

Ф.В. Фильчаков
С.Н. Кукушкина
Е.С. Шумилина
А.Д. Лён
С.И. Коровин
М.Н. Кукушкина
Ю.М. Ильченко

Национальный институт
рака, Киев, Украина

Ключевые слова: меланома
кожи, дисфункция
иммунной системы,
активационные антигены,
регуляторные Т-лимфоциты,
пролиферативный ответ
лимфоцитов, цитотоксичность,
спонтанный апоптоз.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ КРИТЕРИИ ДИАГНОСТИКИ ИММУННОЙ ДИСФУНКЦИИ У БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ

Резюме. В исследование включено 115 больных меланомой кожи (МК) I–IV стадии с локализацией первичной опухоли на туловище и конечностях. Изучение функциональной активности и особенностей активационного фенотипа лимфоцитов (Лф) периферической крови у исследованных больных показало, что уже на ранних стадиях повышается доля Лф, экспрессирующих активационные антигены, с распространением опухолевого процесса эта тенденция нарастает. По мере приобретения Лф активационного фенотипа содержание регуляторных Т-клеток в циркуляции возрастает. У больных МК I–II стадии ответ Т-Лф при их активации *in vitro* через CD3-TCR-рецепторный комплекс существенно превышает нормальные значения; метастазирование МК отменяет этот эффект, снижая показатель ответа Т-Лф до значений у практически здоровых людей. Митоген-индуцированный ответ Лф при использовании субагглютинирующей дозы фитогемагглютинина снижен на всех стадиях заболевания, а при генерализации процесса он снижен также при использовании агглютинирующей дозы митогена. Прогрессирование опухолевого процесса сопровождается повышением интенсивности спонтанного апоптоза и угнетением эффекторных функций (цитотоксической активности) клеток иммунной системы. Использование этих иммунологических показателей в комплексном обследовании больных МК позволит выявить индивидуальные особенности течения опухолевого процесса, спрогнозировать ответ организма на биотерапию и таким образом оптимизировать тактику лечения.

ВВЕДЕНИЕ

Особенности клинического течения меланомы кожи (МК), а также многочисленные факты выявления у пациентов опухолеспецифических иммунных реакций клеточного и гуморального типов [15, 18] свидетельствуют о важной роли иммунной системы как в патогенезе заболевания, так и эффектах биотерапии. Вместе с тем для больных МК до настоящего времени не определены клинически значимые иммунологические параметры, на основании которых можно было бы судить о характере течения заболевания и прогнозировать риск его прогрессирования. В частности, имеют довольно противоречивый характер данные о содержании основных популяций лимфоцитов (Лф) в периферической крови, хотя большинство результатов указывает на уменьшение их количества при генерализации опухолевого процесса. Нет единого мнения относительно экспрессии активационных маркеров на Лф. По данным одних авторов [6, 13, 16], доля Лф, экспрессирующих активационные антигены (ААг), увеличивается, авторы других исследований не отмечали подобных изменений или выявляли их лишь для некоторых маркеров [1, 2]. Результаты изучения содержания естественных регуляторных Т-клеток (Трег) у больных МК также носят противоречивый характер. Увеличение относительного и абсолютно-

го количества Трег в периферической крови больных МК обнаружено в исследовании [11], в то время как согласно данным сообщения [20] эти показатели не отличаются от таковых у практически здоровых людей (ПЗЛ).

