

Божченко Я.А., Вишневская Я.В., Покатаев И.А.

КЛИНИКО-ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ CD8+ И CD4+ Т-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С МЕЛАНОМОЙ КОЖИ

ФГБУ Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина, г. Москва;

ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. Изучение соотношения субпопуляций инфильтрирующих опухоль лимфоцитов отражает состояние локального противоопухолевого иммунитета и имеет важное прогностическое значение. Проведено исследование субпопуляций CD8+ и CD4+ Т-лимфоцитов, инфильтрирующих первичную меланому кожи, на 90 случаях заболевания (n=90). Использован метод иммуногистохимического окрашивания с антителами к CD8 и CD4. В инфильтрате опухоли преобладающим типом лимфоцитов были CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты — 80,1 клеток в поле зрения, CD4+-лимфоциты составили в среднем 52,5 клетки в поле зрения. Соотношение CD8/CD4 Т-лимфоцитов в 78% случаев было >1. Получена статистически значимая корреляция высокого индекса соотношения CD8/CD4 Т-лимфоцитов с низким уровнем прогрессирования заболевания и более высокой 5-летней общей и 5-летней безрецидивной выживаемостью.

Ключевые слова: меланомы кожи, опухоль инфильтрирующие лимфоциты, микроокружение опухоли, CD8+, CD4+, Т-лимфоциты

Введение

Исследования последних лет показали, что рост большинства злокачественных опухолей сопровождается значительными нарушениями различных звеньев иммунного ответа организма. Проведенные исследования у онкологических больных указывают на снижение количества естественных киллеров, Т-хелперов, функциональной активности Т-лимфоцитов, увеличение количества Т-супрессоров и их функциональной активности [1].

Увеличение числа цитотоксических CD8 Т-лимфоцитов в опухолевой ткани при раке яичников, тела матки, толстой кишки, поджелудочной железы связаны с лучшей выживаемостью больных [2, 3, 4].

Значение CD4 Т-лимфоцитов в противоопухолевом ответе весьма противоречиво. С одной стороны, CD4 Т-лимфоциты за счет способности связываться с антигенпрезентирующей клеткой и последующей секреции IL-2 активируют CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты. С другой стороны, часть из них, называемая, Т регуляторными клетками, способна подавлять функции CD8 цитотоксических клеток, способствуя подавлению противоопухолевого иммунитета [5, 6].

Изменения соотношения этих двух основных субпопуляций Т-лимфоцитов в микроокружении опухоли, изучались при раке молочной железы, шейки матки, желудка, гепатоцеллюлярном, колоректальном раке, опухолях билиарного тракта и имели неоднозначное влияние на течение и исход заболевания [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13].

Данные ряда исследований говорят о том, что у пациентов с меланомой состав инфильтрирующих опухоль лимфоцитов варьирует от 90% содержания CD4 Т-лимфоцитов до 90% содержания CD8 Т-лимфоцитов [14, 15, 16].

В исследовании инфильтрата опухоли увеальной меланомы данные показали преобладание CD8 Т-лимфоцитов над CD4 Т-лимфоцитами более чем в 5,8 раз [14].

Исследование субпопуляций лимфоцитов, входящих в состав лимфоцитарного инфильтрата первичной меланомы кожи (МК) также показало преимущественное содержание в нем CD3 и CD8 Т-лимфоцитов с практически полным отсутствием CD4 положительно окрашенных клеток [16].

По данным другого исследования соотношение CD4 и CD8 Т-лимфоцитов в инфильтрате первичной меланомы кожи (МК) характеризуется равными долями обоих субпопуляций с неболь-

шим процентом случаев некоторого преобладания числа CD4 Т-лимфоцитов, которое коррелировало с более поздней стадией болезни [15].

Цель исследования

Целью настоящей работы явилось изучение корреляции индекса соотношения CD8/CD4 Т-лимфоцитов инфильтрирующих первичную МК с основными клинико-морфологическими факторами прогноза течения и исхода заболевания.

Материалы и методы

В исследование было включено 90 больных с МК, оперированных в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» за период 2003–2007 гг. Больные были оперированы в объеме удаления только первичной опухоли или в объеме удаления первичной опухоли с регионарной лимфаденэктомией. В послеоперационном периоде 46 больных получали либо только иммунотерапию (роферон, интрон, реферон, интерферон), либо только полихимиотерапию (докарбазин, ломустин, цисплатин, араноза), либо комбинированное лечение. Противоопухолевая медикаментозная терапия не проводилась у 44 больных.

Диагноз МК был подтвержден данными исследования гистологических препаратов, по которым также оценивалась общая лимфоцитарная инфильтрация первичной опухоли (Рис. 1).

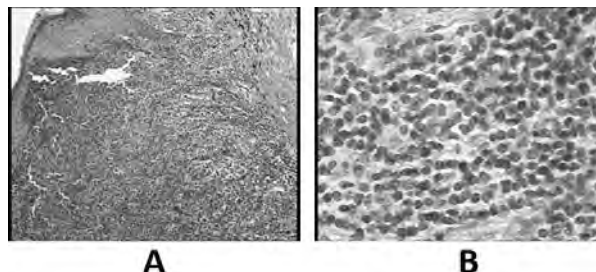


Рисунок 1. А. Меланомы кожи с перитуморальной лимфоцитарной инфильтрацией: слева опухолевые клетки, справа лимфоцитарная инфильтрация (окраска г-э, х5). Б. Участок лимфоцитарной инфильтрации меланомы кожи (тот же препарат, окраска г-э, х40)

Для иммуногистохимического исследования был использован архивный материал отдела патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН — парафиновые блоки операционного материала первичной МК.

