфорин-позитивных NK-лимфоцитов практически не меняется у онкологических больных.

**Таблица 8** — Экспрессия перфорины в CD16<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетках у доноров и онкологических больных.

	CD16 <sup>+</sup> P <sup>+</sup> (Ме и квартили)	actCD16 <sup>+</sup> клетки (Ме и квартили)	CD8 <sup>+</sup> P <sup>+</sup> (Ме и квартили)	ActCD8 <sup>+</sup> клетки (Ме и квартили)
<b>доноры</b>	16,8 (13; 21,7)	93 (87,8; 95,2)	14,8 (9,6; 19,8)	44,8 (35,4; 56,8)
<b>РЯ</b>	16,1 (10,9; 23,6)	86,1 (67,3; 93,9)	12,8 (10; 18,4)	49,5 (33,1; 62,3)*
↑ CD8	19,9 (14,8; 30,1)*	90,9 (80,8; 94,8)	17,6 (11,3; 24,7)*	52,9 (32,0; 68,5)*
NCD8	16,9 (12; 24,3)	88,6 (76,8; 94,9)*	15,5 (12,5; 18,7)	57,2 (49,5; 65,2)*
↓ CD8	16,3 (11,5; 23,7)	83,6 (75,7; 96,6)*	9 (5,5; 13,1)*	40,7 (30,1; 54,8)
<b>Меланома</b>	16,2 (11,7; 20,4)	89,5 (79,1; 94,1)*	12,8 (9,4; 19,9)	46,9 (33,5; 58,7)
↑ CD8	18,4 (13,9; 22,6)*	91,2 (80,5; 94,3)	21,8 (15,2; 25,1)*	56,5 (40,2; 61,7)
NCD8	16,7 (11,3; 20,4)	88,5 (75; 93,2)*	11,7 (7,3; 14)*	43,6 (27,9; 53,2)
↓ CD8	9,2 (4,2; 17)*	85,8 (75; 87,5)*	4,7 (3,8; 10)*	30 (22,5; 45,4)
<b>РСОПР</b>	18,3 (12,9; 23,5)*	88 (77,5; 93,5)*	17,7 (13,1; 23,4)*	53,4 (42,7; 60,6)*
↑ CD8	24,6 (18,8; 30,2)*	91,4 (87,2; 95,7)*	21,1 (17,9; 26,3)*	59,7 (49,7; 67,8)*
NCD8	17,6 (14,4; 32,8)	96,2 (79,1; 96,8)	11,8 (9,5; 15,5)	55,6 (50,2; 60,5)
↓ CD8	33,8 (18,3; 44,7)	96,2 (79,1; 97,4)	9,5 (9,5; 17)*	59 (55,6; 60,5)*
<b>РМЖ</b>	18,3 (14,2; 24,6)	87,6 (75,4; 92,2)	17,7 (13,6; 22)	53 (44,8; 60,4)*
↑ CD8	18,7 (15,1; 26,4)*	88,8 (79,7; 93,3)*	20,2 (17,4; 22,8)*	54,8 (44,8; 60,4)*
NCD8	16,4 (12,8; 23,2)	91,9 (82,7; 96,1)	14,8 (12,2; 18)	51,1 (45,6; 64,6)*
↓ CD8	15,7 (12,2; 16)	96,5 (93,6; 97)*	10,5 (7,9; 13,2)*	50,8 (42,4; 62,1)*

