

ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОРЕАКТИВНОСТІ ОРГАНІЗМУ ХВОРИХ НА МЕЛАНОМУ ШКІРИ З МЕТАСТАЗАМИ В РЕГІОНАРНІ ЛІМФОВУЗЛИ В УМОВАХ ДІЇ РІЗНИХ СХЕМ ІНТЕРФЕРОНОТЕРАПІЇ



Ф.В. Фільчаков, К.С. Шуміліна,
С.М. Кукушкіна, Г.Д. Льон,
С.І. Коровін, М.М. Кукушкіна

Адреса:
Шуміліна Катерина Станіславівна
03022, Київ, вул. Ломоносова, 33/43
Національний інститут раку
Тел.: 0 (44) 259-01-84
E-mail: labklintum@i.ua

Ключові слова: меланома шкіри, інтерферонотерапія, імунний статус.

Проведено багатопараметричний імунологічний моніторинг 27 хворих з гістологічно підтвердженим діагнозом меланоми шкіри з метастазами в регіонарні лімфатичні вузли ІІВ–ІІІС стадії в динаміці комбінованого лікування із використанням різних схем інтерферонотерапії. Встановлено, що індукційний курс інтерферону- $\alpha 2b$ (ІФН- $\alpha 2b$) незалежно від схеми застосування (до або після хірургічного лікування) супроводжується розвитком лейкоцитопенії безпосередньо після його закінчення; у разі застосування цього курсу в неоад'ювантному режимі — вміст лейкоцитів та лімфоцитів в периферичній крові хворих відновлюється після оперативного втручання. Неоад'ювантне застосування індукційного курсу ІФН- $\alpha 2b$ сприяє відновленню після хірургічного лікування кількості Т-лімфоцитів в периферичній крові до фізіологічної норми, але не усуває збільшений вміст Трег. Аналогічний курс інтерферонотерапії в ад'ювантному режимі не відновлює знижений вміст Т-лімфоцитів, проте сприяє зниженню рівня Трег в циркуляції.

ВСТУП

Меланома шкіри є найбільш небезпечною формою злоякісних новоутворень шкіри. За даними Національного канцер-реєстру України [1], у 2010 р. на меланому шкіри захворіло 2829 осіб, що спричинило 1070 випадків смерті. Результати лікування хворих на меланому шкіри все ще залишаються незадовільними через раннє метастазування, швидке прогресування і низьку чутливість пухлинних клітин до хіміопрепаратів. 5-річна виживаність становить від 90% при І стадії до 1–4% при IV стадії захворювання. Головною і в той же час дуже складною для вирішення проблемою ефективного лікування цієї категорії хворих є запобігання розвитку метастазів. З метою профілактики останніх використовується інтерферонотерапія, що включена до стандартів лікування хворих з І–ІІІ стадіями меланоми шкіри [2], проте, за даними різних авторів, її ефективність становить 16–48% [3–5].

Удосконалення існуючих схем застосування інтерферону- α (ІФН- α) проводиться як шляхом зміни доз та режимів введення препарату, так і доповнення іншими цитокінами, зокрема, інтерфероном γ [6, 7]. За даними американських дослідників [8], застосування високодозової терапії ІФН- α в неоад'ювантному режимі є ефективним методом лікування хворих

на меланому шкіри ІІВ–ІІІС стадії: в 55% випадків відмічають об'єктивну відповідь на терапію. В науково-дослідному відділенні пухлин шкіри та м'яких тканин Національного інституту раку (завідувач — доктор медичних наук С.І. Коровін) розпочато клінічне дослідження впливу неоад'ювантної інтерферонотерапії на ефективність лікування пацієнтів з меланою шкіри з метастазами в регіонарні лімфовузли (ММРЛВ). Врахування особливостей біологічної відповіді організму хворих [9] на біотерапію є важливим аспектом її впровадження. Саме тому вивчення впливу неоад'ювантного курсу ІФН- α на імунну систему хворих на ММРЛВ стало метою даного дослідження.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ

У дослідження включено 27 хворих з гістологічно підтвердженим діагнозом ММРЛВ ІІВ–ІІІС стадії, які надали письмову поінформовану згоду на участь у дослідженні. Серед пацієнтів було 15 чоловіків та 12 жінок; середній вік хворих становив $51,7 \pm 2,6$ року (від 24 до 71 року).

Шляхом рандомізації хворі були розподілені на контрольну (16) та основну (11) групи. Представлений дизайн дослідження (рисунк) включає режими застосування ІФН- α у хворих досліджу-



ваних груп та етапи отримання матеріалу для імунологічних досліджень. Хворим контрольної групи було розпочато індукційний курс інтерферонотерапії (рекомбінантний ІФН-α2b підшкірно по 9 млн МО щоденно упродовж 23 днів) через 8–10 діб після хірургічного лікування. По закінченні індукційного курсу хворі отримували підтримувальний курс інтерферонотерапії (рекомбінантний ІФН-α2b підшкірно по 3 млн МО 3 рази на тиждень упродовж 12 міс). Хворі основної групи розпочинали лікування з індукційного курсу рекомбінантним ІФН-α2b (підшкірно по 9 млн МО щоденно упродовж 23 днів), після цього отримували хірургічне лікування, через 8–10 діб після якого розпочинали підтримувальний курс терапії із застосуванням ІФН-α2b (підшкірно по 3 млн МО 3 рази на тиждень упродовж 12 міс).