Имуногистохимическое исследование выполнялось на серийных депарафинизированных срезах опухолевой ткани с помощью биотин-стрептавидинового иммунопероксидазного метода с моноклональными антителами к маркерам CD4 в разведении 2:70, согласно рекомендации фирмы-изготовителя (mouse anti-human CD4 клон 4B12, Dako, Дания) и CD8 в разведении 1:100, согласно рекомендации фирмы-изготовителя (mouse anti-human CD8, клон C8/144B, Dako, Дания).

Срезы толщиной 3–5 мкм депарафинизировали и регидратировали по стандартной схеме. Для демаскировки антигенов проводили предварительную обработку депарафинизированных срезов в водяной бане при температуре 95 °С в течение 40 мин с использованием цитратного буфера pH 6,0 (Dako). Срезы инкубировали с первичными антителами в течение 1 часа при комнатной температуре. В качестве вторичных антител и пероксидазного комплекса использовали стандартный набор реагентов LSAB+ Kit или си-

стему детекции Super Sensitive™ Polymer-HRP («Bi-oGenex»). Для визуализации реакции применялся раствор диаминобензида на DAB+ (Dako). Ядра клеток докрасивали гематоксилином Майера (Рис. 2).

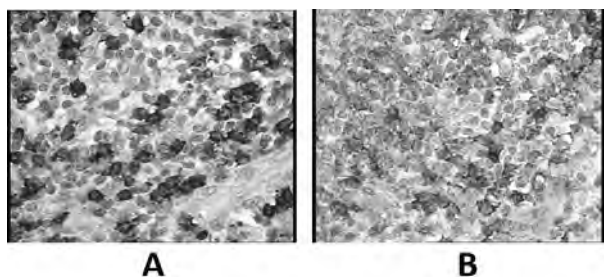


Рисунок 2. Иммуногистохимическое исследование лимфоцитарной инфильтрации при меланоме кожи. А. С антителами к CD8 Т-лимфоцитам (x40), Б. С антителами к CD4 Т-лимфоцитам (x40).

Также для визуализации реакции применяли методику двойного окрашивания на одном срезе (с использованием иммуностейнера). При окрашивании этим методом CD8+ Т-лимфоциты окрашивались хромогеном АЕС в малиновый цвет, а CD4+ положительные Т-лимфоциты окрашивались ДАБом в коричневый цвет (Рис. 3). При оценке данных исследования обе методики визуализации дали одинаковые результаты.

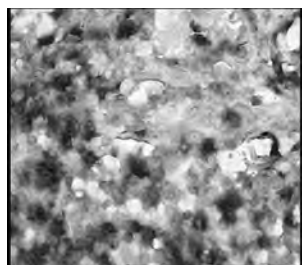


Рисунок 3. Метод двойного окрашивания к антителам CD8 и CD4. CD8+ Т-лимфоциты окрашены в малиновый цвет, CD4+ Т-лимфоциты окрашены в коричневый цвет, (x40).

Оценку перитуморальной лимфоцитарной инфильтрации опухоли проводили гистологически, путем подсчета положительно окрашенных лимфоцитов не менее чем в 10 полях зрения на увеличении x40, в областях наиболее интенсивного окрашивания [17]. Вычисляли среднее количество положительно окрашенных клеток на 1 поле зрения и вычисляли соотношение содержания CD8/CD4 положительно окрашенных клеток путем деления их средних значений. Оценка данных проводилась двумя независимыми исследователями.

Статистический анализ

Статистический анализ подразумевал описательную и сравнительную статистику количественных и качественных переменных. Перед проведением анализа выполнены тесты на нормальность для каждой из количественных выборок согласно критерию Шапиро-Уилка. В связи с тем, что не все выборки удовлетворяли критерию нормального распределения, сравнительный анализ проводился с использованием непараметрических критериев. В частности, сравнение нескольких независимых переменных подразумевало использование критерия Крускала-Уоллиса. Использование непараметрических критериев подразумевало ранжирование переменных. Сравнительный анализ качественных переменных проводился с использованием критерия χ -квадрат. Описательная статистика количественных переменных подразумевала расчет медианы, 25% квантили (нижней квантили) и 75% квантили (верхней квантили), а также минимальных и максимальных значений. Использование данных описательных характеристик вместо более распространенных средних значений со стандартным отклонением обусловлено небольшим числом наблюдений и ненормальным характером распределения в анализируемых выборках. Сравнительный анализ полученных данных по време-

ни без прогрессирования и продолжительности жизни проводился с использованием логрангового критерия. Кривые продолжительности жизни и времени без прогрессирования создавались по методу Каплана-Майера. Различия между группами по каждому признаку считались статистически достоверными при значении $p < 0,05$. Статистический анализ данных проводился с использованием программ Microsoft Excel, Statistica software release 8.0 (StatSoft Inc).

Результаты исследования

В исследование вошло 90 больных с МК. Основные клинико-морфологические характеристики представлены в таблице 1.

