

VILNIUS UNIVERSITY  
STATE RESEARCH INSTITUTE CENTER FOR INNOVATIVE MEDICINE

Marius Strioga

**EXPRESSION OF BIOMARKERS, REPRESENTING  
IMMUNOSUPPRESSIVE, CYTOTOXIC OR IMMUNOMODULATING  
PROPERTIES OF CD8<sup>h</sup> T LYMPHOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD OF  
PATIENTS WITH IMMUNOGENIC CANCER FORMS**

Summary of doctoral dissertation

Biomedical sciences, Biology (01B), immunology, serology transplantation (B500)

Vilnius, 2010

Dissertation was prepared at State Research Institute Center for Innovative Medicine and Institute of Oncology, Vilnius University over the period of 2005-2009.

**Scientific Supervisor:**

Dr. Dainius Characiejus (State Research Institute Center for Innovative Medicine, biology - 01B, immunology, serology, transplantation – B500)

**Dissertation will be defended at the Biological Sciences Council of Vilnius University:**

**Chairman:**

Prof. dr. habil. Vytas Antanas Tamošiūnas (State Research Institute Center for Innovative Medicine, biomedical sciences, biology - 01B, immunology, serology, transplantation – B500)

**Members:**

Prof. dr. Feliksas Jankevičius (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 07B, cytology, oncology, cancerology – B200)

Prof. dr. Brigita Šitkauskienė (Kaunas University of Medicine, biomedical sciences, medicine – 07B, immunology, serology, transplantation – B500)

Dr. Kęstutis Sužiedėlis (Institute of Oncology, Vilnius University, biomedical sciences, biology - 01B, cytology, oncology, cancerology – B200)

Dr. Mykolas Mauricas (State Research Institute Center for Innovative Medicine, biology - 01B, immunology, serology, transplantation – B500)

**Official opponents:**

Prof. dr. Laima Ivanovienė (Kaunas University of Medicine, biomedical sciences, biology – 01B, clinical chemistry – B190)

Dr. Audronė Eidukaitė (State Research Institute Center for Innovative Medicine, biomedical sciences, biology – 01B, immunology, serology, transplantation – B500)

The public defence of the dissertation will be held at the Biological Sciences Council of Vilnius University at the auditorium of the Department of Immunology, State Research Institute Center for Innovative Medicine at 3 p.m. on 1 of July, 2010.

Address: Molėtų pl. 29, LT-08409, Vilnius, Lithuania

The summary of the doctoral dissertation was sent on 31 of May, 2010.

The dissertation is available in the libraries of: **1.** Vilnius University, **2.** Department of Immunology, State Research Institute Center for Innovative Medicine, **3.** Oncology Institute, Vilnius University.

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
VALSTYBINIS MOKSLINIŲ TYRIMŲ INSTITUTAS  
INOVATYVIOS MEDICINOS CENTRAS

Marius Strioga

**IMUNOSUPRESINES, CITOTOKSINES BEI IMUNOMODULIUOJANČIAS  
SAVYBES ATSPINDINČIŲ ŽYMENŲ RAIŠKA IMUNOGENIŠKOMIS VĖŽIO  
FORMOMIS SERGANČIŲ LIGONIŲ PERIFERINIO KRAUJO CD8<sup>h</sup> T  
LIMFOCITŲ POPULIACIJOJE**

Daktaro disertacijos santrauka

Biomedicinos mokslai, biologija (01B), imunologija, serologija, transplantacija (B500)

Vilnius, 2010

Disertacija rengta 2005-2009 metais Vilniaus universiteto Imunologijos institute (dabartiniame VMTĮ Inovatyvios medicinos centre) ir Vilniaus universiteto Onkologijos institute.

**Mokslinis vadovas:**

Dr. Dainius Characiejus (VMTĮ Inovatyvios medicinos centras, biomedicinos mokslai, biologija - 01B, imunologija, serologija, transplantacija – B500)

**Disertacija ginama Vilniaus universiteto Biologijos mokslo krypties taryboje:**

**Pirmininkas:**

Prof. habil. dr. Vytas Antanas Tamošiūnas (VMTĮ Inovatyvios medicinos centras, biomedicinos mokslai, biologija - 01B, imunologija, serologija, transplantacija – B500)

**Nariai:**

Prof. dr. Feliksas Jankevičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B, citologija, onkologija, kancerologija – B200)

Prof. dr. Brigita Šitkauskienė (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B, imunologija, serologija, transplantacija – B500)

Dr. Kęstutis Sužiedėlis (Vilniaus universiteto Onkologijos institutas, biomedicinos mokslai, biologija - 01B, citologija, onkologija, kancerologija – B200)

Dr. Mykolas Mauricas (VMTĮ Inovatyvios medicinos centras, biomedicinos mokslai, biologija - 01B, imunologija, serologija, transplantacija – B500)

**Oficialieji oponentai:**

Prof. dr. Laima Ivanovienė (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B, klinikinė chemija – B190)

Dr. Audronė Eidukaitė (VMTĮ Inovatyvios medicinos centras, biomedicinos mokslai, biologija – 01B, imunologija, serologija, transplantacija – B500)

Disertacija bus ginama viešame Biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2010 m. liepos mėn. 1 d. 15 val. VMTĮ Inovatyvios medicinos centro Imunologijos departamento auditorijoje.

Adresas: Molėtų pl. 29, LT-08409, Vilnius, Lietuva

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2010 metų gegužės 31-ą dieną.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto, VMTĮ Inovatyvios medicinos centro Imunologijos departamento ir Vilniaus universiteto Onkologijos instituto bibliotekoje.

## 1. INTRODUCTION

Since one of the main functions of the immune system is to recognize and destroy tumor cells (1), various approaches, enabling to promote and enhance antitumor immune response have been introduced into clinical practice (2). Current antitumor immunotherapy strategies are designed to activate immune response, but taking into mind that malignancy may be associated with expansion of immunosuppressive components (3), it is likely that in such cases activation of the immune system will further enhance activity of these components, leading to more severe suppression of antitumor immunity thus making more favourable conditions for tumor progression.

Hence, it is likely that antitumor immunotherapy may be effective only when its prescription is based on immune system parameters, reflecting the nature of antitumor immune response. Hardly ever it will possible to assess all parameters of closely interacting mechanisms of antitumor immunity, so it is important to identify such immune system components, which would reflect the nature of antitumor immune response as accurately as possible.

One of these components may be  $CD8^hCD57^+$  T-cell subpopulation, which expansion is associated with chronic antigenic stimulation, including tumor pathology (4).

Various authors describe different effector functions of the  $CD8^hCD57^+$  T-cell subpopulation (5-9). There is evidence that  $CD8^hCD57^+$  T lymphocytes may express perforin and granzymes and show highly cytotoxic properties (5), as well as they may secrete large amounts of cytokine interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (6), which has dual effect on tumor cells – direct cytotoxic (7) and indirect through the promotion of non-specific and specific components of antitumor immunity (8). It is also known that some  $CD8^hCD57^+$  T lymphocytes express FOXP3 and show immunosuppressive activity (9). FOXP3 molecule is regarded as one of the main biomarkers representing immunosuppressive properties of T cells (10).

Considering the heterogeneity of the  $CD8^hCD57^+$  T-cell subpopulation it appears that quantitative evaluation of general  $CD8^hCD57^+$  T-cell subpopulation in the peripheral blood of cancer patients would not disclose the nature of antitumor immune response. It is necessary to assess the percentage of various functionally competing T-cell subsets in the  $CD8^hCD57^+$  T-cell subpopulation.

## **2. THE AIM OF THE STUDY**

The aim of the study was to evaluate the expression of immunosuppressive and cytotoxic or immunomodulating T-cell properties representing biomarkers in the peripheral blood CD8<sup>h</sup> T-cell population of patients with advanced renal cell carcinoma (RCC) or high-risk cutaneous melanoma and healthy controls.

## **3. OBJECTIVES**

- 1.** To explore differences of CD8<sup>+</sup> T-cell concentration in the peripheral blood of patients with advanced RCC or high-risk melanoma and healthy controls.
- 2.** To investigate quantitative differences of CD8<sup>h</sup> T-cell subpopulations (CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>, CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup>, CD8<sup>low</sup>) in the peripheral blood of patients with advanced RCC or high-risk melanoma and healthy controls.
- 3.** To investigate the expression of FOXP3, NKG2A, perforin and IFN $\gamma$  in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> and CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulations of patients with advanced RCC or high-risk melanoma and healthy controls.

## **4. DEFENDED STATEMENTS**

- 1.** There are no significant differences in the concentration of peripheral blood CD8<sup>+</sup> T cells between patients with advanced RCC or high-risk melanoma and healthy controls, but inner rearrangements within the CD8<sup>+</sup> T-cell population are observed with the significant increase of the percentage of CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation in cancer patients.
- 2.** The key differences in the expression of immunosuppressive and cytotoxic or immunomodulating T-cell properties reflecting biomarkers are observed in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation of patients with advanced RCC or high-risk melanoma.

3. Patients with advanced RCC or high-risk melanoma can be divided into groups by the expression of immunosuppressive and cytotoxic or immunomodulating T-cell properties representing biomarkers: in some patients the expression of these biomarkers is significantly increased when compared to healthy controls, while in other patients the expression of the aforesaid markers shows no differences or they are minor when compared to healthy controls.
4. There is no correlation between the expression of immunosuppressive and cytotoxic or immunomodulating T-cell properties representing biomarkers in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation of patients with advanced RCC or high-risk melanoma. It means that the expression of these biomarkers is mutually independent.