В связи с вышеизложенным целью нашего исследования было изучение функциональной активности и особенностей активационного фенотипа Лф периферической крови (ЛПК) у больных МК на разных стадиях заболевания.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включено 115 больных с гистологически подтвержденным диагнозом МК I–IV стадии с локализацией первичной опухоли на туловище и конечностях. Все больные подписали информированное согласие на участие в исследовании. Диагноз первично-локализованной МК (I–II стадия) верифицирован у 61 больного (39 женщин и 22 мужчины в возрасте 25–75 лет, средний возраст — 53,4 года), МК с метастазами в регионарных лимфатических узлах (ЛУ) (III стадия) — у 34 (17 женщин и 17 мужчин в возрасте 24–77 лет, средний возраст — 52,7 года), генерализованная форма (IV стадия) — у 20 (14 женщин и 6 мужчин в возрасте 20–72 лет, средний возраст — 51,6 года). Больные первично-локализованной МК были разделены на две подгруппы

на основании патогистологической верификации поверхностного изъязвления опухоли. Первую подгруппу (без изъязвления) составили 36 больных (23 женщины и 13 мужчин, средний возраст — 52,0 года), вторую (с изъязвлением) — 25 (16 женщин и 9 мужчин, средний возраст — 55,9 года). В группу больных с метастатическим поражением регионарных ЛУ были включены пациенты, ранее не лечившиеся по поводу МК, и пациенты, у которых поражение регионарного лимфатического коллектора произошло спустя 12 мес и более после удаления первичной опухоли. Критерием включения в группу больных с IV стадией МК было отсутствие химиотерапии в анамнезе.

Клинико-иммунологическое обследование больных проводили перед началом основного лечения. В качестве контрольной группы было обследовано 60 ПЗЛ того же возраста.

Изучение активационного фенотипа ЛПК проводили методом проточной цитофлуориметрии [8] с использованием МкАТ к HLA-DR и CD95, меченных флуоресцеинизотиоцианатом («Сорбент», Россия), к CD25, меченных фикоэритринцианином-5, к CD127 и CD69, меченных фикоэритрином («Beckman Coulter», США). Трөг определяли среди CD4⁺-Лф по наличию высокой экспрессии CD25 в комбинации с низкой или отрицательной экспрессией CD127 (CD4⁺25^{high}127^{low-neg}) [17].

Оценку спонтанного апоптоза ЛПК проводили методом проточной цитофлуориметрии [8] с использованием пропидия йодида.

Функциональную активность ЛПК изучали в реакции бласттрансформации Лф (РБТЛ) и цитотоксическом тесте. РБТЛ выполняли морфологическим методом с использованием МкАТ к CD3 (анти-CD3, «Медбиоспектр», Россия) в концентрации 3 мкг/мл и фитогемагглютинаина (ФГА, «Sigma», Германия) в концентрациях 10 и 20 мкг/мл (соответственно субагглютинирующая и агглютинирующая дозы, предварительно подобранных в тесте геагглютинации [5]). Результаты выражали в процентах бласттрансформированных клеток (% БТ).

Цитотоксическую активность ЛПК определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием клеток-мишеней линии К-562 [8]. Результаты выражали цитотоксическим индексом (ЦИ) в процентах:

$$ЦИ = (A - B / C - B) \times 100\%, \text{ где}$$

A — количество мертвых клеток-мишеней в опыте; *B* — количество мертвых клеток-мишеней в контроле; *C* — общее количество клеток-мишеней.

Учет результатов определения цитотоксической активности, спонтанного апоптоза и фенотипирования ЛПК проводили на проточном цитофлуориметре FACScan («Becton Dickinson», США) с использованием программы «Cell Quest».

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Excel (MS Office 2003, XP) и STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., США). Для определения достоверности различий (*p*) показателей в группах использовали критерий Манна — Уитни. Ре-

зультаты представляли в виде среднего арифметического значения (*M*) и его стандартной ошибки (*m*). Различия оценивали как достоверные при *p*<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ активационного фенотипа ЛПК у больных МК выявил повышенную экспрессию ААг на всех стадиях опухолевого процесса (рис. 1).