Таблица 1
Клинико-морфологические характеристики больных МК

| Признак | Количество, n (%) | |
|---|---|------------|
| | Минимум-максимум | |
| Возраст | Минимум-максимум | 17-81 |
| | Медиана | 51 |
| Пол, n (%) | Мужчины | 41(45,6%) |
| | Женщины | 49(54,4%) |
| Стадия | I | 15(16,7%) |
| | II | 56(62,2%) |
| | III | 18(20%) |
| | IV | 1(1,1%) |
| Распространенность процесса на момент удаления, n (%) | Только первичная опухоль | 70 (77,8%) |
| | Первичная опухоль с наличием метастазов | 20 (22,2%) |
| Толщина опухоли по Бреслоу, n (%) | ≤ 1мм | 6 (6,7%) |
| | 1,1-2мм | 15 (16,7%) |
| | 2,1-4мм | 22 (24,4%) |
| | ≥ 4,1мм | 47 (52,2%) |
| Наличие изъязвления, n (%) | Есть | 62 (68,9%) |
| | Нет | 28 (31,1%) |
| Количество митозов в 1 мм ² , n (%) | 0 | 14 (15,5%) |
| | 1-3 | 25 (27,8%) |
| | 4-6 | 9 (10%) |
| | 7-9 | 17 (18,9%) |
| | ≥ 10 | 25 (27,8%) |

По данным таблицы 1 следует, что средний возраст больных составил 51 год. Количество больных МК женского пола незначительно преобладало — 49 (54,4%) случаев, над пациентами мужского пола — 41(45,6%) случаев. Наиболее часто первичная МК диагностировалась во II стадии — 56 (62,2%) случаев, наименее часто в IV стадии 1(1,1%) случай. На момент удаления первичной опухоли в 70 (78,8%) случаях метастазы опухоли были исключены, а в 20 (22,2%) случаях они были подтверждены клинически и морфологическими методами исследования.

Толщина опухоли по Бреслоу до 1 мм отмечалась в 6 (6,7%) случаях, от 1,1 до 2 мм — в 15 (16,7%) случаях, от 2,1 до 4 мм — в 22 (24,4%) случаях, более 4,1 мм — в 47 (52,2%) случаях. Изъязвление первичной МК отмечалось 62 (68,9%) случаях, что практически в 2 раза превышало количество случаев первичной МК без изъязвления — 28 (31,1%) случаев. Количество митозов в опухоли на 1 мм² составило в большинстве наблюдений либо 1–3 митоза на 1 мм², либо более 10 митозов на 1 мм² — по 25 (27,8%) случаев.

Данные исследования показали, что медиана абсолютных значений CD8+ положительно окрашенных Т-лимфоцитов в ткани опухоли составляла 80,1 клеток в поле зрения (от 4,1 до 243,2). В 78% случаев количество CD8+ превосходило количество CD4+ положительно окрашенных Т-лимфоцитов, медиана значений которых составила 52,5 клеток в поле зрения (от 3,9 до 160,6) (Рис. 4).

В зависимости от значения индекса соотношения CD8/CD4 положительно окрашенных клеток все больные были разделены на 4 группы. Первая группа больных МК с соотношением CD8/CD4 < 1 составила 13 (14,4%) случаев. В этой группе наблюдений количество CD4+ положительно окрашенных клеток преобладало

над CD8+ положительно окрашенными клетками. Вторая группа больных с соотношением CD8/CD4, равным 1–1,5, составила 39 (43,3%) случаев. Третья группа больных с соотношением CD8/CD4, равным 1,6–2, составила 21 (23,3%) случаев. Четвертая группа больных с соотношением CD8/CD4 >2,1, то есть количество CD8+ положительно окрашенных клеток было более чем в 2 раза больше, чем количества CD4+ положительно окрашенных клеток, составила 17 (18,9%) случаев. Сравнительная характеристика больных полученных четырех групп представлена в таблице 2.

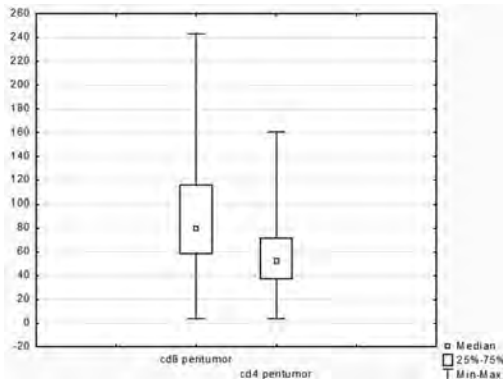


Рисунок 4. Медиана, нижняя и верхняя квартили, а также минимальные и максимальные значения CD8+ и CD4+ положительно окрашенных Т-лимфоцитов в ткани опухоли (ось ординат — количество положительно окрашенных CD8 и CD4 клеток).

Из таблицы 2 следует, что 4 группы не имели статистически значимых различий по возрасту, полу, стадии, толщине опухоли по Бреслоу, наличию изъязвления опухоли, количеству митозов ($p>0,05$). Получены статистически значимые различия между группами по течению заболевания ($p=0,002$). Если в третьей и четвертой группах преобладали локальные процессы без прогрессирования заболевания, то в первой и второй группах более половины больных имели метастазы, выявленные вместе с первичной опухолью или появившиеся через некоторое время после ее удаления.

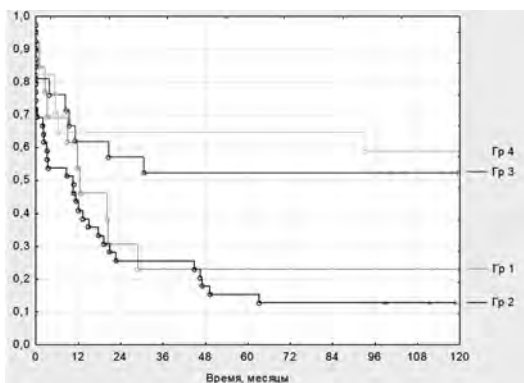


Рисунок 5. Кривые Каплана-Майера для времени без прогрессирования в четырех группах (ось абсцисс — время продолжительности жизни в месяцах, ось ординат — количество больных).