## **5. SCIENTIFIC NOVELTY**

For the first time, a comprehensive assessment of the differences in the expression of immunosuppressive and cytotoxic or immunomodulating T-cell properties representing biomarkers in the peripheral blood CD8<sup>h</sup> T-cell subpopulation was performed in patients with immunogenic cancer forms and healthy controls.

As it has been found that substantial differences in the expression of these biomarkers were confined precisely to the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation, evaluation of the quantitative changes of the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation and its subsets in the peripheral blood of cancer patients may serve as one of immunological parameters enabling to individualize antitumor immunotherapy in future.

## **6. PATIENTS AND METHODS**

Fifty three cancer patients and 26 healthy controls were enrolled in the study during the period 2007-2009. Among cancer patients 31 were affected with locally or distantly advanced clear cell renal cell carcinoma (RCC) and 22 with high-risk cutaneous melanoma (the latter patients had melanoma metastases to regional lymph nodes, which were removed surgically).

All patients were treated at the Institute of Oncology, Vilnius University.

Both malignancies were proved histologically.

All cancer patients have never been treated with chemotherapy, radiotherapy or immunotherapy.

Control group included individuals without history of any oncological disease.

All participants (cancer patients and controls) were not affected with autoimmune diseases, acute or chronic infections, chronic alcoholism, severe mental diseases, also they had no history of bone marrow stem cell transplantation or allogeneic solid organ transplantation.

The study was approved by local bioethical committee and all individuals included in this study provided their informed written consent.

Peripheral blood samples were collected once from each participant: for cancer patients blood samples were taken on the 5<sup>th</sup> -7<sup>th</sup> day after surgical intervention (partial or total nephrectomy, biopsy or *a. renalis* embolization for RCC patients and complete excision of the primary tumor with regional lymphadenectomy for melanoma patients).

Age-matched healthy control group subjects were enrolled in the study during their annual preventive medical examination.

The main characteristics of the participants are presented in Table 1.

The analysis of peripheral blood T cells was performed using flow cytometry.

Statistical analysis of the data was performed using STATISTICA programme, version 7. Distribution of the data was evaluated using Shapiro-Wilk's *W*-test.

If the data distribution was parametric, the statistical significance of the differences between groups was evaluated by Student's *t*-test.

If the data distribution was non-parametric, the statistical significance of the differences between groups was evaluated by Mann-Whitney's *U*-test.

The correlation between variables was assessed by Spearman's rank correlation coefficient ( $r_s$ ). The correlation relationship was rated as *weak*, if  $r_s$  was 0,01-0,29, *medium*, if  $r_s$  was 0,3-0,69 and *strong*, if  $r_s$  was 0,7-0,99.

The statistical significance of the data differences within groups was evaluated by Wilcoxon's criterion.

*p* values less than 0,05 were considered significant.



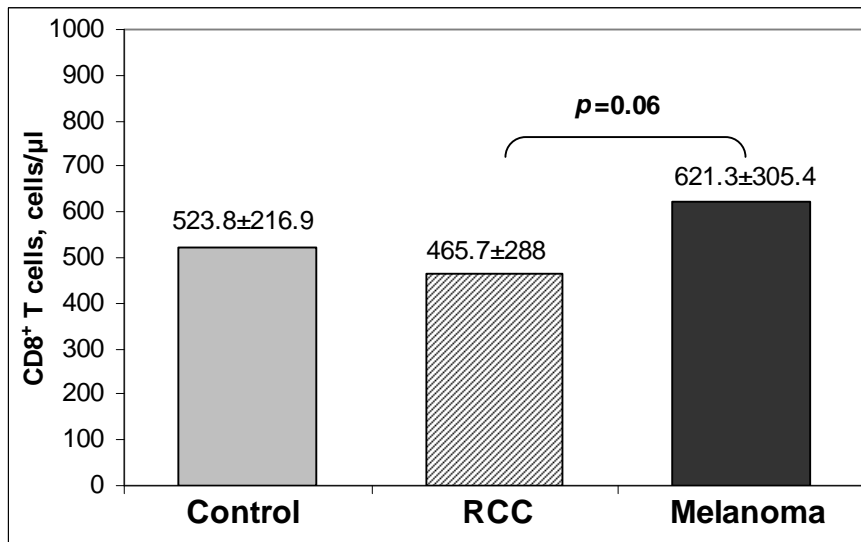
**Table 1. Characteristics of cancer patients and healthy controls**

Charakteristics	Count
<b>HEALTHY CONTROLS</b>	26
<i>Gender:</i>	
males	11
females	15
<i>Age (years):</i>	
<b>Median</b>	54,5
<b>Average</b>	56
<b>Range</b>	41-81
<b>ADVANCED RCC PATIENTS</b>	31
<i>Gender:</i>	
males	27
females	4
<i>Age (years):</i>	
<b>Median</b>	57
<b>Average</b>	60
<b>Range</b>	42-81
<b>HIGH-RISK MELANOMA PATIENTS</b>	22
<i>Gender:</i>	
males	12
females	10
<i>Age (years):</i>	
<b>Median</b>	67
<b>Average</b>	65
<b>Range</b>	40-86

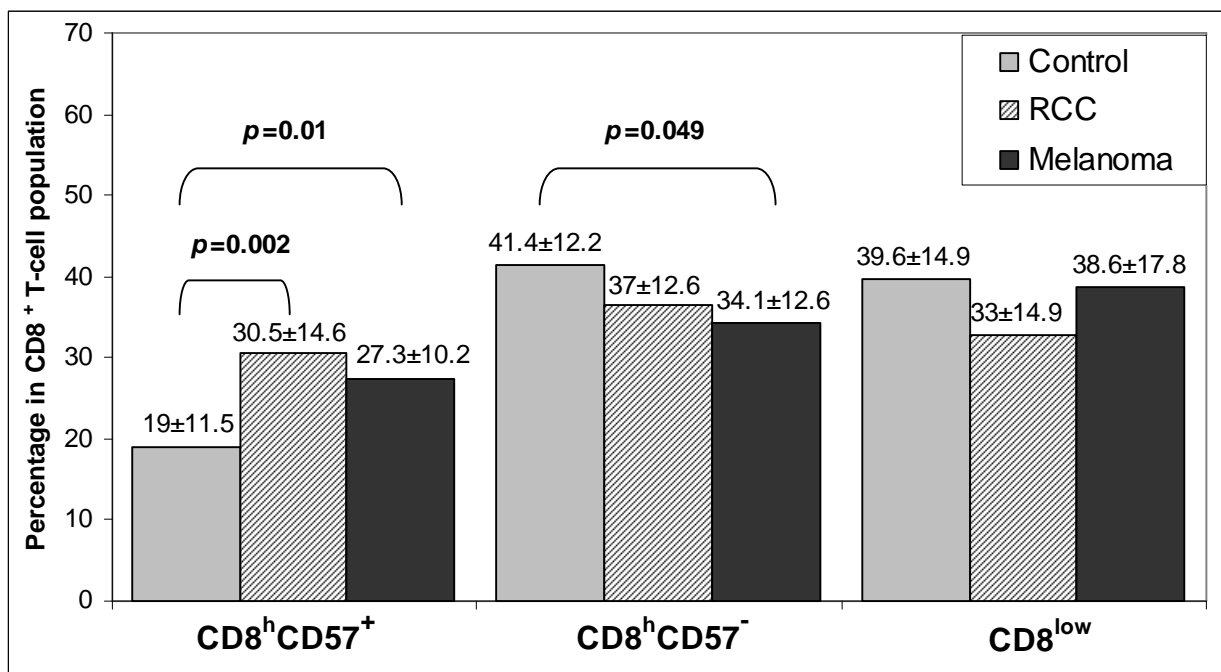
## 7. RESULTS

### *Quantitative differences of CD8<sup>+</sup> T-cell population and its subpopulations in the peripheral blood of cancer patients and healthy controls*

It was found that absolute counts (concentration) of CD8<sup>+</sup> T cells showed no significant differences between RCC patients, melanoma patients and healthy controls (Fig. 1), but quantitative changes of various CD8<sup>+</sup> T-cell subpopulations were observed with significant increase of the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation in advanced RCC and high-risk melanoma patients when compared to healthy controls (Fig. 2).



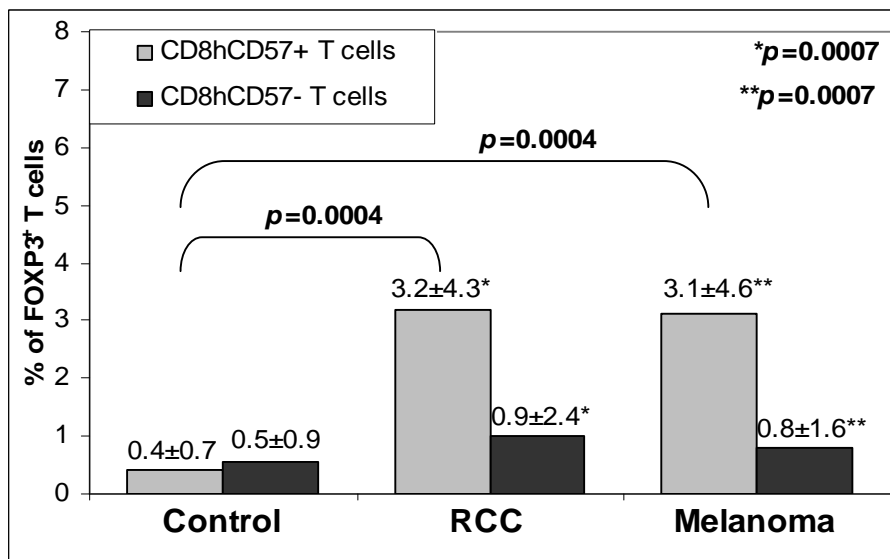
**Figure 1.** Absolute counts (concentration) of CD8<sup>+</sup> T-cells in the peripheral blood of healthy controls (n=26), advanced renal cell carcinoma patients (n = 31) and high-risk melanoma patients (n = 22) (t test)



**Figure 2.** Quantitative rearrangements of various CD8<sup>+</sup> T-cell subpopulations in the peripheral blood of healthy controls (n = 26), advanced renal cell carcinoma patients (n = 31) and high-risk melanoma patients (n = 22) (t test)

*Expression of FOXP3 in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> and CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulations of cancer patients and healthy controls*

It was found that the mean percentage of the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-cell subset in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation was significantly increased in advanced RCC and high-risk melanoma patients when compared to healthy controls (Fig. 3). Furthermore, the increase was almost equal in both cancer patient groups.