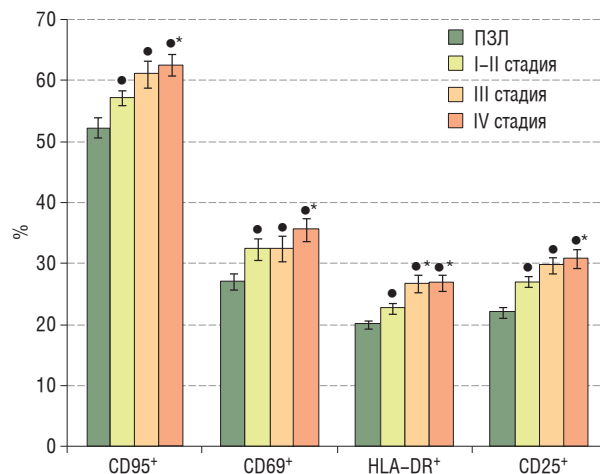


Рис. 1. Содержание активированных Лф (%) в крови больных МК

Примечание: * различия при сравнении с показателем у ПЗЛ статистически достоверны (*p*<0,05); * различия при сравнении с показателем у больных меланомой I–II стадии статистически достоверны (*p*<0,05).

Как видно, уже на ранних стадиях заболевания регистрируется существенное увеличение относительного количества клеток, экспрессирующих как ранние (CD25, CD69), так и поздние (CD95, HLA-DR) маркеры активации. Наряду с усилением экспрессии CD25- и HLA-DR-антигенов, свидетельствующих в пользу реализации иммунной системой эффекторных функций [10], наблюдается повышение количества циркулирующих CD95⁺-Лф, готовых к апоптозу. Такая тенденция характерна для всех стадий опухолевого процесса. Однако, если у больных первично-локализованной МК с гистологически верифицированным изъязвлением опухоли регистрируется повышенное содержание CD95⁺-Лф (59,9±1,7 против 52,3±1,7% у ПЗЛ, *p*<0,05), то у больных МК без изъязвления содержание этих клеток не отличается от нормального (соответственно 55,3±1,4 и 52,3±1,7%, *p*>0,05). Эти данные позволяют предположить наличие элиминации на периферии аутореактивных клонов Т-Лф, распознающих линейноспецифические антигены МК. Об этом косвенно свидетельствует факт, что в отличие от CD95⁺-Лф содержание CD25⁺-, CD69⁺-, HLA-DR⁺-ЛПК в обеих подгруппах больных первично-локализованной МК было практически одинаковым.

Распространение опухолевого процесса на регионарный лимфатический коллектор и за его пределы приводит к усилению вышеописанных явлений. Так, относительное количество HLA-DR⁺-Лф у больных с регионарными метастазами достоверно выше, чем

у больных первично-локализованной МК. Содержание CD25⁺-, HLA-DR⁺-, CD69⁺, CD95⁺-Лф у больных генерализованной МК повышено не только по сравнению с показателями у ПЗЛ, но и больных первично-локализованной МК. В плане обсуждения полученных данных можно отметить, что аналогичные изменения активационного фенотипа Лф были описаны ранее [6]. Авторы цитируемой работы обратили внимание на более выраженный активационный фенотип (HLA-DR, CD95, CD25, CD71) ЛПК у больных МК по сравнению с таким Лф больных с другими солидными злокачественными новообразованиями.

Следствием антигенспецифической активации Т-Лф является экспрессия рецептора к α -цепи ИЛ-2 (CD25). С целью уточнения субпопуляционного состава Т-Лф, реагирующих таким образом на активный рост МК, было изучено содержание CD4⁺25⁺- и CD8⁺25⁺-клеток среди ЛПК больных на разных стадиях заболевания. Существенное увеличение количества CD4⁺25⁺-Лф в циркуляции регистрируется у больных первично-локализованной МК (20,1±0,8 против 14,8±0,6% у ПЗЛ, p<0,05). Прогрессирование опухолевого процесса ассоциируется со стабильно большим количеством CD4⁺25⁺-Лф в циркуляции, содержание которых при генерализованной форме превышает аналогичный показатель у больных первично-локализованной МК (соответственно 23,6±1,3 и 20,1±0,8%, p<0,05). Напротив, относительное количество CD8⁺25⁺-Лф у больных МК не отличается от значений нормы вне зависимости от стадии заболевания (при I–II стадии — 2,0±0,3%, при III — 1,8±0,2%, при IV — 2,4±0,6% против 2,1±0,2% у ПЗЛ, p>0,05).