↑ — повышенные значения по сравнению с нормой

↓ — пониженные значения по сравнению с нормой

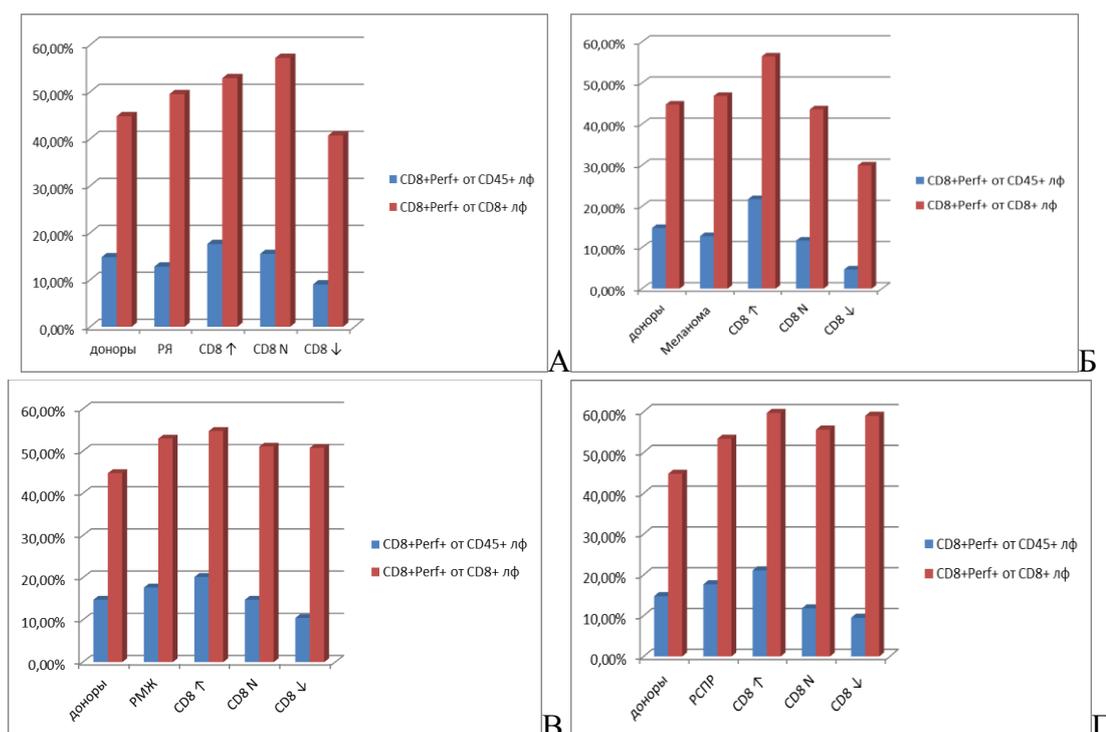
N — нормальные значения

\* - статистически достоверная разница с донорами (p< 0,05)

У больных I-Стадии РМЖ популяция перфорин-позитивных CD16<sup>+</sup> клеток в нашем исследовании составила 24,0 (17,1; 29,0)%, при донорских показателях 16,4 (13,0; 21,7)% и близких к ним 16,2 (11,9; 21,6)% III стадии РМЖ. Такая зависимость описана и в мировой литературе (Verma С., 2015). Однако доля перфорин-позитивных CD16<sup>+</sup> клеток была снижена (86,9 (70,6; 92,9)% у больных I-II стадий, 89,6 (79,2; 94,2)% у пациентов III стадии и 93,1 (87,9; 95,2)% у доноров (p=0,009). Этот же факт наблюдался и у больных РСОПР: на первой-второй стадиях опухолевого процесса оказалось выше количество перфорин-позитивных CD16<sup>+</sup> лимфоцитов (22,9 (17,3; 25,6)%), при том, что на III-IV

стадии этот показатель соответствовал диапазону нормальных значений (III-IV: 15,4 (12,3; 18,3)%; доноры: 16,4 (13,0; 21,7)%). Однако, при этом доля перфоринсодержащих CD16+ лимфоцитов на первой-второй стадиях была статистически значимо ниже, чем донорские показатели (87,6(79,1; 91,6)% и 93,1(87,9; 95,2)%,  $p = 0,001$ ). Таким образом, можно сделать вывод о ведущей роли НК-лимфоцитов в генерации иммунного ответа на первых стадиях развития опухолевого заболевания. При этом включаются иммуносупрессорные механизмы, частично подавляющие активность натуральных киллеров, о чем свидетельствует наличие префорин-отрицательной популяции НК-клеток и увеличение ее по сравнению с донорской группой.