**Figure 3.** *Expression of FOXP3 in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> and CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulations of healthy controls (n = 26), advanced renal cell carcinoma patients (n = 31) and high-risk melanoma patients (n = 22) (U test)*

Both cancer patients and healthy controls could be divided into groups according to the percentage of the immunosuppressive CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-cell subset (Table 2).

**Table 2.** *Grouping of cancer patients and healthy controls according to the percentage of the immunosuppressive CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-cell subset in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation*

% of CD8 <sup>h</sup> CD57 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> T-cell subset in CD8 <sup>h</sup> CD57 <sup>+</sup> T-cell subpopulation	Healthy controls (n = 26)	RCC patients (n = 31)	Melanoma patients (n = 22)
0 (absent)	n = 17 (65,4 %)	n = 7 (22,6 %)	n = 4 (18,2 %)
0.01-1 (low)	n = 4 (15,4 %)	n = 6 (19,3 %)	n = 6 (27,3 %)
1.01-2 (medium)	n = 5 (19,2 %)	n = 5 (16,1 %)	n = 3 (13,6 %)
> 2 (2-20.5) - high	n = 0 (0 %)	n = 13 (42 %)	n = 9 (40,9 %)

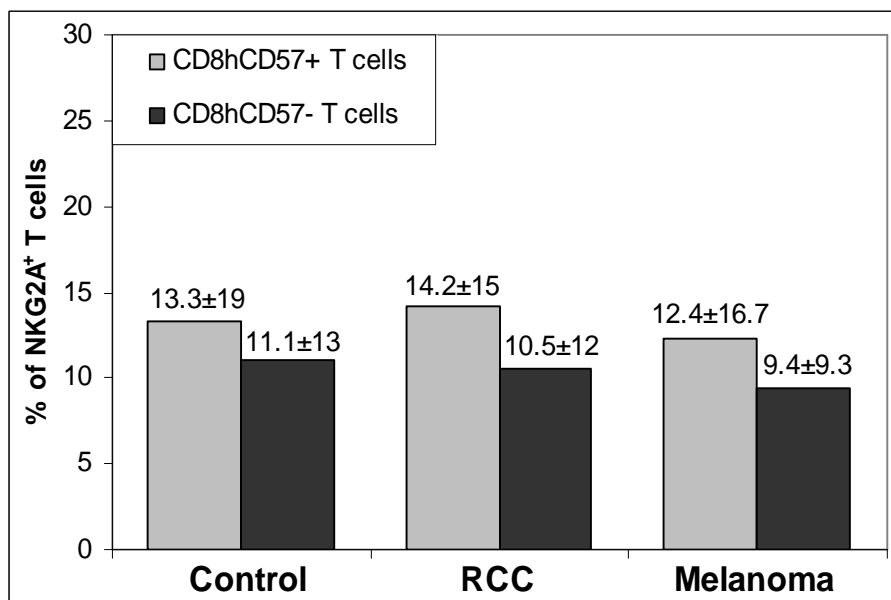
All subjects were divided into these groups according to the percentage of FOXP3<sup>+</sup> T cells in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation of healthy controls, assuming that it represents the normal value range.

It was also found that in healthy controls the percentage of FOXP3 expressing T cells was slightly greater in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell population when compared to CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T cells, while in cancer patients the increase of FOXP3 expression was obviously preferential for the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation (Fig. 3).

We have not found any significant differences in FOXP3 expression in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulation between cancer patients and healthy controls (Fig. 3).

*Expression of NKG2A (CD159a) in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> and CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulations of cancer patients and healthy controls*

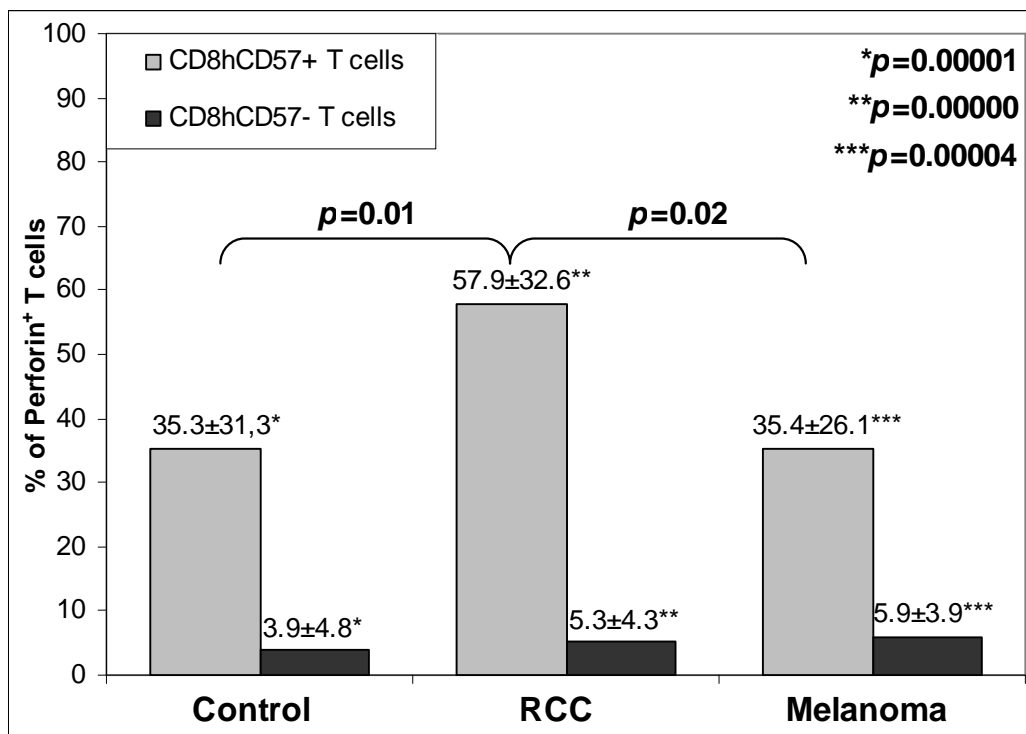
We have not found any significant differences in the mean percentage of NKG2A expression in both CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> and CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulations between advanced RCC or high-risk melanoma patients and healthy controls (Fig. 4).



**Figure 4.** *Expression of NKG2A in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> and CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulations of healthy controls (n = 26), advanced renal cell carcinoma patients (n = 31) and high-risk melanoma patients (n = 22) (U test)*

*Expression of perforin in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> and CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulations of cancer patients and healthy controls*

The CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> T-cell subset in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation was significantly increased in advanced RCC patients when compared to healthy controls, while expansion of this cytotoxic subset in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation was not observed in high-risk melanoma patients (Fig. 5).



**Figure 5.** *Expression of perforin in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> and CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulations of healthy controls (n = 26), advanced renal cell carcinoma patients (n = 31) and high-risk melanoma patients (n = 22) (U test)*

It also should be noted that perforin was preferentially expressed in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation when compared to the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulation both in cancer patients and healthy controls (Fig. 5).

Both cancer patients and healthy controls could be divided into groups according to the percentage of the cytotoxic CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> T-cell subset in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation (Table 3).