Следовательно, в процессе роста и метастазирования МК в периферической крови больных возрастает доля активированных Т-хелперов (CD4⁺25⁺), что может ассоциироваться с иммуносупрессией, механизмы которой направлены на подавление противоопухолевого иммунного ответа, обусловленного, в частности, Трег [21]. Поэтому представляет интерес изучение содержания этих клеток в периферической крови больных на разных стадиях заболевания (рис. 2).

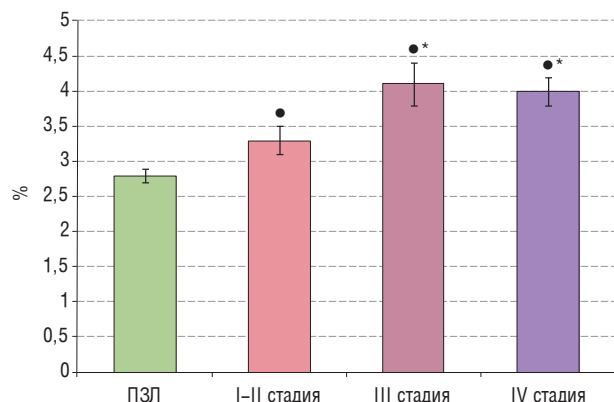


Рис. 2. Содержание (%) Трег в крови больных МК

Примечание: * различия при сравнении с показателем у ПЗЛ статистически достоверны (p<0,05); * различия при сравнении с показателем у больных МК I–II стадии статистически достоверны (p<0,05).

Как видно, повышение уровня Трег происходит уже на ранних стадиях заболевания, при I–II стадии (3,3±0,2 против 2,8±0,1% у ПЗЛ, p<0,05). У больных с метастатическим поражением регионарных ЛУ и больных с генерализованной МК содержание этих клеток в периферической крови стабильно высокое (соответственно 4,1±0,3 и 4,0±0,2%), достоверно превышающее уровень не только у ПЗЛ, но и у больных с первично-локализованной МК (p<0,05). Важно отметить, что повышение содержания Трег в циркуляции происходит по мере приобретения Лф активационного фенотипа.

Увеличение плотности поверхностных рецепторов к ИЛ-2 (CD25) предполагает, в свою очередь, повышение интенсивности пролиферативного ответа Т-Лф на действие этого цитокина. Однако имеются данные, что у больных МК такой ответ снижен вследствие нарушения фосфорилирования белков, STAT, обеспечивающих передачу активирующего транскрипцию генов-мишеней сигнала [14].

Поэтому нами был использован методический подход, позволивший оценить ответ Т-Лф при активации иных путей передачи сигнала — классического (через CD3-TCR-рецепторный комплекс) и альтернативного (митоген-индуцированного) (табл. 1).

Таблица 1

Пролиферативная активность (% БТ) ЛПК у больных МК на разных стадиях заболевания

Показатели	Больные МК, стадия заболевания			ПЗЛ
	I–II	III	IV	
% БТ (10 мкг/мл ФГА)	24,5±2,8*	22,9±4,1*	16,3±4,9*	33,2±1,9
% БТ (20 мкг/мл ФГА)	60,0±3,1	55,4±5,3	33,6±5,8* ^{**}	63,5±1,8
% БТ (анти-CD3)	60,4±4,2*	52,8±4,6	42,2±7,5*	46,9±4,4

Примечание: * — различия при сравнении с показателем у ПЗЛ статистически достоверны (p<0,05); * — различия при сравнении с показателем у больных с I–II стадией меланомы статистически достоверны (p<0,05); ** — различия при сравнении с показателем у больных с III стадией меланомы статистически достоверны (p<0,05).