Медиана длительности наблюдения за больными составила 111 месяцев. За этот период времени прогрессирование опухолевого процесса отмечено в 61 (67,8%) случае, летальный исход зафиксирован в 37 (41,1%) случаях. Местный рецидив меланомы выявлен в 25 случаях (27,8%), метастазы в регионарных лимфоузлах — в 49 (54,4%) случаях, отдаленные метастазы — в 34 (37,8%) случаях.

Из таблицы 3 следует, что четыре группы значительно различались по исходам заболевания. Частота локальных и регионарных рецидивов заболевания в группах 1 и 2 была статистически значимо выше, чем в группах 3 и 4 ($p<0,05$). Частота отдаленных метастазов в четвертой группы была существенно ниже, чем в остальных группах (11,8%), однако различия немного не достигли статистической значимости ($p=0,08$).

Анализ 5-летней выживаемости без прогрессирования и 5-лет-

ней общей выживаемости больных меланомой кожи представлен на рис.5, 6.

5-летняя выживаемость без прогрессирования и 5-летняя общая выживаемость были максимальными в четвертой группе (65% и 82% соответственно). Минимальные значения этих показателей зарегистрированы во второй группе (15% и 49% соответственно). Различия и по времени без прогрессирования, и по продолжительности жизни оказались статистически значимыми ($p<0,05$).

В каждой группе наблюдения был проведен сравнительный анализ между больными, получавшими и не получавшими противоопухолевую медикаментозную терапию в послеоперационном периоде.

Таблица 2
Сравнительная клиничко-морфологическая характеристика больных четырех групп наблюдения, разделенных по индексу соотношения CD8/CD4 Т-лимфоцитов

| Признак | | Группа | | | | p |
|--|---------------------------------------|------------|------------|------------|------------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| Пол, n (%) | Мужчины | 8 (61,5%) | 17 (43,6%) | 10 (47,6%) | 6 (35,3%) | 0,54 |
| | Женщины | 5 (38,5%) | 22 (56,4%) | 11 (52,4%) | 11 (64,7%) | |
| Возраст | Минимум-максимум | 17-58 | 25-81 | 30-76 | 36-78 | 0,18 |
| | Медиана | 46 | 50 | 57 | 57 | |
| Стадия, n (%) | I | 1 (7,7%) | 4 (10,3%) | 5 (23,8%) | 5 (29,4%) | 0,70 |
| | II | 10 (76,2%) | 25 (64,1%) | 12 (57,1%) | 9 (52,9%) | |
| | III | 2 (15,4%) | 9 (23,1%) | 4 (19,1%) | 3 (17,7%) | |
| | IV | 0 | 1 (2,6%) | 0 | 0 | |
| 5-летняя выживаемость n (%) | Без прогрессирования | 3 (23,1%) | 5 (12,8%) | 11 (52,4%) | 11 (64,7%) | 0,002 |
| | Прогрессирование (рецидив, метастазы) | 10 (76,9%) | 34 (87,2%) | 10 (47,6%) | 6 (35,3%) | |
| Толщина опухоли по Бреслоу, n (%) | < 1мм | 0 | 2 (5,1%) | 2 (9,5%) | 2 (11,8%) | 0,83 |
| | 1,1-2мм | 2 (15,4%) | 5 (12,8%) | 5 (23,8%) | 3 (17,7%) | |
| | 2,1-4мм | 4 (30,8%) | 11 (28,2%) | 5 (23,8%) | 2 (11,8%) | |
| | >4,1мм | 7 (53,9%) | 21 (53,9%) | 9 (42,9%) | 10 (58,8%) | |
| Наличие изъязвления, n (%) | Есть | 9 (69,2%) | 29 (74,4%) | 14 (66,7%) | 10 (58,8%) | 0,71 |
| | Нет | 4 (30,8%) | 10 (25,6%) | 7 (33,3%) | 7 (41,2%) | |
| Количество митозов, в 1мм ² , n (%) | 0 | 1 (7,8%) | 3 (7,8%) | 3 (14%) | 7 (41%) | 0,61 |
| | 1-3 | 5 (38%) | 10 (25,6%) | 8 (38%) | 2 (11,8%) | |
| | 4-6 | 1 (7,7%) | 5 (12,8%) | 3 (14,3%) | 0 | |
| | 7-9 | 4 (30,8%) | 9 (23,1%) | 2 (9,5%) | 2 (11,8%) | |
| | Более 10 | 2 (15,4%) | 12 (30,8%) | 5 (23,8%) | 6 (35,3%) | |

Из таблицы 4 следует, что больных, не получавших противоопухолевую медикаментозную терапию, было меньше всего в первой группе — 4 (9%) случая. В остальных трех группах было примерно равное количество больных, не получавших противоопухолевую медикаментозную терапию. Больных, получавших противоопухолевую медикаментозную терапию, больше всего было во второй группе наблюдения.

Как следует из таблицы 5, больные МК, не получавшие противоопухолевую медикаментозную терапию, имели I стадию заболевания в 14 (31,8%) случаях, II стадию заболевания в 26 (59%) случаях, III стадию заболевания — в 4 (9%) случаях, больные с IV стадией заболевания без медикаментозного лечения отсутствовали. Больные МК, получавшие противоопухолевую медикаментозную терапию в послеоперационном периоде, имели I стадию заболевания в 1 (2,3%) случае, II стадию заболевания — в 30 (65%) случаях, III стадию заболевания — в 14 (28%) случаях, IV стадию заболевания — в 1 (2,3%) случае.