**Table 3. Grouping of cancer patients and healthy controls according to the percentage of the cytotoxic CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> T-cell subset in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation**

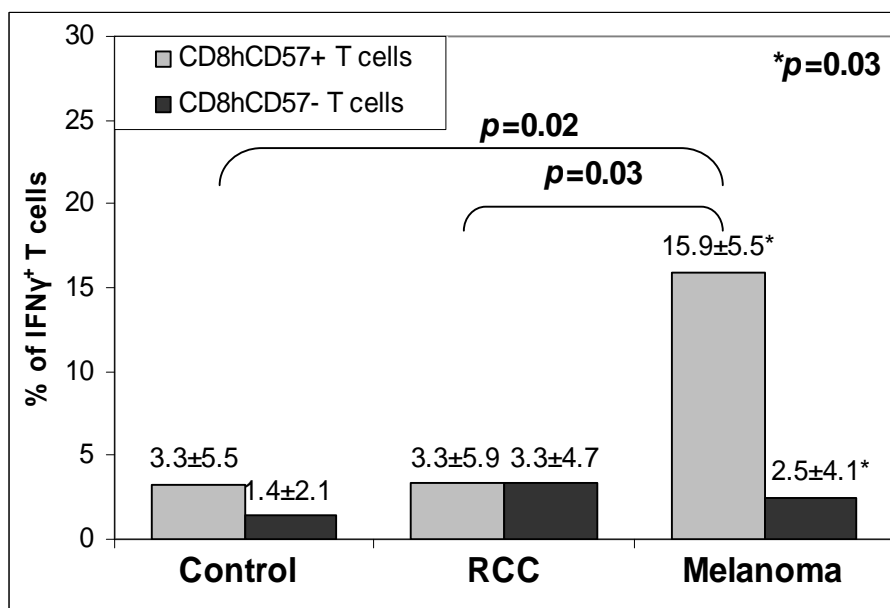
% of CD8 <sup>h</sup> CD57 <sup>+</sup> Perf <sup>+</sup> T-cell subset in CD8 <sup>h</sup> CD57 <sup>+</sup> T-cell subpopulation	Healthy controls (n = 26)	RCC patients (n = 31)	Melanoma patients (n = 22)
≤ 13,74 (low)	n = 12 (46,1 %)	n = 6 (19,3 %)	n = 5 (22,7 %)
13,75-55,55 (intermediate)	n = 6 (23,1 %)	n = 7 (22,6 %)	n = 13 (59,1 %)
55,56-84,74 (high)	n = 6 (23,1 %)	n = 10 (32,3 %)	n = 2 (9.1 %)
> 84,74 (very high)	n = 2 (7,7 %)	n = 8 (25,8 %)	n = 2 (9.1 %)

All subjects were divided into these groups according to the percentage of perforin expressing T cells in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation of healthy controls, assuming that it represents the normal value range.

There were no significant differences in the expression of perforin in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation between cancer patients and healthy controls (Fig. 5).

*Expression of intracellular IFN $\gamma$  in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> and CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulations of cancer patients and healthy controls*

We have found that IFN $\gamma$  expression was significantly increased in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation of high-risk melanoma, but not of advanced RCC patients, when compared to healthy controls (Fig. 6). By the way, in advanced RCC patients IFN $\gamma$  expression was almost equal in both CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> and CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulations while in high-risk melanoma patients intracellular IFN $\gamma$  was preferentially expressed in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation (Fig. 6).



**Figure 6.** Expression of intracellular IFN $\gamma$  in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> and CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulations of healthy controls (n = 22), advanced renal cell carcinoma patients (n = 21) and high-risk melanoma patients (n = 16) (U test)

Both cancer patients and healthy controls could be divided into groups according to the percentage of the cytotoxic / immunomodulating CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-cell subset in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation (Table 4).

**Table 4.** Grouping of cancer patients and healthy controls according to the percentage of the cytotoxic / immunomodulating CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-cell subset in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation

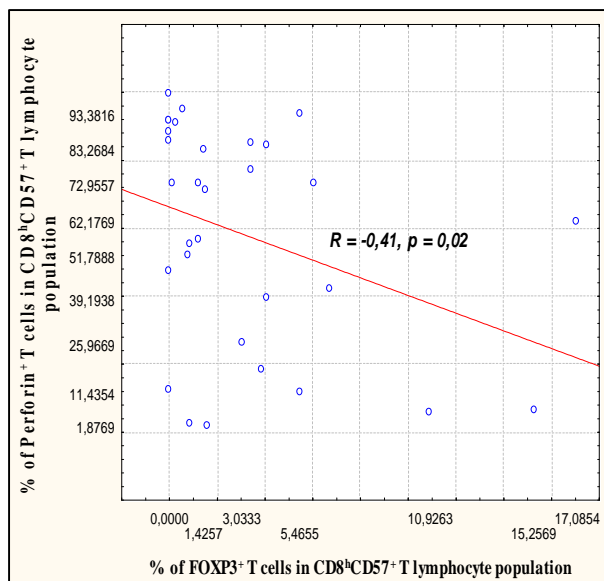
% of CD8 <sup>h</sup> CD57 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-cell subset in CD8 <sup>h</sup> CD57 <sup>+</sup> T-cell subpopulation	Healthy controls (n = 22)	RCC patients (n = 21)	Melanoma patients (n = 16)
0 (absent)	n = 11 (50 %)	n = 8 (38 %)	n = 3 (18,75 %)
0,1-10 (low)	n = 9 (40,9 %)	n = 11 (52,4 %)	n = 7 (43,75 %)
10,1-23 (intermediate)	n = 2 (9,1 %)	n = 1 (4,8 %)	n = 3 (18,75 %)
> 23 (high)	0 (0 %)	n = 1 (4,8 %)	n = 3 (18,75 %)

All subjects were divided into these groups according to the percentage of IFN $\gamma$  expressing T cells in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation of healthy controls, assuming that it represents the normal value range.

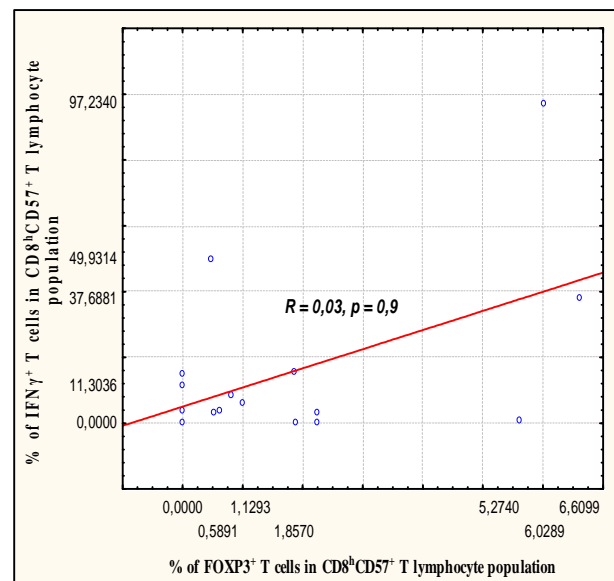
There were no significant differences in the expression of IFN $\gamma$  in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulation between cancer patients and healthy controls (Fig. 6).

*Correlation between the expression of immunosuppressive and cytotoxic or immunomodulating properties representing biomarkers in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation of patients with advanced renal cell carcinoma or high-risk melanoma*

There is no strong and biologically significant correlation between the expression of FOXP3 (immunosuppressive properties representing biomarker) and perforin (cytotoxic properties representing biomarker) in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell population of patients with advanced RCC (Fig. 7). Also there is no correlation between the expression of FOXP3 and IFN $\gamma$  (cytotoxic / immunomodulating properties reflecting biomarker) in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation of high-risk melanoma patients (Fig. 8). Thus, the expansion of the immunosuppressive and tumor-attacking (cytotoxic or cytotoxic / immunomodulating) subsets of the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation is independent and individual for each patient.



**Figure 7.** Correlation between FOXP3 and perforin expression in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation of advanced RCC patients (n = 31)



**Figure 8.** Correlation between FOXP3 and IFN $\gamma$  expression in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation of high-risk melanoma patients (n = 16)

In advanced RCC patient group there were 5 subjects who had very high percentage (> 84,74 %) of the cytotoxic CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> T-cell subset in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation, while the immunosuppressive CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-cell subset was absent (Table 5).



**Table 5. Percentage of FOXP3 or perforin expressing T cells in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation of advanced RCC patients**

Patient code	Percentage of FOXP3 <sup>+</sup> T cells in CD8 <sup>h</sup> CD57 <sup>+</sup> T-cell subpopulation	Percentage of Perforin <sup>+</sup> T cells in CD8 <sup>h</sup> CD57 <sup>+</sup> T-cell subpopulation
GAD	0,85 (low)	55,4 (intermediate)
BAR	3,03 (high)	25,97 (intermediate)
<b>BAC</b>	<b>0 (absent)</b>	<b>99,58 (very high)</b>
ZAB	1,53 (intermediate)	71,22 (high)
KAR	6,06 (high)	73,21 (high)
ELJ	0,25 (low)	90,62 (very high)
DOM	0 (absent)	12,43 (low)
ABL	1,19 (intermediate)	72,98 (high)
<b>MIL</b>	<b>0 (absent)</b>	<b>85,85 (very high)</b>
VEG	4,04 (high)	39,19 (intermediate)
OKU	3,4 (high)	84,70 (high)
<b>MOT</b>	<b>0 (absent)</b>	<b>91,82 (very high)</b>
SAV	0 (absent)	47,27 (intermediate)
<b>TICH</b>	<b>0 (absent)</b>	<b>91,70 (very high)</b>
JAK	0,16 (low)	72,96 (high)
BAL	4,09 (high)	84,10 (high)
<b>MALV</b>	<b>0 (absent)</b>	<b>88,28 (very high)</b>
GEL	3,46 (high)	77,17 (high)
SAK	0,77 (low)	51,79 (intermediate)
SUT	15,26 (high)	6,32 (low)
SIM	0,54 (low)	94,97 (very high)
KAU	1,23 (intermediate)	56,62 (high)
MALM	10,93 (high)	5,63 (low)
SUR	0,85 (low)	2,60 (low)
OZA	1,55 (intermediate)	1,88 (low)
KIS	1,43 (intermediate)	83,27 (high)
MAR	17,09 (high)	62,18 (high)
VAL	5,5 (high)	11,44 (low)
SAL	3,89 (high)	18,45 (intermediate)
PET	5,47 (high)	93,38 (very high)
VEN	6,72 (high)	42,06 (intermediate)

Similarly in high-risk melanoma patient group, we have found 3 subjects with intermediate (10,1-23 %) or high (> 23 %) percentage of the cytotoxic / immunomodulating CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-cell subset in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation, while the immunosuppressive CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-cell subset was absent or low (Table 6).

