

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^h T LIMFOCITŲ
POPULIACIJOJE**

DAKTARO DISERTACIJA
BIOMEDICINOS MOKSLAI, BIOLOGIJA (01B),
IMUNOLOGIJA, SEROLOGIJA, TRANSPLANTACIJA (B500)

VILNIUS, 2010

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

Mokslinis vadovas:

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

Konsultantė:

Dr. Vita Pašukonienė (Vilniaus universiteto Onkologijos institutas, biomedicinos mokslai, biologija - 01 B, imunologija, serologija, transplantacija - B500)

TURINYS

SANTRUMPOS	6
1. ĮVADAS	8
1.1. Problemos aktualumas	8
1.2. Darbo tikslas.....	11
1.3. Darbo uždaviniai	11
1.4. Ginamieji teiginiai.....	12
1.5. Darbo mokslinis naujumas ir reikšmė.....	13
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	14
2.1. Naviko ir imuninės sistemos sąveika.....	14
2.1.1. Istorinė apžvalga ir šiuolaikinė samprata	14
2.1.2. Priešnavikinio imuniteto efektoriniai komponentai	16
2.1.3. Navikų gebėjimas išvengti imuninės sistemos priežiūros.....	20
2.2. Imuninį atsaką slopinantys T limfocitai ir jų vaidmuo priešnavikiniame imunitete	23
2.3. CD8 ^h CD57 ⁺ T limfocitai ir jų vaidmuo priešnavikiniame imunitete	27
2.3.1. Bendra CD8 ^h CD57 ⁺ T limfocitų populiacijos charakteristika	27
2.3.2. Imunosupresiniai CD8 ^h CD57 ⁺ FOXP3 ⁺ T limfocitai	30
2.3.3. Imunosupresiniai CD8 ^h CD57 ⁺ iNKR ⁺ T limfocitai	32
2.3.4. Citotoksiniai ir imunomoduliuojantys CD8 ^h CD57 ⁺ T limfocitai....	36
2.3.5. CD8 ^h CD57 ⁺ T limfocitų vaidmuo priešnavikiniame imunitete	40
2.4. Inkstų ląstelių karcinoma ir odos melanoma – imunogeniškausi žmogaus piktybiniai navikai.....	41
3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODIKA	44
3.1. Tiriamieji.....	44
3.2. Tiriamųjų atrankos kriterijai	44
3.3. Tyrimai.....	45
3.4. Tyrimo protokolo schema.....	45
3.5. Darbo metodika.....	47
3.5.1. Medžiagos ir priemonės	47

3.5.2. Periferinio kraujo paėmimas	48
3.5.3. Nestimuliuotų limfocitų paviršiaus žymenų dažymas	48
3.5.4. Nestimuliuotų limfocitų viduląstelinio žymenų dažymas.....	49
3.5.5. Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių (PKVL) atskyrimas, stimuliavimas ir IFN γ raiškos nustatymas	50
3.5.6. Limfocitų populiacijų analizė tėkmės citometru.....	51
3.6. Statistiniai metodai.....	53
4. TYRIMO REZULTATAI.....	55
4.1. Tiriamųjų charakteristikos	55
4.1.1. Išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų grupė.....	55
4.1.2. Didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupė	56
4.1.3. Kontrolinė grupė.....	57
4.2. Imuninės sistemos rodikliai	58
4.2.1. T limfocitų populiacijų ir subpopuliacijų nuošimčio ir koncentraci- jos reikšmių pasiskirstymo normalumo (parametriškumo) nustatymas.....	58
4.2.2. CD8 ⁺ T limfocitų ir jų populiacijų kiekybiniai skirtumai tiriamųjų periferiniame kraujyje	61
4.2.3. FOXP3 raiška tiriamųjų periferinio kraujo CD8 ^h CD57 ⁺ ir CD8 ^h CD57 ⁻ T limfocitų populiacijose	63
4.2.4. NKG2A (CD159a) raiška tiriamųjų periferinio kraujo CD8 ^h CD57 ⁺ ir CD8 ^h CD57 ⁻ T limfocitų populiacijose	67
4.2.5. Perforino raiška tiriamųjų periferinio kraujo CD8 ^h CD57 ⁺ ir CD8 ^h CD57 ⁻ T limfocitų populiacijose	69
4.2.6. Viduląstelinio IFN γ raiška tiriamųjų periferinio kraujo CD8 ^h CD57 ⁺ ir CD8 ^h CD57 ⁻ T limfocitų populiacijose	73
4.2.7. Sąsajos tarp imunosupresines ir citotoksines bei imunomoduliuojan- čias savybes atspindinčių žymenų raiškos tirtų onkologinių ligonių periferinio kraujo CD8 ^h CD57 ⁺ T limfocitų populiacijoje.....	77
5. REZULTATŲ APTARIMAS	84
6. IŠVADOS.....	93

7. PUBLIKACIJŲ IR PRISTATYMŲ SĄRAŠAS	95
8. LITERATŪROS SĄRAŠAS	96
9. PRIEDAI.....	121

SANTRUMPOS

- APL – antigeną pateikianti ląstelė
- CD (angl. *cluster of differentiation*) – leukocitų diferenciacijos antigenai
- CD8^h (angl. *high – aukštas, gausus*) – gausi CD8 molekulių raiška ląstelės paviršiuje
- CD8^{low} (angl. *low – žemas, negausus*) – negausi CD8 molekulių raiška ląstelės paviršiuje
- CTL – citotoksiniai T limfocitai
- DAP(-10 arba -12) (angl. *DNAX-activating protein*) – DNR aktyvinantis baltymas (dešimtas arba dvyliktas)
- DL – dendritinė ląstelė
- EDTA – etilendiaminotetraacetatas
- FITC – fluoresceino izotiocianatas
- FSC (angl. *forward scatter*) – priekinė sklaida
- HLA (angl. *human leukocyte antigens*) – 1. žmogaus leukocitų antigenai; 2. žmogaus pagrindinis audinių dermės kompleksas
- IFN α – alfa interferonas
- IFN γ – gama interferonas
- ILK – inkstų ląstelių karcinoma
- ILT (angl. *immunoglobulin-like transcripts*) – imunoglobulinų tipo transkriptai
- IL(-2,-4,-5,-10,-12,-13,-15 ar -21) – interleukinas antras, ketvirtas, penktas, dešimtas, dvyliktas, tryliktas, penkioliktas ar dvidešimt pirmas
- ITAM (angl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) – imunoreceptoriaus tiroziniu pagrįsto aktyvinimo motyvas molekulėje
- ITIM (angl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) – imunoreceptoriaus tiroziniu pagrįsto slopinimo motyvas molekulėje
- mo Ak – monokloninis antikūnas
- KIR (angl. *killer cell immunoglobulin-like receptor*) – į imunoglobulinų molekulę panašus ląstelių žudikių receptoriaus
- LAK (angl. *lymphokine activated killer*) – limfocinų aktyvintos NK ląstelės

MHC (angl. *major histocompatibility complex*) – pagrindinis audinių dermės kompleksas

MIC(-A ar -B) (angl. *MHC class I chain-related*) – MHC-I klasės molekulių šeimos baltymai (A arba B)

NIL – naviką infiltruojantys limfocitai

NK (angl. *natural killer*) ląstelė – natūralus žudikas

NKG2 – NK ląstelių receptorių šeima

NKR (angl. *natural killer receptor*) – natūralių žudikų receptoriai

PE (angl. *phycoerythrin*) – fikoeritrinas

PerCP – peridininio, chlorofilo ir proteino (baltymo) kompleksas

PMA (angl. *phorbol-12-myristate-13-acetate*) – forbolio-12-miristato-13-acetatas

rIFN α – rekombinantinis alfa interferonas

rIL-2 - rekombinantinis interleukinas antras

SSC (angl. *side scatter*) – šoninė sklaida

TGF β (angl. *transforming growth factor*) – transformuojantis augimo veiksnys beta

TNF(- α arba - β) (angl. *tumor necrosis factor*) – navikų nekrozės veiksnys (alfa arba beta)

TLR – T limfocitų receptoriai

TNF α (angl. *tumor necrosis factor*) – navikų nekrozės veiksnys alfa

ULBP(1-4) (angl. *UL-16 binding protein*) – UL-16 molekulę prijungiantis baltymas (pirmas, antras, trečias ar ketvirtas)

1. ĮVADAS

1.1. Problemos aktualumas

Navikų atsiradimui ir vystymuisi didelę įtaką daro imuninė sistema. Yra žinomi įvairūs nespecifinio ir specifinio imuniteto mechanizmai, skirti navikinių ląstelių atpažinimui bei sunaikinimui (1), tačiau organizme navikai vis tiek susiformuoja bei progresuoja, ir tik itin retais atvejais įvyksta jų savaiminė regresija (2). Tai lemia navikinių ląstelių gebėjimas „pabėgti“ nuo imuninės sistemos priežiūros, naudojant įvairius mechanizmus (3,4).