Как следует из таблицы 6, у больных без проводимой медикаментозной терапии сохраняется положительная корреляционная связь высокого индекса соотношения CD8/CD4 Т-лимфоцитов в опухолевой ткани с благоприятным течением заболевания и более высокой 5-летней общей выживаемостью. В то же время, у больных, у которых проводилась противоопухолевая медикаментозная терапия в послеоперационном периоде, с увеличением индекса соотношения CD8/CD4 Т-лимфоцитов в ткани первичной опухоли, увеличивается процент случаев метастазирования в регионарные лимфатические узлы и уменьшаются показатели общей 5-летней выживаемости.

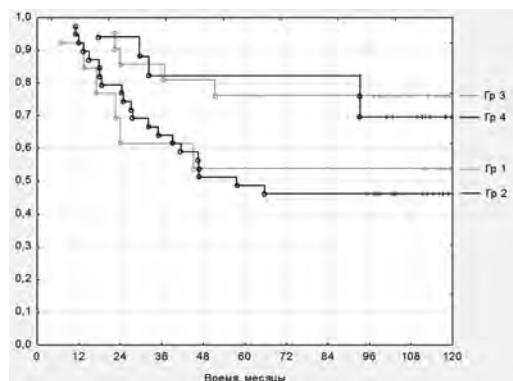


Рисунок 6. Кривые Каплана-Мейера для продолжительности жизни в четырех группах (ось абсцисс — время продолжительности жизни в месяцах, ось ординат — количество больных).

Таблица 3
Сравнительный анализ исходов меланомы кожи в зависимости от индекса соотношения CD8/CD4 Т-лимфоцитов

| Признак | | Группа | | | | p |
|---|-------------------------------|-----------|------------|-----------|-----------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| Локализация прогрессирования, n (%) | Локальный рецидив | 7 (53,9%) | 28 (71,8%) | 8 (38,1%) | 6 (35,3%) | 0,02 |
| | Рецидив в регионарных л/узлах | 5 (38,5%) | 15 (38,5%) | 4 (19,1%) | 1 (5,9%) | 0,049 |
| | Отдаленные метастазы | 5 (38,5%) | 19 (48,7%) | 8 (38,1%) | 2 (11,8%) | 0,08 |
| 5-летняя выживаемость без прогрессирования, % | | 23 | 15 | 52 | 65 | 0,03 |
| 5-летняя общая выживаемость, % | | 54 | 49 | 76 | 82 | 0,06 |

Таблица 4
Распределение больных по виду терапии

| Варианты терапии | Группа | | | | 5-летняя выживаемость |
|--|-----------|------------|------------|-----------|-----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| Хирургическое удаление МК | 4 (9%) | 14 (31,8%) | 13 (29,5%) | 13 (29,%) | 39 (88,6%) |
| Хирургическое удаление МК + иммунотерапия | 2 (18%) | 7 (64%) | 0 | 2 (18%) | 4 (36,3%) |
| Хирургическое удаление МК + полихимиотерапия | 3 (21,4%) | 7 (50%) | 3 (21,4%) | 1 (7,1%) | 5 (35,7%) |
| Хирургическое удаление МК + иммунотерапия + химиотерапия | 4 (19%) | 11 (52%) | 5 (23,8%) | 1 (4,7%) | 6 (28,6%) |

Таблица 5
Соотношение больных, получавших и не получавших медикаментозную терапию со стадией заболевания и индексом соотношения CD8/CD4 Т-лимфоцитов

| Признаки | Варианты терапии | Пациенты, не получавшие медикаментозную терапию (n=44) | | Пациенты, получавшие медикаментозную терапию (n=46) | |
|--------------------|------------------|--|---------|---|---------|
| | | Число | Процент | Число | Процент |
| CD8/CD4 | < 1 | 4 | 9% | 9 | 20% |
| | 1-1,5 | 11 | 25% | 25 | 55,6% |
| | 1,6-2 | 13 | 29,5% | 8 | 17,7% |
| | > 2,1 | 12 | 27,3% | 4 | 8,8% |
| Стадия заболевания | I | 14 | 31,8% | 1 | 2,3% |
| | II | 26 | 59% | 30 | 65% |
| | III | 4 | 9% | 14 | 28% |
| | IV | 0 | 0% | 1 | 2,3% |

Таблица 6
Корреляция индекса соотношения CD8/CD4 Т-лимфоцитов с лечением, прогрессированием заболевания и выживаемостью больных МК

| Признаки | Группа | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | |
|-----------------------------|--------|----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|
| | | Без леч. | С леч. | Без леч. | С леч. | Без леч. | С леч. | Без леч. | С леч. |
| Колл. пациентов n (%) | | 4 (9%) | 9 (20%) | 14 (25%) | 25 (54%) | 13 (30%) | 8 (17,4%) | 13 (30%) | 4 (8,8%) |
| 5-летняя общая выживаемость | | 3 (75%) | 4 (44,4%) | 11 (79%) | 7 (28%) | 13 (100%) | 3 (37,5%) | 12 (92%) | 1 (25%) |
| Метастазы в лимфоузлах | | 1 (25%) | 6 (66,7%) | 9 (64%) | 22 (88%) | 2 (15%) | 7 (87,5%) | 2 (15%) | 4 (100%) |
| Отдаленные метастазы | | 1 (25%) | 4 (44,4%) | 2 (14%) | 17 (68%) | 0 | 8 (100%) | 1 (8%) | 1 (25%) |