**Table 6. Percentage of FOXP3 or IFN $\gamma$  expressing T cells in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation of high-risk melanoma patients**

Patient code	Percentage of FOXP3 <sup>+</sup> T cells in CD8 <sup>h</sup> CD57 <sup>+</sup> T-cell subpopulation	Percentage of IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T cells in CD8 <sup>h</sup> CD57 <sup>+</sup> T-cell subpopulation
VAI	0,63 (low)	3,45 (low)
<i>TUB</i>	<i>0,47 (low)</i>	<i>49,93(high)</i>
PET	2,25 (high)	3,24 (low)
<b>BALM</b>	<b>0 (absent)</b>	<b>11,30 (intermediate)</b>
VRU	2,26 (high)	0 (absent)
VDO	5,62 (high)	0,79 (low)
MIK	6,03 (high)	97,23 (high)
DOV	1,86 (intermediate)	15,19 (intermediate)
AUG	0 (absent)	0 (absent)
PEI	1,88 (intermediate)	0 (absent)
RAD	0 (absent)	3,81 (low)
BUB	1.02 (low)	5,81 (low)
ZAC	5,27 (high)	undetermined
<b>RAM</b>	<b>0 (absent)</b>	<b>14,81 (intermediate)</b>
STR	20,54 (high)	undetermined
BALV	1,13 (intermediate)	undetermined
RUS	2,25 (high)	undetermined
SVE	6,61 (high)	37,69 (high)
STA	0,53 (low)	3,08 (low)
SAK	8,76 (high)	undetermined
KRI	0,59 (low)	undetermined
PLE	0,82 (low)	8,49 (intermediate)

## 8. DISCUSSION

The scope of this study was to assess quantitative differences in the expression of biomarkers, representing different T-cell functions in the peripheral blood  $CD8^hCD57^+$  and  $CD8^hCD57^-$  T lymphocyte subpopulations of cancer patients and healthy controls.

We chose two types of cancer for the investigation, namely clear cell renal cell carcinoma (RCC) and cutaneous melanoma. Although histologically these tumors are completely different, they are unified by one common feature, since these tumors are recognized as the most immunogenic human malignancies (11,12). Besides, these were the first tumors treated with cytokine-based antitumor immunotherapy which is still applied in contemporary clinical practice, often being the first line treatment in cases of advanced disease (13,14). Thus, RCC and melanoma are one of the most suitable malignancies for investigating interaction between tumor and immune system.

We have not found statistically relevant differences in the peripheral blood  $CD8^+$  T-cell concentration between patients with advanced RCC or high-risk melanoma and healthy controls (Fig. 1). However, inner rearrangements in the  $CD8^+$  T-cell population were observed with significant increase of the  $CD8^hCD57^+$  T-cell subpopulation in the peripheral blood of advanced RCC or high-risk melanoma patients when compared to healthy controls (Fig. 2). Other authors have also found expansion of the  $CD8^hCD57^+$  T-cell subpopulation in the peripheral blood and / or tumor of patients with various cancer forms (15,16).

Various authors report contradictory data, regarding functions of  $CD8^hCD57^+$  T cells – some authors characterize this subpopulation as immunosuppressive, which is undesirable in tumor pathology (9,16), while others describe highly cytotoxic or immunomodulating properties of the  $CD8^hCD57^+$  T-cell subpopulation and regard it as an important component of specific cellular immune response (5,15,17).

We presume that the  $CD8^hCD7^+$  T-cell subpopulation is very heterogenous and consists of various subsets, characterized by immunosuppressive (9), cytotoxic (18) or cytotoxic / immunomodulating (17) effects. Thus it is obvious that quantitative evaluation of the  $CD8^hCD7^+$  T-cell subpopulation alone may not reflect the nature of antitumor immune response. Therefore it is necessary to evaluate the percentage and relationship of various functionally competing subsets of the  $CD8^hCD57^+$  T-cell subpopulation.

We have found that the immunosuppressive CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-cell subset in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation was absent in even 65 % of healthy controls, while only 23 % and 18 % of such patients were observed in advanced RCC and high-risk melanoma patient groups, respectively (Table 2). Worth noting is the fact that systemic cytokine-based antitumor immunotherapy (rIFN $\alpha$ , rIL-2) is clinically effective in about 10-20 % of patients with advanced RCC or melanoma (13,19) and the assumption that antitumor immunotherapy is beneficial only for patients without the immunosuppressive T-cell subset can not be refuted.

Of great importance is the fact that even 42 % of advanced RCC patients and 41 % of high-risk melanoma patients had very high percentage (> 2 %) of the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-cell subset in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation, while in healthy controls we have not found any subject with highly pronounced immunosuppressive component (Table 2). These data suggest that the increase of the immunosuppressive CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-cell subset may be associated with malignancy.

Looking from the clinical point of view, prescription of antitumor immunotherapy for cancer patients with highly pronounced immunosuppressive component can be not only ineffective but even harmful, because immune system stimulation inevitably causes activation of its immunosuppressive chain which may finally lead to more severe suppression of antitumor immune response.

We have not found statistically reliable differences in the expression of FOXP3 in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulation between cancer patients and healthy controls (Fig. 3).

Collectively these data show that substantial differences in FOXP3 expression are confined to the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation of advanced RCC or high-risk melanoma patients.

We have found that percentage of the cytotoxic CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> T-cell subset in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation was significantly increased in advanced RCC patients, but showed no rise in high-risk melanoma patients (Fig. 5).

The CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-cell subset in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation displayed a different pattern – it was significantly increased in high-risk melanoma patients but showed no rise in advanced RCC patients when compared to healthy controls (Fig. 6).

We have not found significant differences in the expression of perforin or intracellular IFN $\gamma$  in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulation between cancer patients and healthy controls (Fig. 5 and 6).

It should be noted that both cancer patients and healthy controls can be divided into different groups according to the percentage of the immunosuppressive, cytotoxic or cytotoxic / immunomodulating subsets in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation (Tables 2-4). This means that the increase of immunosuppressive and tumor-attacking subsets in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation is not characteristic of all patients with advanced RCC or high-risk melanoma. In conjunction with the fact that there is no correlation between the expression of the immunosuppressive and cytotoxic or immunomodulating properties representing biomarkers in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation (Fig. 7 and 8), it appears that the nature of antitumor immune response is individual for every patient. Thus *the overall CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell mediated antitumor immune response is determined by the ratio of the immunosuppressive and tumor-attacking T-cell subsets in an individual patient.*

Interestingly, we have found that there were 23 % of advanced RCC patients who had very high percentage (> 84,74 %) of the cytotoxic CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> T-cell subset in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation, but the immunosuppressive CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-cell subset was absent (Table 5). Similarly, 12,5 % of high-risk melanoma patients had no the immunosuppressive CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-cell subset in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation, but had an intermediate percentage (10,1-23 %) of the cytotoxic / immunomodulating CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-cell subset (Table 6). It is likely that antitumor immunotherapy may be the most effective particularly for these advanced RCC or high-risk melanoma patients. Our hypothesis is supported by the fact that clinical response to cytokine-based antitumor immunotherapy is achieved in 10-20 % of advanced RCC or melanoma patients (13,19).

It can be envisaged that determination of the percentage of functionally competing T-cell subsets (especially immunosuppressive) in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation in future may serve as one of possible parameters enabling to assess the overall status of antitumor immune response and select cancer patients most suitable for antitumor immunotherapy while dismissing those to whom it would be ineffective or even harmful.

## 9. CONCLUSIONS

1. There are no significant differences in the peripheral blood CD8<sup>+</sup> T-cell concentration (cells per  $\mu$ l) between advanced renal cell carcinoma (RCC) or high-risk melanoma patients and healthy controls. There is only a tendency ( $p = 0,06$ ) for peripheral blood CD8<sup>+</sup> T-cell concentration to be higher in patients with advanced RCC when compared to high-risk melanoma patients.
2. The percentage of the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation in the peripheral blood CD8<sup>+</sup> T-cell population is significantly increased in advanced RCC patients ( $p = 0,002$ ) and high-risk melanoma patients ( $p = 0,01$ ) when compared to healthy controls.
3. There are significant differences in the expression of immunosuppressive and cytotoxic or immunomodulating T-cell properties reflecting markers in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T lymphocyte subpopulation of patients with advanced RCC or high-risk melanoma when compared to healthy controls:
  - a) the expression of immunosuppressive properties representing marker FOXP3 is significantly increased in 42 % of advanced RCC patients ( $p = 0,0004$ ) and 41 % of high-risk melanoma patients ( $p = 0,0004$ ) when compared to healthy controls;
  - b) the expression of cytotoxic properties representing perforin is significantly ( $p = 0,01$ ) increased in advanced RCC patients (very high expression is found in 26 % of patients), but not in high-risk melanoma patients;
  - c) the expression of cytotoxic and immunomodulating properties representing IFN $\gamma$  is significantly ( $p = 0,02$ ) increased in high-risk melanoma patients (intermediate or high expression is found in 38,5% of patients), but not in advanced RCC patients;
  - d) the increase of perforin expression in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation is not absolutely exclusive to advanced RCC patients as well as the increase of IFN $\gamma$  expression in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation is not exclusive to high-risk melanoma patients, because there are 10 % of RCC patients with intermediate or high expression of IFN $\gamma$  in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopu-

lation. Respectively, in high-risk melanoma patient group there are 10 % of subjects with very high expression of perforin in the CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subpopulation.