Pastaraisiais metais gausėja duomenų, kad prie navikų gebėjimo išvengti imuninės sistemos naikinančio poveikio prisideda ir pati imuninė sistema, nes navikinės patologijos metu suintensyvėja ne tik jos citotoksinių, bet ir imunosupresinių komponentų veikla (4-7).

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 (8,9). Šiuo metu taikomų įvairių priešnavikinės imunoterapijos metodų tikslas – bendrai aktyvinti priešnavikinį imuninį atsaką (8,9), tačiau žinant, kad navikinės patologijos metu gali labai suintensyvėti imunosupresinių komponentų veikla (4-7), tikėtina, jog tokiu atveju imuninės sistemos aktyvinimas tik dar labiau sustiprins šių komponentų veiklą, 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 susijęs su lėtine antigenine stimuliacija, tame tarpe ir su navikine patologija (10,11).

Įvairūs autoriai apibūdina skirtingas $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijos efektorines savybes (12-20). Pateikiami duomenys, kad $CD8^hCD57^+$ T limfocitai gali ekspresuoti citotoksines molekules perforiną bei granzimus ir pasižymėti stipriu citotoksiniu poveikiu (13,14) ar itin gausiai išskirti citokiną IFN γ (15,16), kuris gali tiesiogiai citotoksiškai veikti navikines ląsteles (17) bei aktyvinti priešnavikinio imuniteto nespecifinius ir specifinius komponentus (18).

Taip pat yra žinoma, kad dalis $CD8^hCD57^+$ T limfocitų ekspresuoja FOXP3 molekules ir gali pasižymėti imunosupresiniu poveikiu (19,20). FOXP3 molekulė pripažįstama daugelio imuninių atsakų slopinančių T limfocitų pagrindiniu žymeniu (21,22).

Įvertinus įvairių autorių pateikiamus rezultatus, aiškėja, kad $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacija yra labai heterogeniška, t. y. sudaryta iš įvairių skirtingomis funkcinėmis savybėmis pasižyminčių subpopuliacijų.

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 efektorinėmis savybėmis pasižyminčių ir funkciniu požiūriu konkuruojančių subpopuliacijų nuošimtį ir jų tarpusavio santykį $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje.

Taigi, šio darbo tikslas buvo nustatyti ir įvertinti imunosupresinių, citotoksinių bei citotoksinių / imunomoduliuojančių T limfocitų subpopuliacijų nuošimčio skirtumus onkologinių ligonių periferinio kraujo $CD8^h$ T limfocitų populiacijoje, lyginant su sveikais individualais. Onkologinių ligonių grupes sudarė išplitusia inkstų ląstelių karcinoma ar didelės rizikos odos melanoma sergantys pacientai. Šios visiškai skirtingos histogenezės nozologinės vėžio formos pasirinktos dėl dviejų priežasčių. Pirma, tai patys imunogeniškiausi žmogaus piktybiniai navikai (23-25). Antra, esant pažengusiai ligai, minėtų vėžio formų gydymo galimybės yra labai ribotos, ir neretai prieinamiausias pasirinkimo būdas

yra citokinų imunoterapija (24-26). Tačiau skiriant neindividualizuotą citokinų imunoterapiją, t. y. neatsižvelgiant į paciento imuninės sistemos rodiklius, ji būna veiksminga tik 10-20 % išplitusiu inkstų vėžiu ar odos melanoma sergančių pacientų (27,28).

1.2. 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.

1.3. 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 γ 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.

1.4. 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: vieno 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.

1.5. Darbo mokslinis naujumas ir reikšmė

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

Nustačius, kad statistiškai reikšmingi minėtų žymenų raiškos skirtumai randami būtent CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje, ateityje, atlikus papildomus klinikinius tyrimus, šios populiacijos ir jos subpopuliacijų kiekybinis įvertinimas galėtų tapti vienu iš imunologinių rodiklių, įgalinančių individualizuoti priešnavikinę imunoterapiją.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Naviko ir imuninės sistemos sąveika

2.1.1. Istorinė apžvalga ir šiuolaikinė samprata

Idėja, kad imuninė sistema gali atpažinti navikines ląsteles bei jas sunaikinti, dar 1909 m. pasiūlė P. Ehrlich, vėliau, beveik po 50 metų, priešnavikinio imuniteto hipotezę pirmieji oficialiai iškėlė F. M. Burnet (1957 m.) ir L. Thomas (1959 m.) (17,29).

P. Ehrlich'o laikais mintys apie imuninės sistemos ir naviko sąveiką didelio dėmesio nesulaukė, nes tuo metu jo teiginių nebuvo galima patvirtinti eksperimentiškai, kadangi mažai buvo žinoma apie ląstelinius bei molekulinis imuniteto mechanizmus (17).

Tačiau Burnet ir Thomas hipotezė, praėjus 20 metų nuo jos paskelbimo, taip pat buvo atmesta, nes tuo metu atlikus bandymus su imunodeficitinėmis (čiobrialiaukės, *thymus*, neturinčiomis, „nuogomis“) CBA/H pelėmis nebuvo pastebėta ryšio tarp imunosupresijos ir dažnesnio spontaninių arba dirbtinai sukeltų (naudojant metilcholantreną) navikų vystymosi ar spartesnio jų augimo.

Galima įvardyti priežastis, dėl kurių Burnet bei Thomas hipotezė tuo metu buvo klaidingai paneigta ir atmesta, iš jų paminėtinos šios (17):

1. šiuo metu yra žinoma, kad „nuogos“ pelės nėra tinkamas modelis imunosupresinėms būklėms tyrinėti, nes tokių pelių organizme vis tiek randama $\alpha\beta$ -T limfocitų, nors ir labai mažai. Būtent šie T limfocitai galėjo prisidėti prie navikų naikinimo „nuogu“ pelių organizme;
2. tuomet buvo mažai žinoma apie NK ląsteles (jų kilmę, funkcijas), todėl neįvertintas šių ląstelių poveikis, naikinant navikus CBA/H pelėse. Šiuo metu yra žinoma, kad NK ląstelių skaičius ir funkcijos „nuogu“ pelių organizme yra nepakitę, o jų vaidmuo naikinant navikines ląsteles yra labai svarbus.

Praėjusio šimtmečio dešimtajame dešimtmetyje priešnavikinio imuniteto samprata vėl įgavo pripažinimą, kai atlikti tyrimai su pelėmis įrodė akivaizdų imuninės sistemos poveikį navikinėms ląstelėms (17,29). Pirmieji tyrimai įrodė endogeninio gama interferono (IFN γ) ir citotoksinių CD8⁺ T limfocitų svarbą priešnavikiniame imunitete (17,29,30).