За період спостереження зразки крові від хворих отримували 4 рази: 1-й етап — безпосередньо перед початком лікування; 2-й — через 8–10 днів після хірургічного втручання (контрольна група) або після індукційного курсу рекомбінантним ІФН-α2b в неoad'ювантному режимі (основна група); 3-й — після індукційного курсу рекомбінантним ІФН-α2b в ад'ювантному режимі (контрольна група) або через 8–10 днів після хірургічного лікування (основна група); 4-й — через 3 міс від початку підтримувального курсу терапії ІФН-α2b. Імунологічні дослідження після закінчення

повного курсу лікування (5-й етап) — продовжуються.

В якості контрольних імунологічних показників застосовували величини, що були отримані при обстеженні 76 практично здорових людей (ПЗЛ).

Дизайн проведення даного дослідження схвалено локальною комісією з питань етики Національного інституту раку МОЗ України.

Методи дослідження. Кількість лейкоцитів в периферичній крові та лейкоцитарну формулу визначали загальноприйнятим методом [10]. Фенотипічні характеристики лімфоцитів встановлювали за допомогою методу проточної цитофлуориметрії [11, 12] з використанням моноклональних антитіл (МКАТ) до CD3, CD19, CD4, CD8, CD16, мічених флуоресцеїнізотіоціанатом (Сорбент, Росія), CD25, мічених фікоеритринціаніном-5, CD127, CD5, мічених фікоеритрином (Beckman Coulter, США).

Для визначення регуляторних Т-клітин (Трег) використовували багатоваріаційний аналіз з багатопарним введенням логічних обмежень. Трег виявляли серед CD4⁺-лімфоцитів за наявністю високої експресії CD25 в поєднанні з низькою або негативною експресією CD127 (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low-neg}) [13–15]. Для встановлення субпопуляційного складу В-лімфоцитів використовували двопараметричний аналіз з визначенням CD5-антигену та лінійноспецифічного маркера В-лімфоцитів — CD19. Серед CD19⁺-лімфоцитів визначали В1-клітини за експресією молекули CD5, В2-клітини — за її відсутністю [15].

МКАТ з гепаринізованою кров'ю (20 ОД гепарину (Біохемі, Австрія)) у співвідношенні 1:5 інкубували у темряві упродовж 30 хв при температурі 20–25 °С; додавали 2,0 мл лізуючого розчину та витримували 10 хв за тих же умов. Потім клітини двічі відмивали забуференим ізотонічним розчином NaCl (забуферений фізіологічний розчин — 3ФР) та фіксували 1% розчином параформальдегіду. Результати обчислювали на проточному цитоф-

луориметрі FACSscan (Becton Dickinson, США) з використанням програми Cell Quest. Гейт популяції клітин встановлювали на підставі комбінації прямого та бокового світлорозсіювання і розміру клітин [16]. Під час обліку результатів підраховували 2·10³ лімфоцитів при визначенні основних популяцій та 10·10³ — при визначенні мінорних субпопуляцій (Трег, В1- та В2-лімфоцитів). Імунорегуляторний індекс (ІРІ) визначали як співвідношення CD4/CD8.

Методи обробки результатів. Статистична обробка отриманих даних проведена із використанням Excel (MS Office 2003, XP) та програми STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., США). Результати дослідження представляли у вигляді медіани та значень 10 та 90% квантилів. Для визначення вірогідності розбіжностей (р) показників незалежних груп застосовували критерій Манна — Уїтні, показників групи в динаміці лікування — одновибірковий критерій Уїлкоксона [17, 18]. Розбіжності оцінювали як вірогідні при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

До початку лікування у лейкограмі хворих на ММРЛВ контрольної та основної груп не виявлено суттєвих (p>0,05) відхилень при порівнянні з такою у ПЗЛ за винятком лімфоцитопенії (p<0,05) у хворих основної групи (табл. 1 та 2).

Після індукційного курсу ІФН-α2b, проведеного пацієнтам контрольної групи в ад'ювантному режимі (3-й етап), встановлено, що вміст лейкоцитів у периферичній крові вірогідно знижується за рахунок сегментоядерних нейтрофілів, базофілів та лімфоцитів порівняно з таким у ПЗЛ. При цьому відбувається збільшення (p<0,05) відносної кількості великих гранулярних лімфоцитів проти показника, що реєструється на 2-му етапі дослідження.