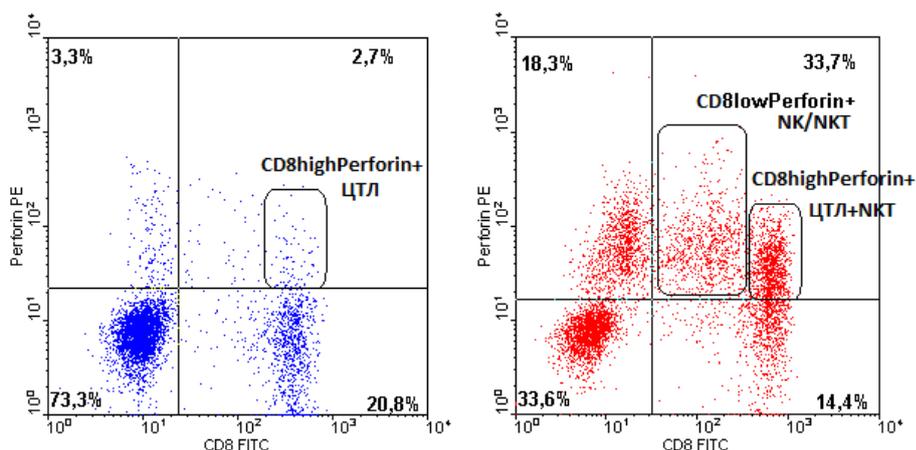
Существенные различия с этими данными были выявлены при анализе перфорин-положительной популяции CD8<sup>+</sup> лимфоцитов. В общих группах количество двойных позитивных CD8<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> клеток было сопоставимо с донорскими показателями, что отмечают и некоторые исследователи (Laytragoon-Lewin N., 2014). При подробном анализе в подгруппах оказалось, что по мере снижения количества CD8<sup>+</sup> лимфоцитов уменьшалось и количество перфорин-содержащих CD8<sup>+</sup> клеток (данные представлены в таблице 8), при этом в группе с высоким количеством CD8-положительных клеток была повышена доля перфоринсодержащих лимфоцитов среди всех CD8 клеток (рак яичников – 52,9 (32,0; 68,5)%, меланома – 56,5 (40,2; 61,7)%, РСОПР – 59,7 (49,7; 67,8)%, РМЖ – 54,8 (44,8; 60,4)%). Увеличение цитотоксического потенциала Т-лимфоцитов в злокачественных опухолях было описано и зарубежными авторами (Costa N., 2011). При снижении уровня CD8<sup>+</sup> клеток были обнаружены различия в количестве перфоринпозитивных лимфоцитов у больных различных нозологических форм. Так, у больных раком слизистой оболочки полости рта и раком молочной железы доля перфоринсодержащих CD8 клеток не снижалась в группах по мере снижения экспрессии CD8 (данные в таблице 8 и на рисунке 8), в то время как у больных раком яичников и меланомой она достигала нормальных и более низких значений (рак яичников – 40,7 (30,1; 54,8)%, меланома – 30 (22,5; 45,4)%). Это говорит о более эффективном подавлении опухолью специфического иммунного ответа у больных РЯ и меланомой. Статистически значимых различий в экспрессии перфорина CD8-положительными клетками на разных стадиях опухолевого заболевания не было выявлено (РМЖ I-II - 16,0 (13,2; 21,8), III-IV - 14,7 (9,6; 19,8),  $p = 0,32$ ; РСОПР I-II - 16,0 (9,5; 18,7) III-IV - 18,2 (12,0; 26,9),  $p = 0,16$ ).



**Рисунок 8** — Изменение количества перфорин-содержащих CD8<sup>+</sup> эффекторных лимфоцитов и процентного количества активных цитотоксических CD8<sup>+</sup> лимфоцитов по группам с различным содержанием CD8.