Šiuo metu nenuginčijamai įrodyta, kad yra itin glaudus ryšys tarp imuninės sistemos veiklos ir navikinio proceso vystymosi tiek eksperimentinių gyvūnų, tiek ir žmonių organizme (17,30). Tai patvirtina šie faktai:

- ♦ yra gerai žinomas reiškinys, kai piktybinių navikų metastazės, pašalinus pirminį naviką, nyksta „savaimė“, taip pat kartais stebimas pirminio navikinio židinio „savaiminis“ nykimas, lydymas gausios navikiniams antigenams specifinių T limfocitų infiltracijos. Tai vadinama *spontanine navikų regresija*. Nors šis reiškinys pasitaiko itin retai, laikomasi nuomonės, kad tai yra svarus įrodymas, jog imuninė sistema sugeba kontroliuoti navikinio proceso eigą (23,31-34). Spontaninė navikų regresija labiausiai būdinga odos melanomai, inkstų ląstelių karcinomai (23), neuroblastomoms (33), nors iš esmės gali pasitaikyti esant bet kokios lokalizacijos bei kilmės piktybiniam navikui (34);

- ♦ onkologinėmis ligomis sergančių ligonių periferiniame kraujyje randami navikinių ląstelių ekspresuojamiems antigenams specifiniai antikūnai (17,35), o kraujyje bei navikuose randami navikiniams antigenams specifiniai T limfocitai (17,36). Eksperimentų su gyvūnais metu įrodytas T limfocitų dalyvavimas priešnavikiniame imunitete (17,29,30). Taip pat įrodytas svarbus NK ląstelių (nespecifinio imuninio atsako ląstelinio komponento) priešnavikinis poveikis (37,38);

- ♦ imunokompetentinėmis ląstelėmis (T limfocitais, B limfocitais, plazminėmis ląstelėmis, NK ląstelėmis, makrofagais, eozinofilais) infiltruotų navikų klinikinė eiga ir prognozė yra kur kas palankesnės nei šiomis ląstelėmis neinfilturuotų piktybinių navikų (17). Pavyzdžiui, tiriant 174 kiaušidės karcinomos (III ir IV stadijos) mėginius, gautus po ovariectomijos, 102 navikuose nustatyta T limfocitų infiltracija (buvo tirti NIL – naviką infiltruojantys T limfocitai, pagal CD3 žymens raišką), o 72 navikuose – NIL nerasta. Ligonų, kurių karcinomo-

se buvo NIL, 5 metų išgyvenamumas siekė 38 %, tuo tarpu tų ligonių, kurių navikuose NIL nerasta, 5 metų išgyvenamumas buvo tik 4,5 % (17).

Vis tik reikia paminėti, kad *bendras NIL įvertinimas gali būti apgaulingas*, nes tarp naviką infiltruojančių T ląstelių gali būti ir įvairus kiekis imuninį atsaką slopinančių T limfocitų. Būtent citotoksinių bei imunosupresinių T limfocitų santykis nulemia priešnavikinio imuninio atsako pobūdį (39-42);

♦ pirminiais (įgimtais) ar antriniais (įgytais) imunodeficitais sergantys žmonės kur kas dažniau susergera įvairiomis navikinėmis ligomis nei imuninės sistemos sutrikimų neturintys to paties amžiaus individai (17). Iš pradžių teigta, kad imunosupresuoti žmonės dažniau serga tik virusinės kilmės navikais (pvz., Kaposi sarkoma, gimdos kaklelio vėžiu, kai kuriomis ne Hodžkino limfomomis), ir buvo aiškinama, kad išsivystęs imuninis atsakas yra ne tiek priešnavikinis, kiek priešvirusinis. Iš tiesų, imunosupresuoti žmonės yra kur kas imlesni įvairioms infekcijoms, tame tarpe ir onkovirusinėms, be to, virusų sukelta kancerogenezė yra spartesnė už spontanią, todėl šie navikai greičiau išryškėja (17).

Vis tik šiuo metu tvirtai įrodyta, jog imunosupresuoti žmonės (daugiausiai buvo tirti ligoniai po organų transplantacijų, nuolat vartojantys imuninę sistemą slopinančius vaistus) kur kas dažniau susergera ir įvairiais nevirusinės kilmės piktybiniais navikais, pvz., inkstų, plaučių, storosios žarnos, kasos, endokrininių liaukų, šlapimo pūslės, šlapimtakių vėžiu, odos melanoma, įvairiomis sarkomomis (17);

♦ pastaruoju metu sėkmingai taikomos terapinės priešnavikinės vakcinos, gydant įvairius žmogaus piktybinius navikus (43-47).

2.1.2. Priešnavikinio imuniteto efektoriniai komponentai

● **Citotoksiniai CD8⁺ T limfocitai (CTL).** Tai svarbiausias priešnavikinio imuninio atsako komponentas (48). CD8⁺ T limfocitų receptorių (TLR) yra nuo MHC-I molekulių priklausomas, antigenui specifinis, todėl atpažįsta konkrečius navikinės ląstelės antigenus (jų peptidinius epitopus), kurie yra pateikti ląstelės paviršiuje, komplekse su MHC-I klasės molekulėmis (49,50). Įvai-

riems navikiniams antigenams susidaro skirtingi CTL klonai, vykstant tiems antigenams specifinių naiviųjų bei atminties $CD8^+$ T limfocitų aktyvinimui, proliferacijai ir diferenciacijai (51,52,53).

Tam, kad naivusis ar atminties $CD8^+$ T limfocitas būtų aktyvintas ir galėtų proliferuoti bei diferencijuotis į CTL, jam peptidinį antigeną, komplekse su MHC-I molekule, turi pateikti profesionali antigeną pateikianti ląstelė (dendritinė ląstelė, makrofagas), taip pat yra būtini T_H1 limfocitų išskiriami citokinai IL-2 bei $IFN\gamma$. $CD4^+$ T_H1 limfocitai yra aktyvinami, kai jų TLR atpažįsta peptidinius antigenus, pateiktus su MHC-II klasės molekulėmis profesionalių APL paviršiuje.

Po aktyvinimo, proliferacijos ir jos metu vykstančios diferenciacijos susidaryę specifiniai CTL atpažįsta konkrečius navikinių ląstelių paviršiuje pateikiamus peptidinius antigenus (taip pat komplekse su MHC-I klasės molekulėmis) ir sukelia taikininių ląstelių žūtį, išskirdami citotoksines molekules – perforiną bei granzimus (51,52).

Pastaruoju metu gausėja duomenų, kad svarbų vaidmenį priešnavikiniame imunitete atlieka $CD8^hCD57^+$ T limfocitai, kurie plačiau aptariami vėliau.

Yra duomenų, kad priešnavikiniame imuniniame atsake dalyvauja ir **NKT limfocitai** (54-56) bei **$\gamma\delta$ -T limfocitai** (57-59), kurie neretai apibūdinami kaip tarpinė grandis tarp nespecifinio ir specifinio imuniteto.

- **NK ląstelės** (angl. *natural killer* – *natūralus žudikas*). Tai didelių, granuliuotų limfocitų populiacija, sudaranti apie 10 % (5-15%) visų cirkuliuojančių limfocitų (60,61,62). Šios ląstelės neekspresuoja nei CD3 (visiems T limfocitams būdingo žymens), nei CD19 bei CD20 (B limfocitams būdingų žymenų), tačiau iki 30-40 % NK ląstelių gali ekspresuoti T limfocitams būdingą CD8 antigeną. Pastarojo raiška NK ląstelių paviršiuje yra kur kas silpnesnė nei T limfocituose ir žymima $CD8^{low}$ (63).

NK ląstelės yra nespecifinio (įgimto) imuniteto citotoksinis komponentas, kurio pagrindinė funkcija yra nespecifiškai atpažinti ir sunaikinti viduląsteli-

niais mikroorganizmais (virusais, viduląstelinėmis bakterijomis) infekuotas bei navikines ląsteles (61,62,64).

Pagal CD56 žymens raišką NK ląsteles galima suskirstyti į dvi populiacijas (65,66):

◆ CD^{56dim} (angl. *dim – blankus, blausus*) - tai subrendusios NK ląstelės, kurių paviršiuje CD56 žymens raiška yra negausi. Jos sudaro apie 90 % visų NK ląstelių ir pasižymi stipriu citotoksiniu poveikiu, kurį lemia citoplazmos granulėse esantys perforinas bei granzimai, išskiriami, kai NK ląstelė aktyvinama. CD^{56dim} NK ląstelės atlieka svarbų vaidmenį jau susiformavusio priešnavikinio imuninio atsako mechanizmuose;

◆ CD^{56bright} (angl. *bright - ryškus*) - tai NK ląstelės, kurių paviršiuje CD56 molekulės gausiai ekspresuojamos. Šios mažiau subrendusios ląstelės pasižymi kur kas silpnesniu citotoksiniu poveikiu, tačiau itin gausiai išskiria įvairius citokinus (IL-12, IFN γ ir kt.) bei ekspresuoja adhezijos molekules, kurios įgalina šias NK ląsteles kauptis antriniuose limfiniuose organuose bei uždegimo židiniuose. CD^{56bright} NK ląstelės atlieka svarbų vaidmenį, reguliuojant imuninį atsaką, taip pat jos itin svarbios priešnavikinio imuninio atsako pradžioje, formuojantis specifiniam citotoksiniam atsakui.