Обсуждение результатов исследования

Данные литературы о соотношении инфильтрирующих опухоль субпопуляций CD8 и CD4 Т-лимфоцитов весьма противоречивы, но большинство из них говорит о наличии локального иммунного ответа организма на возникновение опухоли и о благоприятном прогностическом значении увеличения соотношения CD8/CD4 Т-лимфоцитов в опухолевой ткани. Последние исследования говорят о том, что эффективный противоопухолевый ответ происходит преимущественно за счет увеличения субпопуляции CD8+ Т-лимфоцитов, обладающих цитотоксическим действием на опухолевые клетки и именно уровень CD8+ Т-лимфоцитов в ткани опухоли во многом определяет общий уровень лимфоцитарной инфильтрации [1].

В нашем исследовании наблюдалось преимущественное преобладание CD8 лимфоцитов над CD4 лимфоцитами, которое коррелировало с благоприятным прогнозом течения заболевания. Подобные результаты были получены Фильчаковым Ф.В. с соавт., (2014г.), на 22 случаях первичной МК, проведенном в Национальном институте рака, г. Киев [16].

В нашей работе получены статистически значимые различия в течении заболевания у больных с индексом соотношения CD8/CD4 Т-лимфоцитов <1,5 и у больных с индексом соотношения CD8/CD4 лимфоцитов >1,5. Так, если в третьей и четвертой группах преобладали локальные процессы без прогрессирования заболевания, то в первой и второй группах более половины больных имели метастазы, выявленные вместе с первичной опухолью или возникшие отсрочено в течение некоторого периода времени.

Более детальный анализ исхода заболевания выявил, что частота локальных и регионарных рецидивов заболевания в группах 1 и 2 была статистически значимо выше, чем в группах 3 и 4 (p<0,05). Частота отдаленных метастазов в четвертой группе была существенно ниже, чем в остальных группах (11,8%), и имела тенденцию к статистической значимости (p=0,08).

5-летняя выживаемость без прогрессирования и 5-летняя общая выживаемость были максимальными в четвертой группе (65 и 82% соответственно), то есть при достаточно выраженной инфильтрации опухоли CD8+ цитотоксическими лимфоцитами. Ми-

нимальные значения этих показателей зарегистрированы во второй группе (15 и 49% соответственно). Различия по времени без прогрессирования и по продолжительности жизни также оказались статистически значимыми ($p < 0,05$).

Таким образом, можно предположить, что высокое соотношение инфильтрирующих опухоль CD8/CD4 лимфоцитов создает ту определенную напряженность иммунного ответа, которая необходима для сдерживания рецидива опухоли и лучшей выживаемости больных МК.

В то же время, обратные результаты, полученные у больных, получавших медикаментозную терапию, могут свидетельствовать о быстром истощении системы локального Т-клеточного иммунитета.

Заключение

Субпопуляционный состав инфильтрирующих опухоль лимфоцитов у больных МК имеет важное клиническое значение. Полученные результаты дают новые возможности применения иммунологических параметров в прогнозировании течения и исхода заболевания у больных первично-локализованной МК и выделения групп больных с благоприятным и неблагоприятным прогнозом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шамилов Ф.Э. Изучение субпопуляций интралимфатических лимфоцитов у больных раком молочной железы. Онкогинекология. 2012; №4: 53-55.
2. Sato E., Olson S.H., Ahn J., Bundy B., Nishikawa H., Qian F. et al. Intraepithelial CD8 tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005; 102: 18538–18543.
3. Prall F., Dührkop T., Weirich V., Ostwald C., Lenz P., Nizze H. et al. Prognostic role of CD8 tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. Hum Pathol. 2004; 35: 808–816.
4. Fukunaga A., Miyamoto M., Cho Y., Murakami S., Kawarada Y., Oshikiri T. et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4 tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. Pancreas. 2004 Jan; 28(1):26-31.
5. Matsuzaki J., Tsuji T., Immanuel F., Hiroshi L., Mineno S.J. et al. Direct tumor recognition by a human CD4+ T-cell subset potentially mediates tumor growth inhibition and orchestrates anti-tumor immune responses. Sci Rep. 2015; 5: 14896.
6. Hadrup S.R., Marco D., Straten P. Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. Cancer Microenviron. 2013 Aug; 6(2): 123–133.
7. Riazi F., Ajdary S., Omranipour R., Hossein M., Hassan A. Comparative Analysis of CD4+ and CD8+ T Cells in Tumor Tissues, Lymph Nodes and the Peripheral Blood from Patients with Breast Cancer. Iranian Biomedical Journal. 2015; 19(1): 35-44.
8. Shah W., Yan X., Li J., Yi Z., Hongwei C., Wang Y. A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4+FOXP3+ regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. Cellular & Molecular Immunology. 2011; 8:59–66.
9. Giuscă S.E., Wierzbicki P.M., Amălinei C., Căruntu I., Avădănei E.R. Comparative analysis of CD4 and CD8 lymphocytes — evidences for different distribution in primary and secondary liver tumors. Folia histochemica et cytobiologica. 2015; 53 (3):272–281.
10. Goepfert B., Frauenschuh L., Zucknick M., Stenzinger A., Andrulis M., Klauschen F., Joehrens K., Warth A., Renner M., Mehrabi A., Hafezi M., Thelen A., Schirmacher P., Weichert W. Prognostic impact of tumour-infiltrating immune cells on biliary tract cancer. Br. J. Cancer. 2013; 109(10):2665–2674.
11. Liu K., Yang K., Wu B., Chen H., Chen X., XinZu C. et al. Tumor-Infiltrating Immune Cells Are Associated With Prognosis of Gastric Cancer. Medicine (Baltimore). 2015; 94(39): 1631.
12. Noshu K., Baba Y., Tanaka N., K.i Shima, M. Hayashi, J.A. Meyerhardt, E. Giovannucci, G. Dranoff, C.S. Fuchs, S. Ogino. J. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal

cancer and prognosis: cohort study and literature review. J. Pathol. Author manuscript; available in PMC. 2011; 222(4): 350–366.