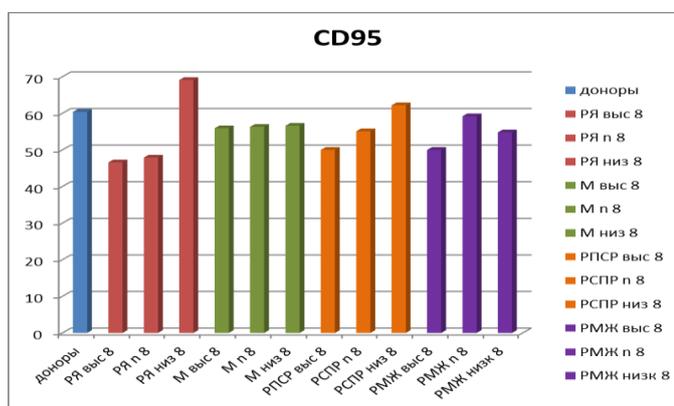
А — рак яичников; Б — меланнома; В — рак молочной железы; Г — рак слизистой оболочки полости рта.

Ярким отличием коэкспрессии перфорина и молекулы CD8 на ЭК здоровых лиц и онкологических больных является отсутствие у доноров популяции CD8<sup>Low</sup>Perforin<sup>+</sup>. Данная популяция присутствует у всех онкологических больных (7,7 (5,4; 12)%), что происходит за счет увеличения количества CD8<sup>+</sup> НК и NKT клеток, экспрессирующих CD8 в низкой и средней степени. За счет повышения количества НК-лимфоцитов увеличено и содержание CD8<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup>-клеток. Также, характерной особенностью является и увеличение количества CD8<sup>high</sup> цитотоксических клеток, содержащих перфорин, при высоком содержании CD8<sup>+</sup> клеток. Это отражает переключение ЦТЛ онкологических больных с рецепторно-независимого механизма цитотоксичности Fas-Fas-L на перфорин-зависимый. Исследования показывают, что при меланоме и других видах онкологических заболеваний, CD8<sup>+</sup> лимфоциты преимущественно используют перфорин-зависимый механизм цитотоксичности (Rivoltini, L, 1998).



**Рисунок 9** — Коэкспрессия CD8 и перфорина у донора (слева) и больного раком слизистой оболочки полости рта (справа). Выделена субпопуляция  $CD8^{low}Perforin^{+}$ , отсутствующая у здоровых доноров.

При анализе общей экспрессии молекулы CD95 на всех лимфоцитах, оказалось, что при сравнении доноров и групп больных по различным нозологиям, CD95 всегда снижен по сравнению с донорами. Показана обратная связь экспрессии маркеров CD95 и CD8 (рис 10, таблица 9) у онкологических больных. Количество лимфоцитов, коэкспрессирующих CD95 и CD8 в нашем исследовании составляло 9,5 (6,5; 14,6)%, что совпадает с литературными данными (Laytragoon-Lewin N., 2014). При этом коэкспрессия этих маркеров также снижалась при уменьшении общего количества CD8, это позволяет сделать вывод, что рост экспрессии CD95 происходит за счет клеток, не являющихся эффекторными.