Після аналогічного курсу інтерферонотерапії, проведеного пацієнтам основної групи в неoad'ювантному режимі

Таблиця 1 Зміни в лейкограмі у хворих на ММРЛВ контрольної групи в динаміці інтерферонотерапії

Гематологічні показники	Одиниці виміру	Хворі на ММРЛВ, етапи обстеження				ПЗЛ
		1	2	3	4	
Лейкоцити	· 10 ⁹ /л	5,3 (3,6; 6,4)	6,5 (2,3; 9,7)	4,2 (1,6; 4,7)***	4,9 (3,3; 5,3)	5,4 (4,5; 7,0)
Паличкоядерні нейтрофіли	%	1,0 (0; 4,5)	1,5 (1; 7)	2 (0; 5,5)	2,5 (2,5; 3)*	1,5 (0; 3,0)
	· 10 ⁹ /л	0,05 (0; 0,27)	0,10 (0,05; 0,45)	0,09 (0; 0,26)	0,12 (0,10; 0,13)***	0,08 (0; 0,16)
Сегментоядерні нейтрофіли	%	60 (38; 69,5)	59 (48,5; 71,5)	49 (53; 61)	60 (57; 66,5)	55,5 (42,5; 66,5)
	· 10 ⁹ /л	2,96 (1,90; 4,45)	3,80 (1,36; 6,94)	1,62 (0,78; 2,87)***	2,79 (2,19; 3,18)	3,11 (1,95; 4,50)
Еозинофіли	%	4 (0; 13)	1,5 (0,5; 10,5)	1,5 (0; 3)	0,5 (0,5; 2,5)	2 (0; 5,5)
	· 10 ⁹ /л	0,21 (0; 0,65)	0,09 (0,02; 0,39)	0,07 (0; 0,14)	0,02 (0,2; 0,13)	0,12 (0; 0,29)
Базофіли	%	1 (0,5; 2)	1 (0; 2)	0 (0; 1,5)*	0,5 (0; 1)	1 (0; 1,5)
	· 10 ⁹ /л	0,06 (0,02; 0,12)	0,06 (0; 0,15)	0 (0; 0,06)***	0,03 (0; 0,05)	0,05 (0; 0,10)
Моноцити	%	7,8 (1; 15)	9 (4,5; 17)	8 (4; 13)	7 (6,5; 13)	7 (4,5; 9,0)
	· 10 ⁹ /л	0,35 (0,06; 0,92)	0,52 (0,21; 0,73)	0,38 (0,06; 0,46)	0,34 (0,21; 0,69)	0,33 (0,23; 0,54)
Великі гранулярні лімфоцити	%	4,5 (0; 7,5)	4,3 (1; 7,5)	5 (2; 15)**	3,5 (3; 7)	4 (1,5; 11)
	· 10 ⁹ /л	0,23 (0; 0,37)	0,22 (0,07; 0,35)	0,11 (0,09; 0,71)	0,23 (0,15; 0,34)	0,24 (0,11; 0,50)
Лімфоцити	%	26,5 (18,5; 44)	21,5 (19; 43,5)***	43 (24; 52)	23,5 (21,5; 32)	33,5 (21,5; 46)
	· 10 ⁹ /л	1,48 (0,83; 2,03)	1,48 (0,44; 2,14)	1,25 (0,75; 1,81)***	1,139 (0,78; 1,57)***	1,77 (1,17; 2,54)

*Розбіжність при порівнянні з показником до лікування статистично вірогідна (p<0,05); **розбіжність при порівнянні з показником на 2-му етапі статистично вірогідна (p<0,05); ***розбіжність при порівнянні з показником ПЗЛ статистично вірогідна (p<0,05).

(2-й етап), виявлено, що вміст лейкоцитів у периферичній крові також значно зменшується ($p < 0,05$) за рахунок сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів, базофілів та лімфоцитів порівняно з такими у ПЗЛ (див. табл. 2). Проте, на відміну від хворих контрольної групи, у пацієнтів основної групи відмічали збільшення ($p < 0,05$) відносної кількості лімфоцитів порівняно з вихідним значенням та відносного вмісту моноцитів проти такого у ПЗЛ.

Важливо підкреслити, що у хворих основної групи на 8-10-ту добу після хірургічного лікування (3-й етап) кількість лейкоцитів та їх форм у периферичній крові відновлюється до рівня у ПЗЛ. На цьому етапі дослідження особливо чутливими виявились сегментоядерні нейтрофіли, абсолютна кількість яких значно збільшилась порівняно з попереднім значенням ($p < 0,05$), що може бути обумовлено особливостями післяопераційного періоду.

У хворих основної групи на тлі застосування в післяопераційний період підтримувального курсу ІФН- $\alpha 2b$ упродовж 3 міс (4-й етап) розвивається лейкоцитопенія за рахунок сегментоядерних нейтрофілів при порівнянні з аналогічними показниками у ПЗЛ ($p < 0,05$). У той же час виявлено зсув лейкоцитарної формули вліво за рахунок збільшення кількості паличкоядерних нейтрофілів відносно такої у ПЗЛ ($p < 0,05$), як і в пацієнтів контрольної групи на цьому етапі спостереження. Натомість, на відміну від них, у хворих основної групи суттєво підвищується відносний вміст моноцитів та великих гранулярних лімфоцитів при порівнянні з показниками до інтерферонотерапії ($p < 0,05$).