4. There is no correlation between the expression of immunosuppressive and cytotoxic or immunomodulating properties representing biomarkers in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell population of advanced RCC or high-risk melanoma patients.
5. There are no significant differences in the expression of indirect immunosuppressive properties representing biomarker NKG2A in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell population of advanced RCC or high-risk melanoma patients when compared to healthy controls.
6. There are no significant differences in the expression of immunosuppressive and cytotoxic or immunomodulating T-cell properties reflecting biomarkers in the peripheral blood CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T-cell subpopulation of patients with advanced RCC or high-risk melanoma when compared to healthy controls.

## 10. PUBLICATIONS

1. Strioga M, Dobrovolskienė N, Lukšienė A, Kazlauskaitė N, Purvinienė R, Jokūbauskienė L, Petraitis T, Characiejus D, Pašukonienė V. CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų subpopuliacijų kiekybiniai pokyčiai išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų periferiniame kraujyje. Sveikatos mokslai 2009;6(19):2771-6.
2. Strioga M, Dobrovolskienė N, Lukšienė A, Kazlauskaitė N, Petraitis T, Gibavičienė J, Purvinienė R, Characiejus D, Pašukonienė V. Quantitative changes of functionally different CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subsets in the peripheral blood of advanced renal cell carcinoma or high-risk melanoma patients. Acta medica Lituanica 2009;16(3-4):103-10.

## 11. PRESENTATIONS

1. „Two faces of antitumor immunity”: oral presentation in the 5<sup>th</sup> Baltic Congress of Oncology, 14-15 May, 2010, Riga, Latvia.
2. „CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> T cells in cancer”: poster presentation (officially accepted on 26 of April, 2010) in the Second International Conference on Regulatory T Cells and TH17 Cells and Clinical Application in Human Diseases, 17-20 July, 2010, Shanghai, China.

## 12. REFERENCES

1. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 2007 May;117(5):1137-46.
2. Barkholt L, Bregni M. Current immunotherapy for solid tumors. *Immunotherapy.* 2009 May;1(3):483-93.
3. Montes CL, Chapoval AI, Nelson J, Orhue V, Zhang X, Schulze DH, Strome SE, Gastman BR. Tumor-induced senescent T cells with suppressor function: potential form of tumor immune evasion. *Cancer Res.* 2008 Feb;68(3):870-9.
4. Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev.* 2005 Jun;205:158-69.
5. Weng NP, Akbar AN, Goronzy J. CD28<sup>-</sup> T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol.* 2009 Jul;30(7):306-12.
6. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood.* 2003 Apr;101(7):2711-20.
7. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329-60.
8. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004 Feb;75(2):163-89.



9. Jensen HK, Donskov F, Nordmark M, Marcussen N, von der Maase H. Increased intratumoral FOXP3-positive regulatory immune cells during interleukin-2 treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009 Feb;15(3):1052-8.
10. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):330-6.
11. MacAdam DH. Spontaneous Regression: Cancer and the immune system. Xlibris Corporation, 2003.
12. Jorritsma A, Schumacher TNM, Haanen JBAG. Immunotherapeutic strategies: the melanoma example. *Immunotherapy.* 2009 Jul;1(4):679-90.
13. Kim CJ, Dessureault S, Gabrilovich D, Reintgen DS, Slingluff CL Jr. Immunotherapy for melanoma. *Cancer Control.* 2002 Jan-Feb;9(1): 22-30.
14. Juozaitytė E (sudarytoja). Onkologija šeimos gydytojui, II dalis (klinikinė onkologija). Kaunas: „Vitae Litera“, 2008.
15. Tsukishiro T, Donnenberg AD, Whiteside TL. Rapid turnover of the CD8(+)/CD28(-) T-cell subset of effector cells in the circulation of patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2003 Oct;52(10):599-607.
16. Urbaniak-Kujda D, Kapelko-Słowik K, Wołowiec D, Dybko J, Hałoń A, Jaźwiec B, Maj J, Jankowska-Konsur A, Kuliczowski K. Increased percentage of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> suppressor lymphocytes in peripheral blood and skin infiltrates correlates with advanced disease in patients with cutaneous T-cell lymphomas. *Postepy Hig Med Dosw.* 2009 Jul;63:355-9.
17. García-Muñoz R, Rodríguez-Otero P, Galar A, Merino J, Beunza JJ, Páramo JA, Lecumberri R. Expansion of CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T cells in an immunocompetent patient with acute toxoplasmosis. *Adv Hematol.* 2009;2009:173439 (ID).
18. Schirmer M, Goldberger C, Würzner R, Duftner C, Pfeiffer KP, Clausen J, Neumayr G, Falkenbach A. Circulating cytotoxic CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res.* 2002;4(1):71-6.
19. Larkin JMG, Kipps ELS, Powell CJ, Swanton C. Systemic therapy for advanced renal cell carcinoma. *Ther Adv Med Oncol.* 2009;1(1):15-27.

## *Summary in Lithuanian*

## *Santrauka lietuvių kalba*

### **1. ĮVADAS**

Žinant, kad viena iš imuninės sistemos funkcijų yra atpažinti ir sunaikinti navikines ląsteles (1), kuriamos įvairios priemonės, kurios paskatintų ir sustiprintų priešnavikinio imuniteto komponentus – tai priešnavikinė imunoterapija, kurią taikant navikas sunaikinamas natūraliausiu ir organizmui biologiškai palankiausiu būdu (2). Šiuo metu taikomų įvairių priešnavikinės imunoterapijos metodų tikslas – bendrai aktyvinti priešnavikinį imuninį atsaką, tačiau žinant, kad navikinės patologijos metu gali labai suintensyvėti imunosupresinių komponentų veikla (3), tikėtina, jog tokiu atveju imuninės sistemos aktyvinimas tik dar labiau sustiprins šių komponentų aktyvumą, todėl skatins priešnavikinio imuninio atsako slopinimą ir sudarys dar palankesnes sąlygas navikui progresuoti.

Priešnavikinė imunoterapija gali būti efektyvi tik tada, kai ji skiriama atsižvelgiant į organizmo imuninės sistemos rodiklius, atspindinčius priešnavikinio imuninio atsako pobūdį.

Šiuo metu neįmanoma įvertinti visų tarpusavyje glaudžiai sąveikaujančių priešnavikinio imuniteto mechanizmų parametrų, todėl svarbu rasti tokius imuninės sistemos komponentus, kurie kuo informatyviau atspindėtų bendrą priešnavikinio imuninio atsako pobūdį. Vienas tokių komponentų galėtų būti  $CD8^hCD57^+CD28^-$  T limfocitų populiacija, kurios gausėjimas yra susijęs su lėtine antigenine stimuliacija, tame tarpe ir su navikine patologija (4).

Įvairūs autoriai apibūdina skirtingas  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijos efektorines savybes (5-9). Pateikiami duomenys, kad  $CD8^hCD57^+$  T limfocitai gali ekspresuoti perforiną bei granzimus ir pasižymėti stipriu citotoksiniu poveikiu (5), ar gausiai išskirti citokiną  $IFN\gamma$  (6), kuris gali tiesiogiai citotoksiškai veikti navikines ląsteles (7) bei netiesiogiai aktyvinti priešnavikinio imuniteto nespecifinius ir specifinius komponentus (8). Taip pat yra žinoma, kad dalis  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų ekspresuoja FOXP3 žymenį ir gali pasižymėti imunosupresiniu poveikiu (9). FOXP3 molekulė pripažįstama daugelio imuninį atsaką slopinančių T limfocitų pagrindiniu žymeniu (10).

Atsižvegiant į  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijos heterogeniškumą, akivaizdu, jog vien tik jos kiekio nustatymas onkologinėmis ligomis sergančių pacientų periferiniame kraujyje neatskleidžia priešnavikinio imuninio atsako pobūdžio. Būtina įvertinti skirtingomis savybėmis pasižyminčių ir funkciniu požiūriu konkuruojančių subpopuliacijų nuošimtį ir jų tarpusavio santykį  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijoje.

## **2. DARBO TIKSLAS**

Įvertinti imunosupresines, citotoksines bei imunomoduliuojančias savybes atspindinčių žymenų raiškos skirtumus išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo  $CD8^h$  T limfocitų populiacijoje, lyginant su kontroline grupe.

## **3. DARBO UŽDAVINIAI**

- 1.** Nustatyti  $CD8^+$  T limfocitų koncentracijos skirtumus išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų bei kontrolinės grupės individų periferiniame kraujyje.
- 2.** Ištirti  $CD8^+$  T limfocitų subpopuliacijų ( $CD8^hCD57^+$ ,  $CD8^hCD57^-$ ,  $CD8^{low}$ ) kiekybinius skirtumus išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje, lyginant su kontroline grupe.
- 3.** Ištirti FOXP3, NKG2A, perforino bei  $IFN\gamma$  raišką išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų bei kontrolinės grupės individų periferinio kraujo  $CD8^hCD57^+$  ir  $CD8^hCD57^-$  T limfocitų populiacijose.