NK ląstelės gali tiesiogiai atpažinti pakitusias molekules navikinių ląstelių paviršiuje, arba gali sąveikauti su antikūnais padengtomis (opsonizuotomis) navikinėmis ląstelėmis (nuo antikūnų priklausomas ląstelių toksiškumas) (51, 52,67). Tai pirmasis - *aktyvinantysis* – signalas.

NK ląstelės aktyvinamos tik tada, kai negauna antrojo – *slopinančiojo* – signalo, kuris perduodamas inhibuojantiems NK ląstelių receptoriams (iNKR) sąveikaujant su taikininės ląstelės paviršiuje ekspresuojamomis MHC-I klasės molekulėmis (kurios yra „pakrautos“, t. y. sudaro kompleksus su įvairiais „savais“ peptidais). Virusais infekuotose bei navikinėse ląstelėse dažnai būna sutrikusi MHC-I klasės molekulių raiška, arba jos sudaro kompleksus su „svetimais“ (virusiniais ar pakitusiais navikiniais) peptidais, todėl NK ląstelei neper-

duodamas slopinamasis signalas, ji yra aktyvinama ir naikina virusų ar viduląstelių bakterijų infekuotą arba navikinę taikininę ląstelę (51,52,65-67).

Itin aktyviu priešnavikiniu poveikiu pasižymi **LAK** – tai limfocitų aktyvintos NK ląstelės, kurios susidaro veikiant didelėms IL-2 koncentracijoms, taip pat IL-12 bei interferonams (68,69).

Vienas iš įrodymų, jog NK ląstelės atlieka svarbų vaidmenį priešnavikiniame imunitete, yra faktas, kad imunodeficitinėse („nuogose“) pelėse (kurios beveik neturi T limfocitų, tačiau jų organizme NK ląstelių kiekis ir funkcinis aktyvumas yra normalūs) spontaninių navikų vystymosi dažnis nėra didesnis nei normalių pelių organizme (17).

- **Antikūnai.** Nors navikinių ląstelių ekspresuojamiems antigenams specifiniai antikūnai yra nustatomi onkologinių ligonių periferiniame kraujyje ir neabejotinai prisideda prie imuninio atsako navikams, tačiau jų vaidmuo nėra dominuojantis (70,71).

Manoma, kad antikūnų vaidmuo svarbesnis atpažįstant leukemijų, dauginės mielomos navikines ląsteles, tuo tarpu kietųjų (vadinamųjų solidinių) navikų atveju jų vaidmuo yra menkesnis.

- **Makrofagai.** Jie gali atpažinti antikūnais bei aktyvintais komplemento sistemos baltymais padengtas (opsonizuotas) navikines ląsteles ir sukelti jų žūtį, išskirdami įvairius lizosominius fermentus, reaktyvias deguonies formas, azoto monoksidą (NO) - tai *nuo antikūnų priklausomas ląstelių toksiškumas* (51,52).

Priešnavikiniu poveikiu pasižymi aktyvintų makrofagų išskiriami citokinai - *TNF α* (sukelia naviką maitinančių kraujagyslių trombozę ir navikinių ląstelių nekrozę, slopina angiogenezę) bei *TNF β* (sukelia navikinių ląstelių nekrozę) (51,52).

Kaip jau minėta, makrofagai yra profesionalios antigeną pateikiančios ląstelės, būtinos aktyvinant naivuosius bei atminties T limfocitus (51,52). Taigi,

jie atlieka svarbų vaidmenį specifinio ląstelinio priešnavikinio imuninio atsako formavimesi.

Būtina paminėti, kad pastaruoju metu gausėja duomenų, jog sukeldami ir palaikydami lėtinį uždegimą, makrofagai gali skatinti navikinio proceso formavimąsi bei jo progresavimą, pvz., yra duomenų, kad kai kurių gausiai makrofagais infiltruotų piktybinių navikų (limfomų, krūties, plaučių karcinomų) prognozė yra prastesnė. Vienas šio reiškinio aiškinimo būdų yra tas, kad lėtinio uždegimo aplinkoje esantys citokinai aktyvina ląstelių proliferaciją, skatina angiogenezę (72-76).

Taigi, makrofagų vaidmuo navikinio proceso patogenezėje yra nevienareikšmis, todėl būtini tyrimai, norint įvertinti jų vaidmenį įvairių piktybinių navikų biologijoje.

2.1.3. Navikų gebėjimas išvengti imuninės sistemos priežiūros

Nors žinomi įvairūs priešnavikinio imuniteto komponentai, tačiau navikai organizme vis tiek susiformuoja, auga ir progresuoja. Tai lemia navikinių ląstelių gebėjimas išvengti imuninės sistemos priežiūros.

Pagal šiuolaikinę priešnavikinio imuniteto koncepciją, skiriami šie sąveikos tarp navikinių ląstelių ir imuninės sistemos – *imunoredagavimo* - etapai (17,29, 30,77-80):

♦ **eliminavimas.** Ši imuninės sistemos ir naviko sąveikos etapą apima visi anksčiau paminėti ir tarpusavyje glaudžiai susiję nespecifinio ir specifinio imuniteto mechanizmai. Jei jiems pavyksta visiškai sunaikinti navikines ląsteles, tuo procesas ir baigiasi – imuninė sistema pašalina naviką;

♦ **pusiausvyra.** Jei imuninei sistemai nepavyksta sunaikinti visų navikinių ląstelių, tai tarp likusių genetiškai nestabilių piktybinių ląstelių ir imuninės sistemos efektorinių mechanizmų nusistovi *dinaminė pusiausvyra*, kai kliniškai pasireiškiantis navikas dar nesiformuoja, tačiau navikinės ląstelės taip pat nėra eliminuojamos. Ši konkurencijos principu pa-

grįsta dinaminė pusiausvyra žmogaus organizme gali trukti dešimtmečius;

♦ „pabėgimas“ nuo imuninės sistemos priežiūros. Dinaminės pusiausvyros periodu navikinės ląstelės, dėl jose nuolat besikaupiančių mutacijų, kinta, ir ilgainiui gali susiformuoti toks jų klonas (ar keli klonai), kurio ekspansijos imuninė sistema jau nebesugeba kontroliuoti. Tai įvyksta dėl to, kad pusiausvyros stadijos metu piktybinės ląstelės yra nuolat atakuojamos imuninės sistemos komponentų, todėl ilgainiui įgyja evoliuciškai pranašesnių biologinių savybių, kurios joms leidžia išvengti imuninės sistemos poveikio, kitaip tariant, imuninės sistemos apgultis tarsi priverčia navikines ląsteles keistis, siekiant išgyventi. Šioje stadijoje imuninės sistemos nebesuvaldomos navikinės ląstelės ima formuoti kliniškai pasireiškiantį naviką.

Žinomi įvairūs mechanizmai, kurių dėka piktybinės ląstelės sugeba išvengti imuninės sistemos naikinančio poveikio (3,4). Iš jų paminėtini keli.

- **Pakinta įvairių navikinių antigenų, kuriuos atpažįsta imuninė sistema, raiškos pobūdis ar jų sandara.** Pavyzdžiui, antigenai nustojami ekspresuoti, kinta jų epitopų sandara, arba membraniniai baltymai paverčiami tirpia (sekretuojama) forma (4,81).

- **Sutrinka navikinių antigenų epitopų pateikimas komplekse su MHC-I klasės molekulėmis, todėl jų negali atpažinti citotoksiniai T limfocitai.** Pvz., gali sumažėti MHC-I klasės molekulių sunkiosios (α) ar / ir lengvosios (β_2 -mikroglobulino) grandinių raiška navikinėse ląstelėse, arba gali būti ekspresuojamos pakitusios struktūros ir funkcijos (mutavusios) MHC-I klasės molekulės sunkioji ar / ir lengvoji grandinės (4,81,82).