При дослідженні популяційного складу лімфоцитів периферичної крові у хворих на ММРЛВ основної групи до лікування встановлено, що лімфоцитопенія розвивається за рахунок зниженого вмісту всіх популяцій: Т-, В-лімфоцитів та природних кілерних клітин відносно

такого у ПЗЛ ($p < 0,05$) (табл. 3). У свою чергу, Т-лімфоцитопенія зумовлена суттєвим ($p < 0,05$) зниженням кількості як CD4⁺, так і CD8⁺-лімфоцитів. Крім того, виявлено підвищений ($p < 0,05$) відносний вміст Трег порівняно з аналогічним показником у ПЗЛ, як і в хворих контрольної групи на даному етапі дослідження.

Індукційний курс ІФН- $\alpha 2b$, проведений пацієнтам основної групи в неоад'ювантному режимі (2-й етап), не усунув вищезазначені порушення, за винятком відновлення вмісту Т-хелперів до рівня у ПЗЛ (див. табл. 3). Цей етап лікування характеризується значним зменшенням абсолютної кількості В1-клітин порівняно з подібним у ПЗЛ ($p < 0,05$), що також виявлено і у хворих контрольної групи після застосування аналогічної схеми інтерферонотерапії в ад'ювантному режимі (табл. 4).

На 3-му етапі дослідження (8-10-та доба після хірургічного лікування) у хворих основної групи — на відміну від пацієнтів контрольної — виявлено нівелювання порушень вмісту основних популяцій лімфоцитів. У складі Т-лімфоцитів відбувається перерозподіл серед субпопуляцій: відносний вміст Т-хелперів збільшується на тлі зниженого відносного вмісту цитотоксичних Т-клітин (їх кількість вірогідно нижча, ніж в контрольній групі), що позначається на імунорегуляторному індексі, значення якого перевищує показник в контрольній групі та у ПЗЛ ($p < 0,05$). При цьому зберігається підвищений рівень Трег у периферичній крові, а абсолютна кількість В1-клітин суттєво збільшується порівняно з попереднім значенням ($p < 0,05$).

На тлі застосування в ад'ювантному режимі підтримувального курсу ІФН- $\alpha 2b$ упродовж 3 міс у пацієнтів основної групи (4-й етап) виявлено істотне зниження ($p < 0,05$) абсолютної кількості Т-лімфоцитів та природних кілерних клітин відносно показників у ПЗЛ (див.

табл. 3). Серед субпопуляцій Т-лімфоцитів зберігаються вищезазначені зміни з боку вмісту CD8⁺-клітин та Трег. Відносна кількість В1-клітин значно збільшується порівняно з такою на попередніх етапах лікування та у ПЗЛ ($p < 0,05$).

Таким чином, проведення індукційного курсу ІФН- $\alpha 2b$ у хворих на ММРЛВ незалежно від схеми застосування (до або після хірургічного лікування) призводить до розвитку лейкоцитопенії за рахунок нейтрофілів та лімфоцитів. Відновлення вмісту лейкоцитів, зокрема лімфоцитів, після оперативного втручання відмічають лише на тлі неоад'ювантного застосування ІФН- $\alpha 2b$. Послідовне ад'ювантне застосування індукційного та підтримувального курсів інтерферонотерапії призводить до відновлення кількості лімфоцитів периферичної крові хворих на ММРЛВ до фізіологічної норми, але не усуває лімфоцитопенію. Натомість, проведення в ад'ювантному режимі підтримувального курсу ІФН- $\alpha 2b$ асоціюється з лейкоцитопенією при збереженні вмісту лімфоцитів на рівні ПЗЛ. Застосування підтримувального курсу інтерферонотерапії у хворих на ММРЛВ обох досліджуваних груп викликає зсув лейкоцитарної формули вліво.

Отже, обидві схеми інтерферонотерапії по-різному впливають на субпопуляційний склад Т-лімфоцитів периферичної крові у хворих на ММРЛВ. Застосування індукційного курсу ІФН- $\alpha 2b$ в ад'ювантному режимі не відновлює знижений вихідний вміст Т-лімфоцитів, але сприяє зменшенню кількості Трег. Натомість, застосування ІФН- $\alpha 2b$ в неоад'ювантному режимі запобігає розвитку Т-лімфоцитопенії після хірургічного втручання, проте не усуває підвищений вміст Трег.