Как видно из представленных данных, пролиферативный ответ Т-Лф периферической крови больных МК I–II стадии при их активации по классическому пути, инициированному через CD3-TCR-рецепторный комплекс, существенно превышает такой у ПЗЛ. Метастазирование МК в регионарный лимфатический коллектор с последующей диссеминацией во внутренние органы нивелирует такой эффект, снижая ответ Т-Лф до уровня ПЗЛ. Отметим также, что у больных генерализованной формой МК % БТ существенно ниже, чем у больных первично-локализованной МК. Следовательно, хотя повышенный пролиферативный ответ Т-Лф, инициированный по классическому пути активации, характерен только для ранних стадий заболевания, при метастазах в регионарные ЛУ и генерализованной МК он регистрируется на уровне нормы. Последнее согласуется с данными исследования [14], свидетельствующими о сохранности функциональной активности Лф (по данным этого же теста) у больных МК III–IV стадии. Важно отметить, что в научной литературе есть данные о снижении пролиферативной активности ЛПК *in vitro* у больных с

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

генерализованной формой других солидных злокачественных новообразований [3, 4, 12].

Иные результаты были получены при изучении митоген-индуцированной пролиферации Лф, отражающей альтернативный путь активации Т-Лф (см. табл. 1). Как видно, вне зависимости от стадии МК ответ ЛПК на субагглютинирующую дозу ФГА (10 мкг/мл) достоверно снижен по сравнению с таким у ПЗЛ. Подобные данные были получены ранее [7]. Авторы упомянутой работы обнаружили наиболее выраженное снижение пролиферативного ответа ЛПК онкологических больных при индукции низкими концентрациями ФГА. В то же время использование агглютинирующей дозы ФГА (20 мкг/мл) выявило особенности пролиферативного ответа ЛПК больных МК в зависимости от стадии заболевания. Так, у больных с I–III стадией МК ответ ЛПК *in vitro* на эту дозу митогена не отличается от такого у ПЗЛ. У больных генерализованной МК показатель БТ снижен не только по сравнению с таким у ПЗЛ, но и у больных с I–III стадией заболевания.

При детальном анализе пролиферативной активности ЛПК у больных первично-локализованной МК, проведенном с учетом гистологической верификации поверхностного изъязвления опухоли, оказалось, что характер митоген-индуцированной пролиферации в подгруппах больных не зависит от этого фактора, в то время как анти-CD3-индуцированная пролиферация существенно отличается (табл. 2).

Таблица 2
Пролиферативная активность (% БТ) ЛПК у больных первично-локализованной МК

Показатели	Больные с гистологической верификацией опухоли		ПЗЛ
	Без изъязвления	С изъязвлением	
% БТ (10 мкг/мл ФГА)	24,1±3,5*	21,2±3,9*	33,2±1,9
% БТ (20 мкг/мл ФГА)	60,4±4,4	56,7±4,4	63,5±1,8
% БТ (анти-CD3)	53,2±5,2	74,6±2,9*.*	46,9±4,4

Примечание: * – различия при сравнении с показателем у ПЗЛ статистически достоверны ($p < 0,05$); *.* – различия при сравнении с показателем у больных меланомой без изъязвления первичной опухоли статистически достоверны ($p < 0,05$).

Как видно, при поверхностном изъязвлении первичной опухоли наблюдали существенное повышение ответа циркулирующих Т-Лф при их активации по классическому пути, в отличие от Лф больных без поверхностного изъязвления МК. При этом уровень БТ Т-Лф больных первично-локализованной МК с изъязвлением существенно превышал такой у ПЗЛ.

Таким образом, для ранних стадий МК характерным лабораторным признаком активного опухолевого роста является повышение ответа *in vitro* при активации Т-Лф по классическому пути. Для диссеминации опухолевого процесса характерно угнетение пролиферации Лф в ответ на активацию *in vitro* как по классическому, так и по альтернативному пути.