- **Navikinės ląstelės gali gaminti ir išskirti imunosupresinius citokinus,** tokius kaip TGF β ar IL-10 (83,84,85). Pvz., yra žinoma, kad įvairių navikų,

ypač karcinomų, melanomos ląstelės išskiria imunosupresinę citokiną TGFβ (83,84,86), kuris slopina NK ląstelių, T ir B limfocitų proliferaciją bei veiklą, makrofagų funkcijas (fagocitinį pajėgumą, citokinų biosintezę, MHC ir kostimuliacinių molekulių raišką) (83). Įdomu tai, kad tos navikinės ląstelės, kurios sekretuoja TGFβ, pačios neekspresuoja receptorių jam, todėl išvengia šio citokino antiproliferacinio poveikio (87). Be to, yra duomenų, kad TGFβ skatina navikų angiogenezę (88).

- **Navikinės ląstelės gali įgyti atsparumą IFNγ tiesioginiam poveikiui.** Pavyzdžiui, vieno tyrimo metu nustatyta, kad 25 % plaučių adenokarcinomos ląstelių linijų buvo atsparios IFNγ poveikiui. Navikinėse ląstelėse gali įvykti mutacijos, sukeliančios IFNγ receptoriaus ar / ir jo signalo perdavime dalyvaujančių molekulių sandaros bei funkcijos pakitimus, o tai ir sąlygoja atsparumą IFNγ poveikiui (17).

- Pastaruoju metu gausėja duomenų, kad **priešnavikinio imuniteto citotoksinius mechanizmus gali slopinti pati imuninė sistema, veikiant imuninį atsaką slopinantiems T limfocitams** (86,89,90-93). Keli tyrimai įrodė, kad imuninį atsaką slopinančių T limfocitų pagausėjimas onkologinių ligonių periferiniame kraujyje ar / ir navike yra susijęs su ligos progresavimu bei prastesne prognoze (89,94,95). Nustatyta, kad imunosupresiniu poveikiu pasižyminčių T limfocitų gausėjimas ženkliai sumažina terapinių priešnavikinių vakcinų efektyvumą, tuo tarpu šių T limfocitų eliminavimas susijęs su geresniu vakcinų terapiniu poveikiu (96).

Yra duomenų, kad pačios piktybinės ląstelės gali skatinti imuninį atsaką slopinančių T limfocitų susidarymą (97,98).

Toliau aptariamos įvairios imunosupresiniu poveikiu pasižyminčių T limfocitų populiacijos ir galimas jų vaidmuo slopinant priešnavikinį imuninį atsaką.

2.2. Imuninį atsaką slopinantys T limfocitai ir jų vaidmuo priešnavikiniam imunitetui

Praėjusio amžiaus 8-ajame dešimtmetyje buvo nustatyta, kad T limfocitai gali dalyvauti ne tik imuninio atsako sukėlime, bet ir jo slopinime (99,100). Tada kilo didelis susidomėjimas imuninį atsaką slopinančiais T limfocitais (99-101). Buvo atlikti eksperimentai, kurie *netiesiogiai* įrodė šių T ląstelių egzistavimą, pvz., skiriant dideles antigeno dozes, eksperimentiniams gyvūnams pavykdavo sukelti imuninę toleranciją tam antigenui, o tokių gyvūnų T limfocitus suleidžiant antigenu nepaveiktiems gyvūnėliams, pastarieji taip pat įgydavo imuninę toleranciją tam antigenui (101,102). Tuomet manyta, kad imunosupresiniai T limfocitai išskiria įvairias molekules, koduojamas MHC-I genų lokuso (pelių organizme H2 genų komplekso) tariamojoje I-J srityje (99,101). Teigta, kad šios I-J molekulės dalyvaudavo pateikiant antigeną T limfocitams ir sukeliant jų funkcijos slopinimą (101). Detaliau tyrinėjant pelių H2 genų lokusą, 1983 m. buvo įrodyta, jog I-J geno nėra, t. y. neegzistuoja ir I-J molekulės (99-101). Tuomet kilo abejonių ir dėl imunosupresinių T limfocitų egzistavimo, o jas stiprino dar ir šie faktai (99-101,103):

- ◆ niekaip nepavyko rasti bent vieno molekulinio žymens, kuris leistų charakterizuoti supresinius T limfocitus ir įgalintų juos atskirti nuo kitų T ląstelių. Dėl šios priežasties nebuvo galima išskirti imunosupresinių T limfocitų klonų, tinkančių ląsteliniam bei molekuliniam jų savybių tyrimams;

- ◆ nepavyko konkrečiai apibūdinti imuninį atsaką slopinančiu poveikiu pasižyminčių molekulių, kurias tariamai išskiria imunosupresiniai T limfocitai;

- ◆ atliekant bandymus su TLR transgeninėmis pelėmis, taip pat naudojant TLR specifinius antikūnus, buvo įrodyta, kad autoreaktyvūs T limfocitų klonai sunaikinami čiobrialiukėje neigiamos selekcijos metu – tai centrinė tolerancija, kurios, kaip manyta, pakanka autoreaktyvių T limfocitų pašalinimui, todėl imunosupresiniai T limfocitai nereikalingi;

♦ nustačius, kad egzistuoja T_H1 ir T_H2 limfocitai, pasiūlyta dar viena imuninės sistemos veiklos savireguliacijos (supresijos) samprata, atsisakant imunosupresinių T limfocitų poreikio: nustatyta, kad T_H1 limfocitai skatina ląstelinio imuninio atsako formavimąsi (dėl jų išskiriamo $IFN\gamma$), o T_H2 limfocitai – humoralinio atsako formavimąsi (veikiant jų išskiriamams IL-4, IL-5, IL-13). Kadangi T_H1 ir T_H2 limfocitai, per jų išskiriamus citokinus, gali kontroliuoti (slopinti) vieni kitų veiklą (t. y. reguliuoti imuninio atsako nukreipimą T_H1 ar T_H2 kryptimis), manyta, kad to pakanka subalansuoto imuninio atsako vystymuisi.

Remiantis šiais duomenimis, praėjusio šimtmečio aštuntojo dešimtmečio antrojoje pusėje buvo „nenuginčijamai“ atsisakyta imunosupresinių T limfocitų koncepcijos (100,101,103).

Situacija vėl pasikeitė 1995 metais, kai Shimon Sakaguchi vadovaujama japonų mokslininkų grupė įrodė, kad IL-2 receptoriaus α grandinę (CD25) ekspresuojantys $CD4^+$ T limfocitai, pavadinti regulatoriniais T limfocitais ($CD4^+CD25^+$ Treg), dalyvauja slopinant įvairių eksperimentinių autoimuninių ligų vystymąsi pelių organizme.

Nuo tada vėl labai išaugo susidomėjimas imuninių atsaką slopinančiais T limfocitais, ir šiuo metu jie yra vieni labiausiai tyrinėjamų imuninės sistemos komponentų (5,101,104).

Ilgainiui $CD4^+CD25^+$ Treg limfocitai buvo nustatyti ir žmogaus organizme (105), be to, buvo atrastos ir toliau atrandamos įvairios imuninių atsaką slopinančių T limfocitų populiacijos tiek eksperimentinių gyvūnų, tiek ir žmogaus organizme (106).

Remiantis literatūros šaltiniais, pagrindines imuninį atsaką slopinančių T limfocitų populiacijas galima suskirstyti į šias grupes (106-118):

- **CD4⁺CD25⁺ Treg limfocitai:**

- ◆ *natūralūs - nTreg;*

- ◆ *indukuoti (įgyti, adoptyvūs) – iTreg:*

- *T_H3 limfocitai;*

- *Tr1 limfocitai;*

- **CD8⁺ Treg limfocitai:**

- ◆ *nuo Qa-1 (žmonių organizme nuo HLA-E) priklausomi CD8⁺ Treg limfocitai;*

- ◆ *CD8⁺CD25⁺ Treg limfocitai;*

- ◆ *CD8⁺CD122⁺ Treg limfocitai (pelių);*

- ◆ *CD8^hCD28⁻CD57⁺ T limfocitai.* Tai labai heterogeniška populiacija (12), todėl ne visi CD8^hCD57⁺ T limfocitai pasižymi imunosupresiniu poveikiu.

CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacija ir įvairios funkciniu požiūriu skirtingos jos subpopuliacijos yra šio darbo ašis ir toliau aptariamoms detaliam;

- **kiti imuninį atsaką slopinantys T limfocitai** (pvz., NK Treg limfocitai, „dvigubai neigiami“ CD4⁻CD8⁻ Treg limfocitai, γδ-Treg limfocitai ir kt.).

Įvairių tyrimų rezultatai rodo, kad imuninį atsaką slopinantys T limfocitai atlieka svarbų vaidmenį autoimuninių ligų (119), alergijų (120), imunodeficientinių sutrikimų (121) patogenezėje, taip pat dalyvauja kontroliuojant alotransplantato atmetimo reakcijas (122) bei yra svarbūs priešnavikinio imuniteto mechanizmuose (123,124).

Tiriant imunosupresinių T limfocitų vaidmenį priešnavikinio imuniteto mechanizmuose, didžiausias dėmesys skiriamas būtent CD4⁺CD25⁺ Treg limfocitams. Daugelio tyrimų metu nustatytas jų kiekio padidėjimas įvairiomis vėžio formomis sergančių pacientų periferiniame kraujyje ar / ir pačiame navike (91, 125-132).

Nustatyta, kad $CD4^+CD25^+$ Treg limfocitų kiekio padidėjimas onkologinių ligonių organizme yra glaudžiai susijęs su vėžio progresavimu bei prastesne ligos prognoze (39,86,89,95,125,129,130,133). Taip pat yra duomenų, kad Treg limfocitai yra linę kaupiantis navikiniame audinyje ir sukelti vietinį priešnavikinio imuninio atsako slopinimą (133,134), o šių naviką infiltruojančių Treg ląstelių veiklos slopinimas susijęs su naviko nykimu, net ir esant pažengusiai ligai (135-137). Treg limfocitų veiklos „išjungimas“ paskatina priešnavikinio imuniteto citotoksinių mechanizmų veiklą, kas ir sukelia imuninį naviko naikinimą (86).

Tačiau, *siekiant nuslopinti $CD4^+CD25^+$ Treg limfocitų funkciją ir taip skatinti priešnavikinį imuninį atsaką, susiduriama su svarbia problema – autoimuninio atsako vystymusi* (104,138), nes $CD4^+CD25^+$ Treg limfocitai yra atsakingi už autoreaktyvių T limfocitų veiklos slopinimą. Pavyzdžiui, JAV atlikto klinikinio tyrimo metu (139) 14 metastazavusia melanoma sergančių pacientų buvo gydyti peptidinės vakcinės (skatintas T limfocitų atsakas navikinėms ląstelėms) bei MDX-010 monokloninių antikūnų (blokuojančių CTLA-4 molekulę, kuri yra svarbi Treg imunosupresinei veiklai) deriniu. Dviems pacientams (14 %) buvo pasiektas visiškas, o vienam pacientui (7 %) – dalinis atsakas į gydymą, tačiau jiems išsivystė stiprus, gydymo reikalaujantis, autoimuninis atsakas, pasireiškiant dermatitui, enterokolitui, hepatitui, hipofizitui. Be to, minėtos autoimuninės komplikacijos (tik švelnesnės – III/IV laipsnio) išsivystė ir 6 pacientams (43 %), kuriems nebuvo pasiektas kliniškai svarbus priešnavikinis atsakas. Taigi iš viso pašalinis autoimuninis atsakas pasireiškė 9 (64 %) tyrime dalyvavusiems ligoniams.

Taigi, norint Treg veiklos slopinimą pritaikyti kaip navikų imunoterapijos priemonę, būtina sukurti metodikas, įgalinančias nuslopinti $CD4^+CD25^+$ Treg limfocitų, kurių TLR specifiniai su navikais susijusiems antigenams, veiklą.

Pastaruoju metu gausėja duomenų, kad slopinant priešnavikinį imuninį atsaką, svarbų vaidmenį atlieka imunosupresiniu poveikiu pasižyminčios įvairios $CD8^hCD28^-CD57^+$ T limfocitų subpopuliacijos (12,140-142). Be to, kaip jau

minėta, CD8^hCD28⁻CD57⁺ T limfocitų populiaciją sudaro ne tik imunosupresinės, bet ir citotoksinės subpopuliacijos (12-16).

Žinant, kad heterogeniška CD8^hCD28⁻CD57⁺ T limfocitų populiacija gausėja, sergant onkologinėmis ligomis (12,143), neatmestinos jos sąsajos su navikiniu procesu, todėl tikslinga šią populiaciją panagrinėti detaliau, siekiant įvertinti jos vaidmenį onkologinės patologijos metu.

2.3. CD8^hCD57⁺ T limfocitai ir jų vaidmuo priešnavikiniame imunitete

2.3.1. Bendra CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijos charakteristika

CD8^hCD28⁻CD57⁺ T limfocitų populiacija susidaro dėl pakartotinio susidūrimo su įvairiais antigenais gyvenimo eigoje, t. y. esant lėtinei ar epizodiškai pasikartojančiai antigeninei stimuliacijai (10,144-146). Kaip tai vyksta? Navikinių bei atminties CD8^hCD28⁺ T limfocitų TLR atpažįsta peptidinius antigenus, pateiktus su MHC-I klasės molekulėmis profesionalių APL paviršiuje (*pirmasis aktyvinimo signalas*), tačiau šios sąveikos nepakanka, kad vyktų minėtų CD8⁺ T limfocitų aktyvinimas. Tam yra būtinas *antrasis kostimuliacinis aktyvinimo signalas*, kuris perduodamas sąveikaujant CD28 molekulei (T limfocito paviršiuje) su B7.1 (CD80) ar B7.2 (CD86) molekulėmis profesionalių APL paviršiuje (147,148).

Be to, tam, kad įvyktų antrasis aktyvinimo signalas, reikalinga CD40 (APL paviršiuje) ir CD40L (per TLR jau aktyvinto T limfocito paviršiuje) sąveika - tai *tarpinis aktyvinimo signalas*, po kurio APL paviršiuje jau būna pakankama CD80 ir CD86 kostimuliacinių molekulių raiška (149).

Kai CD8^hCD28⁺ atminties T limfocitas susiduria su konkrečiu antigenu ir gavęs abu signalus yra aktyvinamas, jis proliferuoja ir diferencijuojasi į efektorinius (citoloksinus) bei kitos kartos atminties CD8^hCD28⁺ T limfocitus. Šie atminties T limfocitai, pakartotinai vis susidurdami su antigenu, gali „pereiti“ keletą tokių aktyvinimo ciklų.

Nustatyta, kad kiekvieno aktyvinimo metu $CD8^hCD28^+$ T limfocitų paviršiuje palaipsniui mažėja CD28 molekulių raiška, kol galiausiai ji visai išnyksta, susidarant $CD8^hCD28^-$ atminties T limfocitų populiacijai. Šie T limfocitai yra pasiekę galinę diferenciacijos stadiją ir po kontakto su antigenu jau nebegali proliferuoti bei diferencijuotis, todėl vadinami „pasenusiais“ (angl. *senescent*) (10,11,15).

Proliferacinių savybių praradimas susijęs su kritiniu (ribiniu) telomerų sutrumpėjimu, vadinamąją *Hayfflick'o riba* - tai reiškinys, kai kiekvieno ląstelės dalijimosi metu palaipsniui trumpėja telomeros (genetinės informacijos nekoduojančios DNR sritys, esančios chromosomų galuose ir palaikančios jų stabilumą) (150,151). Hayfflick'o riba būdinga visoms proliferuojančioms ląstelėms (išskyrus piktybines) – telomeroms sutrumpėjus iki kritinio lygio, ląstelės praranda galimybę daugintis (151).

Pastebėta, kad CD28 raiškos mažėjimas $CD8^h$ T limfocitų paviršiuje yra susijęs su CD57 raiškos didėjimu, ir šių molekulių raiška yra beveik reciprokinė, nes tik labai nedidelė dalis $CD8^h$ T limfocitų, gausiai ekspresuojančių CD57, gali ekspresuoti ir CD28 molekulę (15,152). Be to, būtent CD57 raiškos didėjimas, o ne CD28 raiškos mažėjimas labiau atspindi $CD8^h$ T limfocitų „senėjimą“ (15), nes nustatyta, kad tiek $CD8^hCD28^-CD57^+$, tiek $CD8^hCD28^+CD57^+$ T limfocitai yra „praėję“ vienodą skaičių dalijimosi ciklų (tai įvertinama pagal telomerų ilgį), tuo tarpu kai $CD8^hCD28^-CD57^-$ T limfocitai visada būna „praėję“ mažiau dalijimosi ciklų nei $CD8^hCD57^+$ T limfocitai (nepriklausomai nuo CD28 molekulės raiškos pastaruosiuose).