**Рисунок 10** — Изменение уровня экспрессии CD95 в группах с различным содержанием CD8.

**Таблица 9** — Уровень экспрессии CD95 и коэкспрессии CD95 и CD8 у доноров и онкологических больных.

	CD95 <sup>+</sup> (Мед и квартили)	CD95 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (Мед и квартили)
доноры	60,4 (52,7; 69,1)	9,5 (6,5; 14,6)
РЯ общ	48,2 (40,1; 55,7)*	—
↑ CD8	46,6 (36,6; 56,8)*	—
NCD8	47,9 (44; 56,8)*	—
↓ CD8	69,1 (55,2; 76,6)*	—
Меланома	57,8 (47,6; 65,7)*	7,4 (3,6; 13,7)
↑ CD8	55,9 (47,9; 64,4)*	8,4 (5,1; 19,9)*
NCD8	56,3 (47,6; 64,8)	8,2 (4,7; 13)
↓ CD8	56,6 (45,1; 76,7)	5,2 (3,1; 9,3)*
PCOPP	48,8 (41,7; 57,4)*	14,9 (8,4; 24,5)*
↑ CD8	50 (34,3; 56,6)*	9,2 (4; 20)
NCD8	55,1 (51,3; 67)	7,4 (3,7; 19,2)
↓ CD8	62,2 (51,3; 80,4)	3,7 (3,6; 6,5)*
PMЖ	55,5 (45,9; 62,7)*	13,8 (8,3; 24,4)*
↑ CD8	50 (45,2; 62,4)*	13,5 (8,3; 29,1)*
NCD8	59,2 (48,8; 66)	12,6 (9,5; 16,5)
↓ CD8	54,8 (48,8; 56,7)	10,5 (7,1; 14,1)*

↑ — повышенные значения по сравнению с нормой

↓ — пониженные значения по сравнению с нормой

N — нормальные значения

## ВЫВОДЫ

1. Фенотипические, функциональные характеристики клеток адаптивного и врожденного иммунитета, их субпопуляционная структура, сильно варьируют у онкологических больных.

2. Процентное содержание CD8-положительных клеток у здоровых лиц составляет 35,5 (30,6; 41,1)% CD45<sup>+</sup> клеток, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ЦТЛ – 27 (22,3; 30,7)%. У онкологических больных выявлен широкий диапазон значений CD8<sup>+</sup> лимфоцитов от 7% до 60%, при этом для большинства (>45%) пациентов каждой нозологической формы характерны повышенные уровни маркера ( $p = 0,00002$ ), 20-40% пациентов – нормальные значения ( $p = 0,4$ ). Установлено, что высокая плотность антигена CD8 характерна для CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ЦТЛ, низкая плотность CD8 – для NK-клеток. CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NKT-лимфоциты экспрессируют CD8 как с высокой, так и низкой плотностью.

3. NK-лимфоциты экспрессируют антиген CD16 со средней и низкой плотностью и характеризуются фенотипом CD3<sup>-</sup>CD16<sup>low</sup>. NKT-лимфоциты экспрессируют CD16 с низкой плотностью и представлены фенотипом CD3<sup>+</sup>CD16<sup>low</sup>. Процентное содержание NK-клеток у здоровых лиц составило 15,9 (11,5; 19)%, NKT-клеток — 9,4 (5,3; 14,2)%. У больных раком молочной железы выявлено высокое процентное содержание CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NKT-лимфоцитов (14,8 (8,9; 19,2)%,  $p = 0,01$ ). Для больных раком яичников характерно повышение CD3<sup>-</sup>CD16<sup>low</sup> NK-клеток (22,6 (14,5; 31,3)%,  $p = 0,0001$ ).

4. У здоровых лиц количество двойных позитивных CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK и/или NKT-клеток составило 9,1 (5,6; 13,7)%, при этом содержание CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup> NKT-клеток не превышало 5% от CD3<sup>+</sup> лимфоцитов. У онкологических больных всех нозологических форм с высокими уровнями маркера CD8 повышено число CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,008$ ) за счет увеличения содержания NK- и/или CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup> NKT-клеток (до 20% CD3<sup>+</sup> лимфоцитов).

5. Уровень перфорин-содержащих CD8<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> лимфоцитов у здоровых лиц составил 14,8 (9,6; 19,8)% и 16,8 (13; 21,7)% соответственно. У онкологических больных выявлено наличие перфорин-содержащей популяции CD8<sup>low</sup> лимфоцитов (7,7 (5,4; 12)%), отсутствующей у здоровых лиц.