#### 4. GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje statistiškai reikšmingų  $CD8^+$  T limfocitų koncentracijos skirtumų nestebima, lyginant su kontroline grupe. Tačiau  $CD8^+$  T limfocitų populiacijoje vyksta vidiniai persitvarkymai, statistiškai reikšmingai išaugant  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijos nuošimčiui.
2. Esminiai imunosupresines, citotoksines bei imunomoduliuojančias T limfocitų savybes atspindinčių žymenų raiškos skirtumai stebimi išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijoje.
3. Pagal imunosupresines, citotoksines bei imunomoduliuojančias T limfocitų savybes atspindinčių žymenų raišką, išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančius pacientus galima suskirstyti į atskiras grupes: vienų pacientų periferinio kraujo  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijoje minėtų žymenų raiška labai padidėja, kitų pacientų - nesiskiria ar nežymiai skiriasi nuo kontrolinės grupės individų.
4. Nėra koreliacijos tarp imunosupresines ir citotoksines bei imunomoduliuojančias savybes atspindinčių žymenų raiškos išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijoje, t. y. minėtų žymenų raiška yra tarpusavyje nepriklausoma.

#### 5. MOKSLINIS NAUJUMAS

Pirmą kartą buvo kompleksiskai įvertinti imunosupresines, citotoksines bei imunomoduliuojančias savybes atspindinčių žymenų raiškos skirtumai imunogeniškausiomis vėžio formomis (inkstų ląstelių karcinoma ar odos melanoma) sergančių pacientų periferinio kraujo  $CD8^h$  T limfocitų populiacijoje, lyginant su kontrolinės grupės individais.

Nustačius, kad statistiškai reikšmingi minėtų žymenų raiškos skirtumai randami būtent  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijoje, ateityje, atlikus papildomus klinikinius tyri-

mus, šios populiacijos ir jos subpopuliacijų kiekybinis įvertinimas gali tapti vienu iš imunologinių rodiklių, įgalinančių individualizuoti priešnavikinę imunoterapiją.

## 6. PACIENTAI IR METODAI

Tyrimas atliktas 2007-2009 metais VU Onkologijos institute. Ištirti 53 pacientai, iš jų 31 pacientas, sergantis vietiškai išplitusia ar metastazavusia šviesiųjų ląstelių tipo inkstų ląstelių karcinoma (amžiaus mediana 57 metai, vidurkis 60 metų, intervalas 42-81 metai), 22 pacientai, sergantys didelės rizikos odos melanoma (amžiaus mediana 67 metai, vidurkis 65 metai, intervalas 40-86 metai) bei 26 sveiki kontrolinės grupės individai (amžiaus mediana 54,5 metai, vidurkis 56 metai, intervalas 41-81 metai).

Piktybinių navikų diagnozė patvirtinta histopatologinio tyrimo metu.

Onkologiniams ligoniams kraujas buvo paimtas 5-ą – 7-ą dieną po operacijos ar naviko biopsijos, o kontrolinės grupės individams – profilaktinio sveikatos tikrinimo metu.

Onkologiniams ligoniams anksčiau nebuvo taikytas joks konservatyvus priešnavikinis gydymas – imunoterapija, chemoterapija ar spindulinė terapija.

Kontrolinę grupę sudarė individai, nesirgę ir nesergantys onkologinėmis ligomis.

Visi tyrimo dalyviai (pacientai ir kontrolinės grupės individai) nesirgo autoimuninėmis ligomis, lėtinėmis ar ūmiomis infekcijomis, lėtiniu alkoholizmu, sunkia psichikos liga, taip pat jiems nebuvo atlikta kraujo kamieninių ląstelių ar solidinio organo alogeninė transplantacija.

Tyrimas atliktas, gavus Lietuvos bioetikos komiteto leidimą. Visi tyrimo dalyviai pasirašė asmens informavimo ir sutikimo formą.

Imunosupresines, citotoksines bei imunomoduliuojančias savybes atspindinčių žymenų raiška  $CD8^hCD57^+$  ir  $CD8^hCD57^-$  T limfocitų populiacijose buvo tiriama tėkmės citometrijos būdu. Analizuojant kiekvieną mėginį, surinkta po  $10^4$  ląstelių. Absoliučių limfocitų koncentracijų apskaičiavimui naudotas automatinis hemocitometru nustatytas bendras leukocitų skaičius. Duomenys rinkti ir analizuoti, naudojant kompiuterinę programą *Cellquest (BD Biosciences)*.

Duomenų statistiniam apdorojimui naudota programa STATISTICA (7 versija).

Priklausomai nuo duomenų pasiskirstymo pobūdžio, jų statistinei analizei buvo taikomi atitinkami matematiškai pagrįsti statistiniai metodai.

## 7. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šis tyrimas buvo atliktas, siekiant įvertinti skirtingas funkcines savybes atspindinčių biožymenų raiškos skirtumus onkologinių ligonių periferinio kraujo CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> ir CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T limfocitų populiacijose, lyginant su kontroline grupe. Tyrimams pasirinkome dvi vėžio onkologines formas – šviesiųjų ląstelių tipo inkstų ląstelių karcinomą bei odos melanomą. Nors tai visiškai skirtingos histogenezės navikai, tačiau juos vienija viena bendra savybė – jie pripažįstami pačiais imunogeniškiausiais žmogaus piktybiniais navikais (11,12). Be to, tai yra navikai, kurių gydymui pirmiausia buvo pradėta taikyti ir iki šiol tebetaikoma sisteminė priešnavikinė citokinų imunoterapija, kuri, esant išplitusiai ligai, dažniausiai tampa pirmojo pasirinkimo gydymo būdu (13,14). Taigi istoriškai susiklostė tokia situacija, kad šie navikai yra vieni parankiausių, tiriant sąsajas tarp piktybinio proceso ir imuninės sistemos pokyčių.

Mūsų duomenimis, išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje nestebėta statistiškai reikšmingų CD8<sup>+</sup> T limfocitų koncentracijos skirtumų, lyginant su kontrole, tačiau vyko įvairių CD8<sup>+</sup> T limfocitų populiacijų kiekybinis persitvarkymas, statistiškai patikimai padidėjant CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų populiacijai išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje, lyginant su kontroline grupe. Kiti autoriai taip pat pateikia duomenis apie šios T limfocitų populiacijos padidėjimą periferiniame kraujyje ar / ir navike, sergant įvairiomis vėžio formomis (15,16).

Apibendrinant įvairių tyrėjų pateikiamus rezultatus, aiškėja, kad CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų populiacija yra labai heterogeniška, t. y. sudaryta iš įvairių subpopuliacijų, pasižyminčių imunosupresiniu (9), citotoksiniu (18) ir citotoksiniu / imunomoduliuojančiu (17) poveikiais. Todėl akivaizdu, jog vien tik CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų populiacijos nuošimčio nustatymas onkologinėmis ligomis sergančių pacientų periferinio kraujo CD8<sup>+</sup> T limfocitų populiacijoje neatskleidžia CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų vaidmens imuniniame atsake, kitaip tariant, neleidžia apibūdinti priešnavikinio imuninio atsako pobūdžio. Todėl būtina įvertinti įvairių subpopuliacijų, pasižyminčių skirtingomis ir konkuruojančiomis funkcinėmis savybėmis, dalį bei jų tarpusavio santykį CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų populiacijoje.

Mūsų duomenimis, net 65 % sveikų individų periferinio kraujo CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų populiacijoje imunosupresinės CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> subpopuliacijos visai nėra, tuo

tarpu tarp išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų tokių individų yra tik atitinkamai 23 % ir 18 %. Įdomu yra tai, kad klinikinis atsakas į priešnavikinę citokinų imunoterapiją (skiriant sisteminius rIFN $\alpha$  ar rIL-2) pasiekiamas tik apie 10-20 % išplitusiu inkstų vėžiu ar odos melanoma sergančių pacientų (13,19), todėl neatmestina prielaida, jog priešnavikinė imunoterapija veiksminga būtent tiems onkologiniams ligoniams, kurie visai neturi imunosupresinės CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T limfocitų subpopuliacijos.

Svarbu tai, kad net 42 % išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų ir 41 % didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų populiacijoje imunosupresinių CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T ląstelių subpopuliacija buvo labai gausi ir sudarė daugiau nei 2 % visų CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų, tuo tarpu kontrolinėje grupėje nerasta nei vieno individo su taip išreikšta imunosupresinių CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T limfocitų subpopuliacija. Klinikiniu požiūriu, priešnavikinės imunoterapijos skyrimas pacientams, turintiems labai pagausėjusią imunosupresinę subpopuliaciją, gali būti netikslingas, o galbūt netgi žalingas, nes bendrai aktyvinant imuninę sistemą, šiems pacientams neišvengiamai aktyvinami ir imunosupresiniu poveikiu pasižymintys jos komponentai, kurie savo ruožtu dar intensyviau slopina priešnavikinio imuninio atsako citotoksinius mechanizmus ir sudaro palankesnes sąlygas navikinėms ląstelėms išvengti imuninės sistemos naikinančio poveikio.

Tiriant citotoksinių CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> T ląstelių subpopuliacijos kiekybinius skirtumus, nustatyta, kad jos nuošimtis statistiškai patikimai didesnis išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų periferinio kraujo CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų populiacijoje, lyginant su kontroline grupe, tačiau nerasta perforino raiškos skirtumų CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų populiacijoje tarp kontrolinės grupės individų ir didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų. Tuo tarpu vertinant viduląstelinio IFN $\gamma$  raiškos skirtumus tarp tiriamų individų grupių, stebėtos priešingos tendencijos – viduląstelinį IFN $\gamma$  ekspresuojančių T ląstelių nuošimtis CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų populiacijoje buvo statistiškai patikimai didesnis didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėje, lyginant su kontroline grupe, tačiau nerasta viduląstelinio IFN $\gamma$  raiškos skirtumų CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų populiacijoje tarp išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų ir kontrolinės grupės individų.