Застосування індукційного курсу ІФН- $\alpha 2b$ у хворих обох досліджуваних груп призводить до зниження вмісту В1-клітин відносно таких у ПЗЛ. Послідовне застосування індукційного та підтримувального курсів інтерферонотерапії в ад'ювантному режимі

Таблиця 2 Зміни в лейкограмах у хворих на ММРЛВ основної групи в динаміці інтерферонотерапії

Гематологічні показники	Одиниці виміру	Хворі на ММРЛВ, етапи обстеження				ПЗЛ
		1	2	3	4	
Лейкоцити	· 10 ⁹ /л	4,9 (2,5; 7,6)	3,4 (2,5; 5,2)***	5,7 (3,6; 8,1)**	3,8 (2,8; 4,8)****	5,4 (4,5; 7,0)
Паличкоядерні нейтрофіли	%	2 (0; 11)	2 (0; 7,5)	1 (0; 6)	5,5 (2; 10)****	1,5 (0; 3,0)
	· 10 ⁹ /л	0,15 (0; 0,29)	0,06 (0; 0,36)	0,05 (0; 0,22)	0,18 (0,08; 0,48)****	0,08 (0; 0,16)
Сегментоядерні нейтрофіли	%	63 (42; 78)	52 (37; 69)*	62 (55; 66,5)	47 (44; 57)***	55,5 (42,5; 66,5)
	· 10 ⁹ /л	3,09 (1,09; 4,68)	1,73 (1,25; 2,96)*****	3,70 (1,98; 5,02)**	1,75 (1,32; 2,64)****	3,11 (1,95; 4,50)
Еозинофіли	%	1,5 (1; 4)	0,5 (0; 2)*****	1 (0; 6)	2 (0; 4,5)	2 (0; 5,5)
	· 10 ⁹ /л	0,05 (0,03; 0,26)	0,02 (0; 0,10)*****	0,07 (0; 0,32)	0,07 (0; 0,198)	0,12 (0; 0,29)
Базофіли	%	0,5 (0; 2)	0 (0; 1)*****	0 (0; 2)	0 (0; 1)	1 (0; 1,5)
	· 10 ⁹ /л	0,03 (0; 0,08)	0 (0; 0,05)****	0 (0; 0,07)****	0 (0; 0,04)****	0,05 (0; 0,10)
Моноцити	%	7 (4,5; 20,5)	8 (6,5; 19)****	7,5 (1; 14)	10 (8; 14)*****	7 (4,5; 9,0)
	· 10 ⁹ /л	0,33 (0,22; 0,53)	0,35 (0,22; 0,78)	0,49 (0,04; 0,83)	0,44 (0,22; 0,50)	0,33 (0,23; 0,54)
Великі гранулярні лімфоцити	%	2,5 (0,5; 7)	4,5 (1; 12)	3,5 (0,5; 6)	5 (3; 7)***	4 (1,5; 11)
	· 10 ⁹ /л	0,12 (0,03; 0,36)****	0,19 (0,03; 0,57)	0,16 (0,03; 0,4)	0,22 (0,11; 0,25)	0,24 (0,11; 0,50)
Лімфоцити	%	22,5 (11; 32)****	35 (22; 53)*	30 (19; 35)	34 (21; 38)	33,5 (21,5; 46)
	· 10 ⁹ /л	0,82 (0,59; 2,39)****	1,35 (0,66; 1,86)****	1,34 (0,76; 2,43)	1,22 (0,92; 1,39)	1,77 (1,17; 2,54)

*Розбіжність при порівнянні з показником до лікування статистично вірогідна ($p < 0,05$); **розбіжність при порівнянні з показником на 2-му етапі дослідження статистично вірогідна ($p < 0,05$); ***розбіжність при порівнянні з показником на 3-му етапі дослідження статистично вірогідна ($p < 0,05$); ****розбіжність при порівнянні з показником ПЗЛ статистично вірогідна ($p < 0,05$).

Таблиця 3 Зміни популяційного складу ЛПК у хворих на ММРЛВ основної групи в динаміці інтерферонотерапії