Известно, пролиферация Лф в ответ на активацию тесным образом связана с противоположным процессом — их гибелью. Известно также, что для больных со злокачественными новообразованиями характер-

но повышение интенсивности апоптоза циркулирующих Лф [16, 19]. В контексте описанных данных представилось важным изучить уровень спонтанного апоптоза ЛПК у больных МК в зависимости от тяжести течения опухолевого процесса.

У больных первично-локализованной МК уровень спонтанного апоптоза циркулирующих Лф не отличается от такого у ПЗЛ (соответственно $3,8 \pm 0,4$ и $3,9 \pm 0,4\%$, $p > 0,05$). Метастазирование МК в регионарный лимфатический коллектор и дальнейшая диссеминация во внутренние органы ассоциируются с усилением спонтанного апоптоза ЛПК (соответственно $6,7 \pm 1,2$ и $7,1 \pm 1,3\%$), уровень которого превышает показатель не только у ПЗЛ, но и у больных с I–II стадией заболевания ($p < 0,05$). Снижение пролиферативной активности циркулирующих Лф и усиление апоптоза на фоне метастазирования предшествует развитию иммуносупрессии, связанной с развитием лимфопении, о чем мы сообщали ранее [9].

В целом описанные выше изменения в иммунной системе больных МК отражают проявления поликлональной активации Т-Лф, лабораторными признаками которой на ранних стадиях заболевания являются повышенная экспрессия активационных маркеров и выраженный ответ на стимуляцию *in vitro* по классическому пути активации. К лабораторным признакам распространения опухолевого процесса на регионарный лимфатический коллектор и за его пределы можно отнести угнетение классического и альтернативного механизмов активации Т-Лф на фоне повышенной экспрессии активационных маркеров и усиление апоптоза циркулирующих Лф. Следует отметить, что если при первично-локализованной МК дисфункция иммунной системы носит активационный характер, то прогрессирование заболевания ассоциируется с иммунодефицитом, глубина которого обусловлена тяжестью течения опухолевого процесса [9].

В подтверждение сказанного можно привести результаты изучения цитотоксической активности ЛПК в зависимости от стадии МК (рис. 3).

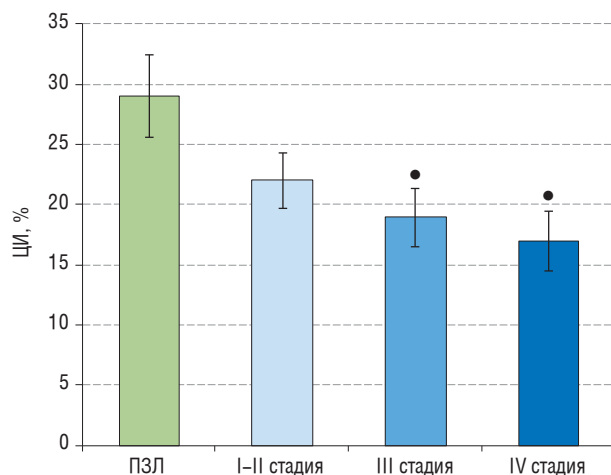


Рис. 3. Цитотоксическая активность ЛПК больных МК на разных стадиях заболевания

Примечание: * различия при сравнении с показателем у ПЗЛ статистически достоверны ($p < 0,05$).

Как видно, дисфункция иммунной системы формируется уже на ранних стадиях заболевания и проявляется тенденцией к снижению цитотоксичности Лф у больных первично-локализованной МК. Причем величина ЦИ у больных этой группы с изъязвленной МК значительно снижена по сравнению с показателем у ПЗЛ (соответственно $19,9 \pm 3,7$ и $29,1 \pm 3,4\%$, $p < 0,05$). Метастазирование МК в регионарные ЛУ и генерализация опухолевого процесса ассоциируются с выраженным снижением ЦИ Лф, что связано на поздних стадиях МК с уменьшением в периферической крови абсолютного количества цитотоксических клеток-эффекторов [9].