Pabrėžtina yra tai, kad tiek pagal imunosupresinių, tiek ir pagal citotoksinių bei imunomoduliuojančių subpopuliacijų nuošimtį CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų populiacijoje kon-

trolinės grupės individus bei mūsų tirtus onkologinius ligonius galima suskirstyti į atskiras grupes. Taigi, citotoksinių ir imunosupresinių  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų subpopuliacijų pagausėjimas stebimas ne visų onkologinių ligonių periferiniame kraujyje. Įvertinant dar ir tai, kad onkologinių pacientų grupėse nerasta koreliacijos tarp imunosupresinių bei citotoksinių žymenų raiškos  $CD8^hCD57^+$  populiacijoje, aiškėja, jog kiekvieno paciento organizme priešnavikinio imuninio atsako pobūdis yra individualus ir „chaotiškas“, t. y. funkciškai konkuruojančių subpopuliacijų kiekybiniai persitvarkymai  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijoje yra atsitiktiniai. Būtent *imunosupresinių ir navikines ląsteles atakuojančių subpopuliacijų kiekybinis santykis ir turėtų nulemti bendrą  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų sukeliama priešnavikinio imuninio atsako pobūdį individualaus paciento organizme.*

Išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų grupėje rasta 23 % individų, kurių periferinio kraujo  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijoje buvo labai didelis (> 84,74 %) citotoksinių  $CD8^hCD57^+$ Perforin<sup>+</sup> T ląstelių subpopuliacijos nuošimtis, tačiau visai nerasta imunosupresinių  $CD8^hCD57^+$ FOXP3<sup>+</sup> T limfocitų subpopuliacijos. Didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėje buvo rasta 12,5 % individų, kurių  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijoje imunosupresinės  $CD8^hCD57^+$ FOXP3<sup>+</sup> subpopuliacijos visai nerasta, o „dvigubu“ priešnavikiniu poveikiu (tiesioginiu citotoksiniu ir imunomoduliuojančiu) pasižymintios  $CD8^hCD57^+$ IFN $\gamma^+$  T subpopuliacijos nuošimtis buvo vidutinis (10,1-23 %).

Tikėtina, kad būtent šiems pacientams priešnavikinė imunoterapija turėtų būti efektyviausia. Šią mūsų hipotezę palaiko faktas, kad klinikinis atsakas į priešnavikinę citokinų imunoterapiją pasiekiamas apie 10-20 % išplitusiu inkstų vėžiu ar odos melanoma sergančių pacientų (13,19).

Įvairių subpopuliacijų (ypač imunosupresinės) nuošimčio nustatymas  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijoje ateityje gali būti naudingas klinikinėje onkologinėje praktikoje, individualizuojant priešnavikinę imunoterapiją ir selektyviai parenkant tik tuos vėžiu sergančius pacientus, kuriems imuninės sistemos aktyvinimas sukeltų navikinių ląstelių naikinimą (skatintų citotoksinius priešnavikinio imuninio atsako komponentus), o ne dar labiau gilintų imunosupresiją (aktyvintų supresiniu poveikiu pasižymintius imuninės sistemos komponentus).



## 8. IŠVADOS

1. Išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje nerasta statistiškai patikimų  $CD8^+$  T limfocitų koncentracijos (ląst/ $\mu$ l) skirtumų, lyginant su kontroline grupe. Stebima tik tendencija ( $p = 0,06$ ), kad  $CD8^+$  T limfocitų yra daugiau odos melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje, lyginant su inkstų vėžiu sergančiais pacientais.
2.  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų nuošimtis  $CD8^+$  T limfocitų populiacijoje statistiškai reikšmingai didesnis išplitusiu inkstų vėžiu ( $p = 0,002$ ) ar didelės rizikos odos melanoma ( $p = 0,01$ ) sergančių pacientų periferiniame kraujyje, lyginant su kontroline grupe.
3. Išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijoje stebimi statistiškai reikšmingi žymenų, atspindinčių skirtingas T limfocitų savybes, raiškos skirtumai, lyginant su kontroline grupe:
  - a) imunosupresines savybes atspindinčio FOXP3 raiška statistiškai patikimai didesnė 42 % išplitusiu vėžiu sergančių pacientų ( $p = 0,0004$ ) ir 41 % didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų ( $p = 0,0004$ ) periferinio kraujo  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijoje;
  - b) citotoksines T limfocitų savybes atspindinčio perforino raiška statistiškai patikimai ( $p = 0,01$ ) didesnė išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų periferinio kraujo  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijoje, tuo tarpu didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėje statistiškai patikimų perforino raiškos skirtumų nerasta;
  - c) citotoksines bei imunomoduliuojančias T limfocitų savybes atspindinčio  $IFN\gamma$  raiška statistiškai patikimai ( $p = 0,02$ ) didesnė didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijoje, o išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų grupėje nerasta statistiškai patikimų  $IFN\gamma$  raiškos skirtumų;
  - d) perforino raiškos padidėjimas periferinio kraujo  $CD8^hCD57^+$  T limfocitų populiacijoje nėra išskirtinai būdingas tik išplitusiu inkstų vėžiu sergantiems

pacientams, o IFN $\gamma$  raiškos padidėjimas – tik didelės rizikos odos melanoma sergantiems pacientams, nes tarp sergančiųjų išplitusiu inkstų vėžiu rasta 10 % individų, kurių CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų populiacijoje buvo vidutiniškai ar gausiai ekspresuojamas IFN $\gamma$ , o odos melanoma sergančių pacientų grupėje buvo rasta 9 % individų, kurių CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų populiacijoje buvo labai gausiai ekspresuojamas perforinas.

4. Išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų populiacijoje nestebima statistiškai reikšmingų netiesiogines imunosupresines savybes atspindinčio NKG2A žymens raiškos skirtumų, lyginant su kontroline grupe.
5. Nėra koreliacijos tarp imunosupresines ir citotoksines ar citotoksines / imunomoduliuojančias T limfocitų savybes atspindinčių žymenų raiškos išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų populiacijoje.
6. Išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo CD8<sup>h</sup>CD57<sup>-</sup> T limfocitų populiacijoje nestebima FOXP3, NKG2A, perforino ar IFN $\gamma$  raiškos skirtumų, lyginant su kontroline grupe.

## 9. PUBLIKACIJOS

1. Strioga M, Dobrovolskienė N, Lukšienė A, Kazlauskaitė N, Purvinienė R, Jokūbauskienė L, Petraitis T, Characiejus D, Pašukonienė V. CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų subpopuliacijų kiekybiniai pokyčiai išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų periferiniame kraujyje. Sveikatos mokslai 2009;6(19):2771-6.
2. Strioga M, Dobrovolskienė N, Lukšienė A, Kazlauskaitė N, Petraitis T, Gibavičienė J, Purvinienė R, Characiejus D, Pašukonienė V. Quantitative changes of functionally different CD8<sup>h</sup>CD57<sup>+</sup> T-cell subsets in the peripheral blood of advanced renal cell carcinoma or high-risk melanoma patients. Acta medica Lituanica 2009;16(3-4):103-10.

## 10. PRISTATYMAI

1. „*Two faces of antitumor immunity*“: žodinis pranešimas V-ajame Baltijos onkologų kongrese, kuris vyko 2010 metų gegužės 14-15 dienomis Rygoje (Latvija).
2. „*CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> T cells in cancer*“: stendinis pranešimas (oficialiai priimtas 2010 04 26) tarptautinėje konferencijoje *Second International Conference on Regulatory T Cells and TH17 Cells and Clinical Application in Human Diseases*, kuri vyks 2010 metų liepos 17-20 dienomis Šanchajuje (Kinija).

## GYVENIMO APRAŠYMAS

*Vardas ir pavardė:* MARIUS STRIOGA

*Gimimo data:* 1979 02 10

*Gimimo vieta:* Kaunas

*Telefono nr.:* 8 5 2 19 09 31 (darbo)

*El. paštas:* [marius.strioga@vuo.lt](mailto:marius.strioga@vuo.lt)

*Doktorantūra:* 2005-2009 - Vilniaus universiteto Imunologijos institutas (dabartinis VMTĮ Inovatyvios medicinos centras)

*Darbovietė:* nuo 2007 m. vasario mėn. Vilniaus universiteto Onkologijos institutas, Mokslinių tyrimų centras, Imunologijos laboratorija, P. Baublio g. 3b-321, LT-08406, Vilnius, Lietuva

*Narystė draugijose:* Lietuvos onkologų draugija

## CURRICULUM VITAE

*Name and surname:* MARIUS STRIOGA

*Date of birth:* 10.02.1979

*Place of birth:* Kaunas, Lithuania

*Tel. nr.:* +370 5 2 19 09 31 (office)  
+370 601 69551 (mobile)

*E-mail:* [marius.strioga@vuo.lt](mailto:marius.strioga@vuo.lt)

*Doctoral studies:* 2005-2009 Institute of Immunology, Vilnius University (present State Research Institute Center for Innovative Medicine)

*Current position:* Institute of Oncology, Scientific Research Center, Laboratory of Immunology, P. Baublio str. 3b-321, LT-08406, Vilnius, Lithuania

*Membership:* Lithuanian Society of Oncology