Імунологічні показники	Одиниці виміру	Хворі на ММРЛВ, етапи обстеження				ПЗЛ
		1	2	3	4	
CD3 ⁺	%	75 (56; 85)	74 (61; 86)	74 (60; 81)	75 (67; 83)	72 (63; 79)
	· 10 ⁹ /л	0,55 (0,49; 1,36)****	0,95 (0,40; 1,46)****	1,04 (0,56; 1,69)*	0,92 (0,62; 1,12)****	1,29 (0,82; 1,93)
CD19 ⁺	%	9 (2,3; 14,3)	4,8 (3; 9,8)	8,6 (4,1; 14)**^	10 (8; 14)**^	6,9 (4,1; 10,1)
	· 10 ⁹ /л	0,07 (0,02; 0,25)****	0,06 (0,04; 0,11)****	0,12 (0,03; 0,21)**	0,11 (0,10; 0,13)**	0,13 (0,08; 0,20)
CD4 ⁺	%	47 (34; 70)	46 (32; 67)	48 (35; 65)****	47 (43; 61)	42,5 (35; 48)
	· 10 ⁹ /л	0,43 (0,25; 0,89)****	0,50 (0,24; 0,89)	0,66 (0,27; 1,13)*	0,61 (0,40; 0,85)	0,71 (0,53; 1,06)
CD8 ⁺	%	25 (19; 40)	26 (17; 35)	22 (10; 28)****,***^	22 (21; 33)	30 (19; 40)
	· 10 ⁹ /л	0,27 (0,12; 0,57)****	0,28 (0,17; 0,54)****	0,29 (0,13; 0,61)****	0,28 (0,22; 0,43)****	0,54 (0,30; 0,79)
CD4/CD8	умовні одиниці	1,68 (0,88; 3,68)	1,72 (0,91; 3,53)	2,09 (1,25; 5,0)****,^	2,04 (1,42; 2,91)	1,4 (0,92; 2,47)
CD16 ⁺	%	15 (5; 26)	19 (8; 22)	19 (10; 27)	19 (11; 21)	20 (14; 32)
	· 10 ⁹ /л	0,14 (0,03; 0,48)****	0,20 (0,05; 0,41)****	0,24 (0,08; 0,63)	0,20 (0,15; 0,25)****	0,34 (0,24; 0,55)
CD4 ⁺ 25 ^{hi} 127 ^{low}	%	3,8 (2,1; 6,3)****	4 (3,3; 8,6)****	5 (3,4; 6,3)****	3,7 (2,9; 6,1)****	2,8 (1,9; 3,7)
	· 10 ⁹ /л	0,038 (0,012; 0,086)	0,058 (0,022; 0,083)	0,082 (0,026; 0,128)*	0,045 (0,027; 0,084)	0,046 (0,028; 0,085)
CD19 ⁺ 5 ⁺	%	3,3 (0,9; 6,9)	2,2 (1,0; 4,8)	2,6 (1,4; 7,1)	4,8 (4,0; 8,6)****,***,***^	2,8 (1,7; 4,2)
	· 10 ⁹ /л	0,037 (0,007; 0,109)	0,030 (0,014; 0,043)****	0,041 (0,01; 0,095)**	0,055 (0,051; 0,08)**	0,050 (0,030; 0,081)
CD19 ⁺ 5 ⁻	%	3,7 (1,1; 7,4)	3 (1,5; 6,7)	4,5 (2,3; 6,2)**	4,5 (4; 5,7)**	4,3 (2,2; 6,6)
	· 10 ⁹ /л	0,044 (0,010; 0,117)****	0,034 (0,022; 0,065)****	0,065 (0,02; 0,151)**	0,055 (0,052; 0,06)**	0,071 (0,042; 0,129)

*Розбіжність при порівнянні з показником до лікування статистично вірогідна (p<0,05); **розбіжність при порівнянні з показником на 2-му етапі дослідження статистично вірогідна (p<0,05); ***розбіжність при порівнянні з показником на 3-му етапі дослідження статистично вірогідна (p<0,05); ****розбіжність при порівнянні з показником ПЗЛ статистично вірогідна (p<0,05); ^розбіжність при порівнянні з показником в контрольній групі статистично вірогідна (p<0,05).

Таблиця 4 Зміни популяційного складу ЛПК у хворих на ММРЛВ контрольної групи в динаміці інтерферонотерапії