Подводя итог изложенному материалу, можно утверждать, что эволюция иммунных нарушений при МК является отражением тяжести течения опухолевого процесса. Поликлональная активация Т-Лф на ранних стадиях заболевания, проявляющаяся повышенной экспрессией ААг, носит характер защитно-приспособительной реакции, сменяющейся в процессе распространения МК в лимфоидную ткань и внутренние органы развитием механизмов, обуславливающих угнетение эффекторных функций клеточного звена иммунной системы.

ВЫВОДЫ

На основании анализа выявленных изменений параметров иммунной системы больных МК можно сформулировать клинико-лабораторные критерии, важные для диагностики иммунной дисфункции при этом заболевании.

1. Для первично-локализованной МК характерны: выраженный активационный фенотип ЛПК, повышенный анти-CD3-индуцированный ответ Лф *in vitro*, низкие показатели митоген-индуцированной пролиферации Лф при ответе на субагглютинирующую дозу ФГА.

2. При метастазировании МК в регионарный лимфатический коллектор — повышенное содержание Трег в циркуляции, низкие показатели пролиферативного ответа Лф на субагглютинирующую дозу ФГА, низкие показатели цитотоксической активности Лф *in vitro*.

3. Для генерализованной МК — высокий уровень Трег, низкие показатели митоген-индуцированной пролиферации Лф при нормальных значениях их анти-CD3-индуцированного ответа, низкие показатели цитотоксической активности.

4. Можно ожидать, что применение этих иммунологических критериев в комплексном обследовании больных МК позволит определять индивидуальные особенности течения опухолевого процесса, прогнозировать ответ организма на биотерапию и таким образом оптимизировать тактику лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Абрамов МЕ, Гуторов СЛ, Славина ЕГ и др.** Химиотерапия диссеминированной меланомы кожи с включением Ингарона. Клинико-иммунологические исследования. Рос биотер журн 2009; **8** (1): 64–74.

2. **Демидов ЛВ, Харкевич ГЮ, Тимофеев ИВ.** Результаты иммунопрофилактики метастазов меланомы кожи рекомбинантным гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором после хирургического иссечения первичной опухоли: динамика иммунологических и гематологических показателей. Рос биотер журн 2002; **1** (4): 49–53.

3. **Курганова ЕВ, Тихонова МА, Егоров ДН и др.** Регуляторные Т-лимфоциты у больных с новообразованиями желудочно-кишечного тракта. Сибирский онкологический журнал 2010; **2** (38): 35–41.

4. **Курганова ЕВ, Тихонова МА, Лебедева ВА и др.** Характеристика регуляторных Т-клеток у больных раком яичников. Сибирский онкологический журнал 2008; **6** (30): 40–5.

5. **Луцик МД, Панасюк ЕН, Луцик АД.** Лектины. Львов: Вища школа, 1981. 156 с.

6. **Олейник ЕК, Шибаев МИ, Олейник ВМ.** Маркеры активации лимфоцитов крови (CD25, CD71, CD95, HLA-DR) у онкобольных. Гематология и трансфузиология 2006; **51** (1): 18–22.

7. **Олейник ЕК, Олейник ВМ, Назаров ПГ и др.** Снижение индуцированной митогенами поликлональной активации лимфоцитов периферической крови как параметр иммуносупрессии при различных опухолях человека. Вопр онкологии 2007; **53** (1): 49–53.

8. **Пинегин БВ, Ярилин АА, Симонова АВ и др.** Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. Пособие для врачей-лаборантов. Москва 2001. 55 с.

9. **Фільчаков ФВ, Кукушкіна СМ, Шуміліна КС та ін.** Особливості імунного статусу у хворих на меланому шкіри на різних стадіях захворювання. Клин онкол 2011; **2** (2): 36–40.

10. **Хайдуков СВ, Зурочкин АВ.** Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. Челябинск, 2008. 195 с.