Taigi, galima teigti, kad būtent $CD8^hCD57^+$ fenotipas geriausiai apibūdina „pasenusių“ $CD8^h$ T limfocitų populiaciją (15,153).

CD57 molekulė (dar žymima HNK-1, Leu7) – tai apie 110 kDa masės oligosacharidas, kuris jungiasi prie ląstelės paviršiaus baltymų ekstraląstelinės dalies. Kraujyje CD57 raiška nustatoma dalies NK ląstelių bei T limfocitų paviršiuje, tačiau šios molekulės nerandama granulocitų, eritrocitų ar trombocitų paviršiuje. Dar organizme CD57 molekulę ekspresuoja neuronai (154).

Nors $CD8^hCD57^+$ T limfocitai yra pasiekę galinę diferenciacijos stadiją ir vadinami pasenusiais, jie nėra imuninės sistemos balastas, nes yra išlaikę efektorines funkcijas ir atlieka svarbų vaidmenį imuniniame atsake (48,154-157).

Pateikiami prieštaringi duomenys apie $CD8^hCD57^+$ T limfocitų polinkį apoptozei – vieni autoriai (10,158,159) teigia, kad $CD8^hCD57^+$ T limfocitai yra atsparūs apoptozei, kiti (15,48,152,160,161), priešingai, teigia, kad ši T limfocitų populiacija yra linkusi pasukti apoptozės keliu, esant antigeninei stimuliacijai (aktyvinimo sukelta apoptozė).

Kaip jau minėta, $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijos atsiradimas yra susijęs su lėtine antigenine stimuliacija. ***Nustatyta, kad $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacija gausėja:***

- ◆ su amžiumi (10,14,146,154,159);
- ◆ po hemopoetinių kamieninių ląstelių ar solidinių organų transplantacijos (13,155,162);
- ◆ sergant lėtinėmis viduląstelinėmis mikroorganizmų (virusų, kai kurių bakterijų) sukeliomis ligomis (10,13,154,162,163);
- ◆ sergant lėtiniu alkoholizmu (155,164);
- ◆ sergant autoimuninėmis ligomis (13,154,155,165);
- ◆ sergant onkologinėmis ligomis (12,48,143,154,166-168).

$CD8^hCD57^+$ T ląstelių populiacija yra labai heterogeniška (12,14), t. y. ją sudaro kelios subpopuliacijos. Yra žinomos citotoksinės subpopuliacijos, gausiai ekspresuojančios perforiną ir granzimus (13,14,165), bei $CD8^hCD57^+$ T limfocitų subpopuliacija, kuri išskiria labai daug citokino interferono γ (IFN γ) (15,16,169), o šis gali tiesiogiai sukelti navikinių ląstelių žūtį (17) bei pasižymi netiesioginiu priešnavikiniu poveikiu, aktyvindamas priešnavikinio imuniteto citotoksinius komponentus (18). Taip pat yra duomenų, kad $CD8^hCD57^+$ T limfocitai, ekspresuojantys vidubranduolinę transkripcijos veiksnį FOXP3, pasižymi imunosupresiniu poveikiu (19,20).

CD8^hCD57⁺ T limfocitai gali ekspresuoti NKG2A (CD159a) molekulę, ir tokius T limfocitus galima vertinti kaip netiesioginius imunosupresorius. Šių T limfocitų TLR atpažinus antigeną, jie nėra aktyvinami, nes NKG2A molekulė (sąveikaudama su HLA-E ir peptido kompleksu APL paviršiuje) T limfocitui perduoda slopinimo signalą, kuris konkuruoja su TLR sukeliamu aktyvinimo signalu (170,171).

Reikia paminėti, kad CD57 molekulės raiška didėja ne tik „senstančių“ CD8⁺, bet ir CD4⁺ T limfocitų paviršiuje (154,155,161). Tiesa, CD4⁺ T limfocitų „senėjimas“ vyksta kur kas lėčiau, nes CD57 molekulės raiškos didėjimo dinamika yra lėtesnė, t. y. atminties CD4⁺ T limfocitai gali būti aktyvinami daugiau kartų, kol pasiekia galinės diferenciacijos stadiją ir praranda gebėjimą proliferuoti, esant pasikartojančiai antigeninei stimuliacijai (10,11,159). Pvz., nustatyta, kad tik gimusio kūdikio periferiniame kraujyje visi T limfocitai ekspresuoja CD28 molekulę, o 80 metų ir vyresnių žmonių periferiniame kraujyje net 50-60 % CD8⁺ T limfocitų CD28 molekulės neekspresuoja, tuo tarpu CD4⁺ T limfocitų populiacijoje tokių ląstelių yra tik apie 10-15 % (14).

Toliau plačiau aptariamose šiame darbe tiriamose CD8^hCD57⁺ T limfocitų subpopuliacijos.

2.3.2. Imunosupresiniai CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ T limfocitai

FOXP3 molekulė pripažįstama pagrindiniu daugelio imunosupresinių T limfocitų biožymeniu (21,22), todėl CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ T ląstelių subpopuliacija gali būti vertinama kaip vienas svarbiausių imunosupresinių komponentų CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje.

FOXP3 (angl. *forkhead/winged-helix transcription factor P3*) - tai vidubranduolinis transkripcijos veiksnys, dar vadinamas skurfinu (172). FOXP3 baltymas yra įvairių genų transkripcijos represorius ir priklauso FOX transkripcijos reguliuotojų (aktyvintojų ar slopintojų) šeimai. Šios šeimos baltymai reguliuoja genų, kurių produktai dalyvauja ląstelių augimo, proliferacijos bei diferenciacijos procesuose, raišką. Kai kurie FOX šeimos baltymai yra svarbūs embrioninio vystymosi metu (172-174).

Visų FOX šeimos baltymų molekulėms būdinga specifinės formos sritis FKH (angl. *forkhead box*), sudaryta iš 80-100 aminorūgščių liekanų. Būtent ši sritis dalyvauja FOX baltymams sąveikaujant su DNR ir reguliuojant tam tikrų genų raišką (transkripcija) (172-174).

CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ T_s limfocitų veikimo mechanizmas (149,175-180):

♦ **jie sąveikauja su profesionaliomis APL (dendritinėmis ląstelėmis bei monocitais / makrofagais, bet ne su B limfocitais) ir paverčia jas tolerogeniškoms T_H ir T_c limfocitams, t. y. pateikdamos antigeną, šios profesionalios APL sukelia naiviųjų bei atminties T_H ir T_c limfocitų anergiją.** Kaip tai vyksta? Profesionalios APL pateikia peptidinį antigeną (komplekse su MCH-I klasės molekulėmis) CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ T_s limfocitų TLR. Dėl šios sąveikos APL paviršiuje padidėja ILT3 bei ILT4 molekulių raiška, ir dėl to sumažėja APL gebėjimas gausiai ekspresuoti kostimuliacines CD80 ir CD86 molekules po CD40L-CD40 sąveikos. Kaip jau buvo minėta, CD80 ir CD86 molekulės yra būtinos perduodant antrąjį (kostimuliacinį) aktyvinimo signalą naiviesiems bei atminties T limfocitams.

Manoma, kad ILT3 ir ILT4 baltymų veikla susijusi su transkripcijos veiksnio NF-κB aktyvinimo inhibavimu. Šis transkripcijos veiksnys dalyvauja aktyvinant minėtas kostimuliacines molekules koduojančių genų raišką.

Taip profesionalios APL tampa tolerogeniškos ir po sąveikos su naiviaisiais bei atminties CD4⁺ ar CD8⁺ T limfocitais paverčia juos anergiškais, t. y. negalinčiais proliferuoti ir diferencijuotis į efektorines bei kitos kartos atminties T ląsteles.