Імунологічні показники	Одиниці виміру	Хворі на ММРЛВ, етапи обстеження				ПЗЛ
		1	2	3	4	
CD3 ⁺	%	67,5 (60; 80)	67 (60; 81)	74 (57; 86)	84 (55; 83)	72 (63; 79)
	· 10 ⁹ /л	1,06 (0,50; 1,32)*	0,99 (0,35; 1,43)*	0,91 (0,65; 1,48)*	0,66 (0,63; 1,32)	1,29 (0,82; 1,93)
CD19 ⁺	%	4,9 (3,4; 19)	6,8 (3,4; 10,2)	5 (2,6; 8)	7,3 (6,1; 8,6)	6,9 (4,1; 10,1)
	· 10 ⁹ /л	0,09 (0,04; 0,26)	0,11 (0,02; 0,17)	0,09 (0,02; 0,11)*	0,10 (0,05; 0,11)	0,13 (0,08; 0,20)
CD4 ⁺	%	40,5 (33; 54)	44 (31; 51)	41 (30; 55)	46 (26; 56)	42,5 (35; 48)
	· 10 ⁹ /л	0,65 (0,31; 0,73)	0,66 (0,21; 0,99)	0,48 (0,37; 0,74)	0,43 (0,30; 0,76)	0,71 (0,53; 1,06)
CD8 ⁺	%	29,5 (17; 40)	27 (20; 35)	28 (21; 38)	27 (26; 40)	30 (19; 40)
	· 10 ⁹ /л	0,47 (0,13; 0,73)	0,33 (0,15; 0,67)	0,29 (0,26; 0,61)	0,42 (0,20; 0,46)	0,54 (0,30; 0,79)
CD4/CD8	умовні одиниці	1,35 (0,92; 2,45)	1,63 (1,06; 2,55)	1,40 (0,79; 2,62)	1,70 (0,65; 2,15)	1,4 (0,92; 2,47)
CD16 ⁺	%	25,5 (9; 40)	29 (12; 39)	18 (10; 45)	13 (7; 37)	20 (14; 32)
	· 10 ⁹ /л	0,36 (0,11; 0,63)	0,41 (0,05; 0,74)	0,22 (0,08; 0,72)	0,20 (0,05; 0,42)	0,34 (0,24; 0,55)
CD4 ⁺ 25 ^{hi} 127 ^{low}	%	4,5 (0,7; 9,8)*	4 (1,9; 7,9)*	2,3 (1,8; 5,6)	3,1 (0,5; 3,7)	2,8 (1,9; 3,7)
	· 10 ⁹ /л	0,061 (0,011; 0,093)	0,048 (0,011; 0,121)	0,030 (0,017; 0,101)	0,035 (0,004; 0,055)	0,046 (0,028; 0,085)
CD19 ⁺ 5 ⁺	%	2,5 (1,3; 10,1)	2,9 (1,5; 5,0)	1,4 (0,70; 2,9)*	2,3 (1,9; 3,3)	2,8 (1,7; 4,2)
	· 10 ⁹ /л	0,041 (0,015; 0,136)	0,037 (0,007; 0,072)	0,020 (0,005; 0,046)*	0,036 (0,015; 0,058)	0,050 (0,030; 0,081)
CD19 ⁺ 5 ⁻	%	2,6 (2,1; 8,9)	3,7 (1,9; 5,3)	3,1 (1,9; 4,2)	5 (4,2; 5,3)	4,3 (2,2; 6,6)
	· 10 ⁹ /л	0,049 (0,025; 0,120)	0,051 (0,008; 0,100)	0,047 (0,014; 0,069)	0,060 (0,033; 0,078)	0,071 (0,042; 0,129)

*Розбіжність при порівнянні з показником ПЗЛ статистично вірогідна (p<0,05).

призводить до відновлення популяційного та субпопуляційного складу лімфоцитів периферичної крові до меж фізіологічної норми. Підтримувальний курс ІФН-α2b, проведений в ад'ювантному режимі такої дії не спричиняє, зокрема не усуває підвищений вміст Трег та V1-клітин.

Які наслідки для пацієнтів стосовно перебігу пухлинного процесу та прогнозу захворювання матимуть описані вище зміни в імунореактивності організму, буде з'ясовано після клінічної оцінки ефективності досліджуваних схем інтерферонотерапії. Проте одне залишається очевидним: в умовах інвазії пухлини в лімфоїдну тканину імунна система хворих реагує по-різному залежно від застосованої схеми лікування.

ВИСНОВКИ

1. Індукційний курс ІФН-α2b незалежно від схеми застосування (до або після хірургічного лікування) супроводжується розвитком лейкоцитопенії безпосередньо після його закінчення; у разі застосування цього курсу в неoad'ювантному режимі вміст лейкоцитів та лімфоцитів в перифе-

ричній крові хворих відновлюється після оперативного втручання.

2. Неoad'ювантне застосування індукційного курсу ІФН-α2b сприяє відновленню після хірургічного лікування кількості Т-лімфоцитів в периферичній крові до фізіологічної норми, але не усуває підвищений вміст Трег. Аналогічний курс інтерферонотерапії в ад'ювантному режимі не відновлює знижений вміст Т-лімфоцитів, проте сприяє зменшенню рівня Трег в циркуляції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Федоренко З.П., Гайсенко А.В., Гулак Л.О. та ін. (2011) Рак в Україні, 2009–2010. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюл. Національного канцер-реєстру України. К., 12: 118 с.
2. Kirkwood J.M., Tarhini A.A., Moschos S.J. et al. (2008) Adjuvant therapy with high-dose interferon alpha 2b in patients with high-risk stage IIB/III melanoma. Nat. Clin. Pract. Oncol., 5(1): 2–3.
3. Keilholz U., Punt C.J., Gore M. et al. (2005) Dacarbazine, cisplatin and interferon-α-2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: a randomized Phase III trial (18951) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. J. Clin. Oncol., 23: 6747–6755.
4. Eton O., Legha S.S., Bedikian A.Y. et al. (2002) Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: results from a Phase III randomized trial. J. Clin. Oncol., 20: 2045–2052.