6. Для онкологических больных с высоким уровнем CD8-клеток характерно повышение медианы значений ЦТЛ и NKT-лимфоцитов по сравнению с показателями здоровых лиц (ЦТЛ CD3<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>: РЯ – 31%, Меланома – 32,8%, РСОПР - 29,8%, РМЖ –

29,9%,  $p = 0,01$ ; NK-клетки CD3-CD16+CD56+: РЯ – 21,6%, Меланома – 14,6%, РСОПР – 21,4%, РМЖ – 17,6%,  $p = 0,55$ ; NKT-лимфоциты CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>: РЯ – 12,8%, Меланома – 12,9%, РСОПР – 14,1%, РМЖ – 15,9%,  $p = 0,01$ ).

7. Для онкологических больных с нормальным уровнем CD8<sup>+</sup> лимфоцитов установлено снижение медианы количества ЦТЛ: РЯ – 19,2%, меланома – 20,8%, РСОПР – 18,6%, РМЖ – 20,2% ( $p = 0,0001$ ). Количество NK и NKT-лимфоцитов соответствует показателям здоровых лиц ( $p = 0,4$  и  $0,1$  соответственно).

8. Для онкологических больных с пониженным уровнем CD8<sup>+</sup> клеток показано резкое уменьшение медианы количества ЦТЛ (РЯ – 14,9%, меланома – 15,9%, РСОПР – 12,9%, РМЖ – 9,5%) ( $p = 0,0003$ ). Количество NK-клеток в данной группе соответствует показателям здоровых доноров ( $p = 0,5$ ), число NKT-лимфоцитов снижено (РЯ – 5,5%, меланома – 5,3%, РСОПР – 2,2%, РМЖ – 6,5%,  $p = 0,02$ ).

9. Для онкологических больных с высоким уровнем CD8-клеток выявлены статистически достоверные повышенные значения CD8<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> клеток (РЯ – 17,6%, меланома – 21,8%, РСОПР – 21,1%, РМЖ – 20,2%,  $p = 0,000$ ). При нормальном содержании CD8<sup>+</sup>лимфоцитов количество перфорин-содержащих CD8<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> клеток снижено или соответствует показателям здоровых лиц (РЯ – 15,5%, меланома – 11,7%, РСОПР – 11,8%, РМЖ – 14,8%,  $p = 0,2$ ). У больных с низким уровнем CD8<sup>+</sup> клеток количество CD8<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> лимфоцитов резко снижено по сравнению с донорами (РЯ – 9%, меланома – 4,7%, РСОПР – 9,5%, РМЖ – 10,5%,  $p = 0,008$ ).

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛАХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ  
ПЕРЕЧНЕМ ВАК ПРИ МИНОБРНАУКИ РОССИИ**

1. Кадагидзе, З.Г. Влияние ипилимумаба на субпопуляционную структуру лимфоцитов больных диссеминированной меланомой / З.Г. Кадагидзе, Т.Н. Заботина, О.В. Короткова, Д.В. Табаков, А.И. Черткова, А.А. Борунова, И.О. Панчук, И.В. Самойленко, Г.Ю. Харкевич, Л.В. Демидов // Практическая онкология. — 2017. — Т.18, №3. — С. 285-297.
2. Заботина, Т.Н. Иммунофенотип лимфоцитов периферической крови больных первично-операбельным раком молочной железы /Т.Н. Заботина, О.В. Короткова, Ш.Г. Хакимова, А.А. Борунова, Д.В. Табаков, И.К. Воротников, З.Г. Кадагидзе // Российский биотерапевтический журнал. — 2016. — Т. 15, № 4. — С. 37-39.
3. Табаков, Д.В. Гетерогенность популяций НК и НКТ-лимфоцитов у здоровых доноров / Д.В. Табаков, Т.Н. Заботина, А.А. Борунова, И.О. Панчук, О.В. Короткова, З.Г. Кадагидзе // Медицинская иммунология. — 2017. — Т. 19, № 4. — С. 401-408.