13. Fridman W.H., Galon J, Pages F, Tartour E, Sautes-Fridman C, Krowmer G. Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. Cancer Res. 2011; 71(17):5601–5605.

14. Inge H.G. Bronkhors T.H. Khanh V. Jordanova E.S., Gregorius P.M. et al. Different Subsets of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Correlate with Macrophage Influx and aneuploidy 3 in Uveal Melanoma. Anatomy and Pathology/Oncology. 2012; 53: 5370-5378

15. Neagu M., Constantin C., Zurac S. Immune Parameters in The Prognosis and Therapy Monitoring of Cutaneous Melanoma Patients: Experience, Role, and Limitations. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. Volume 2013, Article ID 107940, 13 pages.

16. Фильчаков Ф.В., Грабовой А.Н., Лён А.Д., Кукушкина С.Н., Коровин С.И., Кукушкина М.Н., Весельская В.Н., Таран Л.Н. Локальный иммунный ответ у больных меланомой кожи: связь с эффективностью интерферонотерапии. Опухоли кожи, мягких тканей, костей. 2014; №4(16): 12-16

17. Hussein M.R., Elasers D., Fadel S.A., Omar E. Immunohistological characterisation of tumour infiltrating lymphocytes in melanocytic skin lesions. Clin Pathol. J. 2006; 59(3):316–324.

Авторская справка

Божченко Яна Анатольевна
аспирант, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения патологической анатомии опухолей человека
Laody.1981@mail.ru

Вишневская Яна Владимировна

кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения патологической анатомии опухолей человека
yana_vishn@list.ru

Покатаев Илья Анатольевич

кандидат медицинских наук, врач-химиотерапевт отделения клинической фармакологии и химиотерапии
pokia@mail.ru

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина

Российская Федерация, 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 23

Bozhchenko Y.A., Vishnevskaya Y.V., Pokataev I.A. **PROGNOSTIC VALUE OF CD8/CD4 RATIO TUMOR-INFILTRATING LYMPHOSYTES IN PATIENTS WITH SKIN MELANOMA**

N.N Blokhin Russian Cancer Research Center,

Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. Tumor-infiltration lymphocytes subpopulations reflects a condition of local antitumor immunity and has been important predictive value. We was study subpopulations of CD8+ and CD4+ lymphocytes on 90 cases of primary melanoma skin (n=90). We used immunogistochemistry method with antibodies to CD8 and CD4. In tumor infiltrate was 80.1 cytotoxic T-cells (CD8+) in visual field. It was prevailing type of lymphocytes., CD4+lymphocytes was 52.5 cells in visual field. CD8/CD4 ratio was >1 in 78% of cases. Statistically significant correlation of a high index CD8/CD4 ratio with the low level of disease progression and higher 5-year overall survival and 5-year relapse free survival.

Keywords: skin melanoma, tumor-infiltration lymphocytes, tumor microenviroment, CD8+, CD4+, T-lymphocytes

REFERENCES

1. Shamilov F.A., Vorotnikov I.K., Vishnevskaya Y.V., Selchuk V.Y., Tchikvadze N.V, Timoshenko V.V., Tupitsyn N.N. Possibilities of intratumoral lymphocytes subpopulation study on core biopsy speciimens in breast cancer patient by flow cytometry. Oncogynecology journal. 2012;4:53-55.