5. Atkins M.B., Lee S., Flaherty L.E. et al. (2003) A prospective randomized Phase III trial of concurrent biochemotherapy (BCT) with cisplatin, vinblastine, dacarbazine (CVD), IL-2 and interferon alpha-2b (IFN) versus CVD alone in patients with metastatic melanoma (E3695). An ECOG-coordinated intergroup trial. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 22: 708.
6. Абрамов М.Е., Гуторов С.Л., Славина Е.Г. и др. (2009) Химиотерапия диссеминированной меланомы кожи с включением интарона. Клинико-иммунологические исследования. Рос. биотер. журн., 8(1): 64–74.
7. Фильчаков Ф.В., Шуміліна К.С., Льон Г.Д. та ін. (2011) Вплив різних схем інтерферонотерапії на функціональну активність лімфоцитів у хворих на меланому шкіри. Імунологія та алергологія, 2: 120–125.
8. Stergios J., Moschos, Howard D. et al. (2006) Neoadjuvant Treatment of Regional Stage IIB Melanoma With High-Dose Interferon Alfa-2b Induces Objective Tumor Regression in Association With Modulation of Tumor Infiltrating Host Cellular Immune Responses. J. of Clin. Oncol., 24(19): 3164–3171.
9. Фильчаков Ф.В., Кукушкіна С.М., Шуміліна К.С. та ін. (2011) Особливості імунного статусу у хворих на меланому шкіри на різних стадіях пухлинного процесу. Клиническая онкология, 2(2): 36–40.
10. Руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 ч. (1982) Под ред. Базарновой М.А. 2-я-ч.: 175 с.
11. Пинегин Б.В., Ярилин А.А., Симонова А.В. и др. (2001) Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. Пособие для врачей-лаборантов. М., 55 с.
12. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение (2008) Под ред. С.В. Хайдукова, А.В. Зурочки. Челябинск, 195 с.
13. Liu W., Putman A.L., Xu-Yu Z. et al. (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and

suppressive function of human CD4⁺Treg cells. J. Exp. Med., 203(7): 1700–1711.

14. Seddiki N., Santner-Nanan B., Martison J. et al. (2006) Expression of interleukin(IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. J. Exp. Med., 203(7): 1693–1700.

15. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян А.А. и др. (2009) Основные и малые популяции лимфоцитов пери-

ферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа). Мед. иммунол., 11(2–3): 227–238.

16. Хайдуков С.В. (2007) Подходы к стандартизации метода проточной цитометрии для иммунофенотипирования. Настройка цитометров и подготовка протоколов для анализа. Мед. иммунол., 9(6): 569–574.

17. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. (2001) Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. К.: Морион, 408 с.

18. Мінцер О.П., Вороненко Ю.В., Власов В.В. (2003) Оброблення клінічних і експериментальних даних у медицині. Кн. 5: Навч. посіб. Інформаційні технології в охороні здоров'я і практичній медицині: У 10 кн. За ред. О.П. Мінцера. К.: Вища школа, 350 с.

Особенности иммунореактивности организма больных меланомой кожи с метастазами в регионарные лимфатические узлы в условиях действия различных схем интерферонотерапии

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

Национальный институт рака, Киев

Резюме. Проведен многопараметрический иммунологический мониторинг 27 больных с гистологически подтвержденным диагнозом меланомы кожи с метастазами в регионарные лимфатические узлы IIIB–IIIC стадии в динамике комбинированного лечения с использованием различных схем интерферонотерапии. Установлено, что индукционный курс интерферона $\alpha 2b$ (ИФН- $\alpha 2b$) независимо от схемы применения (до или после хирургического лечения) сопровождается развитием лейкоцитопении непосредственно после его окончания; в случае применения этого курса в неoadъювантном режиме содержание лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови больных восстанавливается после оперативного вмешательства. Неoadъювантное применение индукционного курса ИФН- $\alpha 2b$ способствует восстановлению после хирургического лечения количества Т-лимфоцитов в периферической крови до физиологической нормы, но не устраняет повышенное содержание Трег. Аналогичный курс интерферонотерапии в адъювантном режиме не восстанавливает сниженное содержание Т-лимфоцитов, однако способствует уменьшению уровня Трег в циркуляции.

Ключевые слова: меланома кожи, интерферонотерапия, иммунный статус.

Immunoreactivity variety of patients with regional lymph node metastatic skin melanoma treated by different immunotherapy scheme

F.V. Fil'chakov, K.S. Shumilina, S.M. Kukushkina, A.D. Lon, S.I. Korovin, M.M. Kukushkina

National cancer institute, Kyiv

Summary. A multiparameter immunological monitoring of 27 patients with histopathologically confirmed regional lymph node metastatic skin melanoma stage IIIB–IIIC in the dynamics of combined treatment using different schemes interferon therapy was conducted. It was found that the induction course of interferon $\alpha 2b$ (IFN- $\alpha 2b$), regardless of administration scheme (before or after surgery) conducts leukocytopenia just after such course completion; neoadjuvant use of this course leads to leukocytes and lymphocytes amount regeneration in the peripheral blood of patients recovering from surgery. Neoadjuvant induction course IFN- $\alpha 2b$ after surgical treatment stimulates T-lymphocytes number recovery in the peripheral blood up to the physiological norm, but does not eliminate the increased content of Treg. A similar course of interferon in the adjuvant setting mode does not restore the reduced T lymphocytes number, but helps to reduce the Treg level in circulation.

Key words: skin melanoma, interferon therapy, the immune system status.