11. **Cesana G, DeRaffele G, Cohen S, et al.** Characterization of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. J Clin Oncol 2006; **24** (7): 1169–77.

12. **Critchley-Thorne RJ, et al.** Impaired interferon signaling is a common immune defect in human cancer. PNAS 2009; **106** (22): 9010–15.

13. **Dworacki G, et al.** Decreased ζ chain expression and apoptosis in CD3⁺ peripheral blood T lymphocytes of patients with melanoma. Clin Cancer Res 2001; **7**: 947s–957s.

14. **Mortarini R, Vegetti C, Molla A, et al.** Impaired STAT phosphorylation in T-cells from melanoma patients in response to IL-2: association with clinical stage. Clin Cancer Res 2009; **15**: 4085–94.

15. **Romero P, Cerottini JC, Speiser DE.** The human T-cell response to melanoma antigens. Adv Immunol 2006; **92**: 187–224.

16. **Saito T, Dworacki G, Gooding W, et al.** Spontaneous apoptosis of CD8⁺ T lymphocytes in peripheral blood of patients with advanced melanoma. Clin Cancer Res 2000; **6**: 1351–64.

17. **Seddiki N, Santner-Nanan B, Martison J, et al.** Expression of interleukin(IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. J Exp Med 2006; **203** (7): 1693–700.

18. **Stockert E, Jager E, Chen Y, et al.** A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. J Exp Med 1998; **187** (8): 1349–54.

19. **Takahashi A, Kono K, Amemiya H, et al.** Elevated Caspase-3 activity in peripheral blood T-cells coexists with increased degree of T-cell apoptosis and down-regulation of TCR zeta molecules in patients with gastric cancer. Cancer Res 2001; **7**: 74–80.

20. **Viguer M, Lemaître F, Verola O, et al.** Foxp3 expressing CD4⁺CD25 high regulatory T-cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T-cells. J Immunol 2004; **173** (2): 1444–53.

21. **Wolf AM, Wolf D, Steurer M, et al.** Increase of regulatory T-cell in the peripheral blood of cancer patients. Clin Cancer Res 2003; **9** (2): 606–12.

IMMUNE SYSTEM DYSFUNCTION IN PHASIC DEVELOPMENT OF SKIN MELANOMA

*F.V. Fil'chakov, S.N. Kukushkina, E.S. Shumilina,
A.D. Lon, S.I. Korovin, M.N. Kukushkina,
Y.M. Il'chenko*

Summary. *In research it is included 115 patients with skin melanoma stage I–IV with the localization of the primary tumor. The study of functional activity and phenotypic characteristics of the activation of peripheral blood lymphocytes in patients with melanoma at different stages of the disease showed that in the early stages of the disease the proportion of lymphocytes expressing the activation antigens increases, and the proliferation of tumor exacerbated this trend. With the acquisition of lymphocyte activation phenotype the content of regulatory T-cells in the circulation increases. In patients with stage I–II proliferative response of T lymphocytes during their activation via the CD3-TCR-receptor complex is much higher than normal values. Metastasis of melanoma negates the effect by reducing the anti-CD3-induced T-cell response to values in healthy people. Mito-*

gen-induced lymphocyte response using subagglutinating dose of PHA decreased at all stages of the disease, and during generalization, it also reduced with agglutinating dose. Tumor progression is accompanied by increase of spontaneous apoptosis and inhibition of effector functions (cytotoxic activity) of immune cells. The use of these immunological parameters in a complex examination of patients with skin melanoma will reveal the individual characteristics of the tumor process, predict the biological response of the organism to biotherapy, and thus to optimize the tactics of their treatment.

Key words: skin melanoma, immune system dysfunction, activation antigens, regulatory T-cells, lymphocyte proliferation, cytotoxicity, spontaneous apoptosis.

Адрес для переписки:

Фильчаков Ф.В.
03022, Киев, ул. Ломоносова, 33/43
Национальный институт рака
E-mail: labklimmun@i.ua