2. Sato E., Olson S.H., Ahn J., Bundy B., Nishikawa H., Qian F. et al. Intraepithelial CD8 tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102: 18538–18543.
3. Prall F., Duhrkop T., Weirich V., Ostwald C., Lenz P., Nizze H. et al. Prognostic role of CD8 tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. *Hum Pathol.* 2004; 35: 808–816.
4. Fukunaga A., Miyamoto M., Cho Y., Murakami S., Kawarada Y., Oshikiri T. et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4 tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas.* 2004 Jan; 28(1):26–31.
5. Matsuzaki J., Tsuji T., Immanuel F., Hiroshi L., Mineno S.J. et al. Direct tumor recognition by a human CD4+ T-cell subset potentially mediates tumor growth inhibition and orchestrates anti-tumor immune responses *Sci Rep.* 2015; 5: 14896.
6. Hadrup S.R., Marco D., Straten P. Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.* 2013 Aug; 6(2): 123–133.
7. Riazi F., Ajdary S., Omranipour R., Hossein M., Hassan A. Comparative Analysis of CD4+ and CD8+ T Cells in Tumor Tissues, Lymph Nodes and the Peripheral Blood from Patients with Breast Cancer. *Iranian Biomedical Journal.* 2015;19(1): 35–44.
8. Shah W., Yan X., Li J., Yi Z., Hongwei C. Wang Y. A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4+FOXP3+ regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cellular & Molecular Immunology.* 2011; 8:59–66.
9. Giușcă S.E., Wierzbicki P.M., Amălinei C., Căruntu I., Avădănei E.R. Comparative analysis of CD4 and CD8 lymphocytes — evidences for different distribution in primary and secondary liver tumors. *Folia histochemica et cytobiologia.* 2015; 53 (3):272–281.
10. Goepfert B., Frauenschuh L., Zucknick M., Stenzinger A., Andrusis M., Klauschen F., Joehrens K., Warth A., Renner M., Mehrabi A., Hafezi M., Thelen A., Schirmacher P., Weichert W. Prognostic impact of tumour-infiltrating immune cells on biliary tract cancer. *Br. J. Cancer.* 2013; 109(10):2665–2674.
11. Liu K., Yang K., Wu B., Chen H., Chen X., XinZu C. et al. Tumor-Infiltrating Immune Cells Are Associated With Prognosis of Gastric Cancer. *Medicine (Baltimore).* 2015; 94(39): 1631.
12. Noshu K., Baba Y., Tanaka N., K.i Shima, M. Hayashi, J.A. Meyerhardt, E. Giovannucci, G. Dranoff, C.S. Fuchs, S. Ogino. J. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer and prognosis: cohort study and literature review. *J. Pathol.* Author manuscript; available in PMC. 2011; 222(4): 350–366.
13. Fridman W.H., Galon J., Pages F, Tartour E, Sautes-Fridman C, Krowmer G. Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res.* 2011; 71(17):5601–5605.
14. Inge H.G. Bronkhors T.H. Khanh V. Jordanova E.S., Gregorius P.M. et al. Different Subsets of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Correlate with Macrophage Influx and onosomy 3 in Uveal Melanoma. *Anatomy and Pathology/Oncology.* 2012; 53: 5370–5378
15. Neagu M., Constantin C., Zurac S. Immune Parameters in The Prognosis and Therapy Monitoring of Cutaneous Melanoma Patients: Experience, Role, and Limitations. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International.* Volume 2013, Article ID 107940, 13 pages.
16. F.V. Fil'chakov, A.N. Grabovoy, G.D. Lon, S.N. Kukushkina, S.I. Korovin, M.N. Kukushkina, V.N. Vesselskaya, L.N. Taran. Local antitumor immune response in patient with skin melanoma: the relationship with the efficiency of interferonotherapy. *Tumor of skin, soft tissue and bones.* 2014; №4(16): 12–16.
17. Hussein M.R., Elsans D., Fadel S.A., Omar E. Immunohistological characterisation of tumour infiltrating lymphocytes in melanocytic skin lesions. *Clin Pathol. J.* 2006; 59(3):316–324.

Authors

Bozhchenko Yana A.
post-graduate student, pathologist of department of pathological anatomy of human tumors
Laody.1981@mail.ru

Vishnevskaya Yana V.

PhD, senior researcher, pathologist department of pathological anatomy of human tumors, e-mail: yana_vishn@list.ru

Pokataev Ilya A.

PhD doctor chemotherapist. Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy
pokia@mail.ru

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences
Moscow, Russian Federation, 115478, Kashirskoye road, 23

УДК 616.8 – 006

Бывальцев В.А., Степанов И.А., Белых Е.Г., Ярулина А.Д. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИИ ГЛИОБЛАСТОМ

ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»;
НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Пассажирский»;
ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет»,
г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме. Глиобластомы представляют собой гетерогенную группу популяций опухолевых клеток, отличающихся большим количеством генетических повреждений, проявляющихся снижением или повышением функции различных генов, дисрегуляцией клеточных сигнальных путей. Эти особенности глиобластом делают малоэффективными существующие методы лечения, включая современные цитотоксические химиопрепараты и антиангиогенную терапию с помощью моноклональных антител. Известен ряд внутриклеточных сигнальных путей, повреждения которых приводят к инициации опухолевого процесса, клеточной миграции, ангиогенезу и опухолевой инвазии. Прежде всего, для глиобластом характерно нарушение работы pRb- и p53-сигнальных путей, отвечающих за регуляцию клеточного цикла и апоптоз. Кроме того, в глиомогенез вовлечены каскады, связанные с рецепторами различных факторов роста (VEGF, EGF, SCGF и др.). Они вызывают многочисленные эффекты, направленные на усиление пролиферации, инвазии и неоваскуляризации. Доказана роль aberrантной экспрессии микроРНК в развитии глиобластомы. Изменения профиля посттрансляционных модификаций гистонов так-

же играют важнейшую роль в глиомогенезе. В обзоре представлены современные данные о молекулярно-генетических нарушениях при глиобластоме, подробное изучение которых является основой для поиска новых мишеней индивидуализированной таргетной терапии глиобластом с учетом молекулярно-генетических повреждений.

Ключевые слова: глиобластома, молекулярно-генетические повреждения, биология, гистоновый код, микроРНК

Известно, что глиобластома является самой распространенной (65% всех глиальных опухолей) и в то же время агрессивной первичной опухолью головного мозга у взрослых, имеющей наиболее неблагоприятный прогноз [1, 2]. Заболеваемость в среднем составляет 4–10 случаев на 100 тысяч населения в год. Стандартом лечения глиобластом является комбинация хирургического воздействия на опухоль с последующим применением адьювантной лучевой и химиотерапии [1, 3]. Несмотря на значительные успехи фундаментальных наук в области нейробиологии, нейроонкогенеза за последние десятилетия, серьезные достижения в области ми-