Naiviųjų bei atminties T ląstelių „anergizavimo“ procesą galima suskirstyti į tris stadijas:

1) tolerogeniškos APL (pagrindė DL) pateikia peptidinį antigeną (komplekse su MHC-II klasės molekulėmis) naiviųjų ar atminties CD4⁺ T limfocitų TLR bei naiviųjų ar atminties CD8⁺ T limfocitų TLR (komplekse su MHC-I molekulėmis), ir šie gauna *pirmąjį aktyvinimo signalą*;

2) kadangi tolerogeniškos DL yra nepakankama kostimuliacinių molekulių (CD80 ir CD86) raiška, tai jos negali perduoti naiviesiems bei atminties T limfocitams būtino *antrojo aktyvinimo signalo*;

3) negavę antrojo aktyvinimo signalo, minėti T limfocitai tampa anergiški. Be to, yra duomenų, kad procesas nesibaigia tiesiog šių T limfocitų „anergizavimu“, t. y. CD4⁺ T ląstelės gali virsti indukuotais CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg limfocitais, kurie savo ruožtu toliau inicijuoja tolerogeniškų APL formavimąsi. Kitaip tariant, įsijungia imuninę atsaką slopinančių T limfocitų susidarymo kaskada. Šis procesas vadinamas *infekcine tolerancija*. Taip pat yra duomenų, kad tolerogeniškos APL gali sukelti ir naiviųjų bei atminties CD8^h T limfocitų anergiją bei inicijuoti imunosupresinių CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ T limfocitų susidarymą.

Taigi CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ Ts limfocitai netiesiogiai (per profesionalias APL) sukelia naiviųjų bei atminties T limfocitų anergiją ir įjungia imuninę atsaką slopinančių T limfocitų susidarymo kaskadą (175).

Reikia paminėti, kad CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ Ts limfocitai gali paversti tolerogeniškomis ne tik profesionalias APL, bet ir kraujagyslių endotelio ląsteles, kurios apibūdinamos kaip neprofesionalios APL (181).

Nustatyta, kad po sąveikos su CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ Ts limfocitais, endotelio citų membranoje vyksta įvairių svarbių kostimuliacinių bei adhezijos molekulių raiškos sumažėjimas (CD40, CD54, CD58, CD62E, CD83, CD106), ir jie tampa tolerogeniškais (149,181) T limfocitų atžvilgiu.

2.3.3. Imunosupresiniai CD8^hCD57⁺iNKR⁺ T limfocitai

NKR – tai NK ląstelių receptoriai. Toks pavadinimas jiems suteiktas dėl to, kad pirmiausia jų raiška buvo nustatyta NK ląstelių paviršiuje (182,183). Vėliau paaiškėjo, kad įvairius NKR gali ekspresuoti ir dalis T limfocitų (184,185), be to, šie NKR gali reguliuoti tokių T limfocitų funkcinį aktyvumą (171).

Dauguma NKR yra MHC-I specifiniai, t. y. jie atpažįsta antigeninius peptidus, pateiktus su konkrečiomis šios klasės molekulėmis (64,186). Tačiau yra žinomi ir keli nuo MHC-I nepriklausomi NKR – tai CD56, CD16 (FcγRIII), CD161 (NKR1), CD244 (2B4, C1.7) (184). Beje, CD57 molekulės raiška pirmiausia taip pat buvo nustatyta NK ląstelėse (154), todėl ir ji gali būti priskiriama NKR grupei.

Teigiama, kad NKR raiška būdingiausia būtent „pasenusiems“ CD8^hCD57⁺ T limfocitams (171,187,188), tačiau yra duomenų, kad NKR gali ekspresuoti ir „įprastiniai“ CD8^hCD57⁻ T limfocitai (184). Šiuos duomenis paremia ir mūsų gauti rezultatai (tai plačiau nagrinėjama, aptariant rezultatus).

MHC-I specifiniai NKR gali būti *aktyvinantys* (aNKR - sukeliantys ar stiprinantys NK ląstelių ar T limfocitų aktyvinimo signalą) bei *inhibuojantys* (iNKR – slopinantys NK ląstelių ar T limfocitų aktyvinimą). Priklausomai nuo to, toks receptorių yra ekspresuojamas bei aktyvinamas, atitinkamai gali būti reguliuojamas NK ląstelės ar T limfocito funkcinis aktyvumas (189-194). Jei tas pats CD8⁺ T limfocitas ekspresuoja ir inhibuojantį, ir aktyvinantį NKR, tai dominuoja iNKR poveikis, todėl CD8⁺ T limfocito efektorinė funkcija nepasireiškia (195).

Žmogaus organizme skiriamos trys klasės MHC-I specifinių NKR:

♦ **KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*)**. Tai imunoglobulinų superšeimai priklausančių receptorių šeima, kurios nariai atpažįsta peptidais „pakrautas“ klasikines MHC-Ia klasės molekules (HLA-A, -B ir -C). Tiesa, kai kurių KIR (pvz., KIR2DL4) ligandas yra neklasikinė HLA-G molekulė (184,196), kurią savo paviršiuje ekspresuoja placentos trofoblastai (184).

KIR yra I tipo transmembraniniai baltymai, jų molekulių ekstraląstelinėje dalyje yra du arba trys domenai, kuriems būdinga *imunoglobulininė klostė*.

Žmogaus organizme žinoma 14 KIR – 8 iš jų yra inhibuojantys ir 6 aktyvinantys (196).

Inhibuojančių KIR viduląstelinė dalis yra ilga, joje randamos viena ar dvi ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) sekos, inicijuojančios NK ląstelės ar T limfocito aktyvinimą slopinančius viduląstelinis molekulinis signalus (195,196).

Aktyvinančių KIR viduląstelinė dalis yra trumpa, ir joje nėra jokių signalinių seku, tačiau KIR transmembraninėje dalyje yra vieta (krūvį turinti aminorūgšties liekana), įgalinanti sąveiką su adaptoriniais baltymais DAP10 ir DAP12, kurių struktūroje yra ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) sritys, inicijuojančios viduląstelinio aktyvinimo signalo perdavimą (195,196).

♦ **ILT (*immunoglobulin-like transcripts*) receptoriai, dar vadinami LIR (*leukocyte immunoglobulin-like receptors*).** Tai imunoglobulinų superšeimai priklausančių receptorių šeima, kurią sudaro 13 narių (195, 197). ILT receptorius koduojantys genai nėra polimorfiški (priešingai nei KIR atveju) (197). ILT gali būti ekspresuojami NK ląstelių, dalies T limfocitų, taip pat profesionalių APL paviršiuje. Jie atpažįsta peptidais „pakrautas“ klasikines MHC-Ia klasės molekules, taip pat neklasikinę HLA-G molekulę (197). ILT būna membraniniai (I tipo transmembraniniai baltymai) bei tirpūs (197).

ILT receptoriai gali būti *aktyvinantys* (pvz., tirpi ILT4 forma, ILT5) ir *inhibuojantys* (ILT2, ILT3, membraninė ILT4 forma) (196,197).

Kaip jau minėta, ILT3 ir ILT4 receptoriai yra gausiai ekspresuojami tolerogenišku dendritinių ląstelių paviršiuje. Jų hiperekspresiją šiose ląstelėse indukuoja $CD8^hCD57^+FOXP3^+$ Ts limfocitai, taip pat IL-10, $IFN\alpha$ (ar jų derinio) bei vitamino D_3 ir jo darinių poveikis DL aktyvinimo metu (175-180).

♦ **C tipo lektinų receptoriai, dar vadinami NKG2.** Tai C tipo lektinų superšeimai priklausantys baltymai, kurių ekstraląstelinėje dalyje yra į C tipo lektinų (savitų angliavandenius prijungiančių baltymų) struktūrą panašus domenai (194,195,198).

Visi šios grupės receptoriai sudaro heterodimerinius kompleksus su invariantine CD94 molekule, išimtis – NKG2D, kuris sudaro homodimerinį kompleksą (195,198).

Yra žinomi 2 *inhibuojantys* CD94/NKG2 receptoriai (jų viduląstelinėje dalyje yra ITIM sritys) – tai NKG2A ir NKG2B, kurie yra to paties geno mRNR transkripto alternatyvaus splaisingo produktai (194,196).

CD94/NKG2C, -E, -H receptoriai yra *aktyvinantys* (jų transmembrani- nėje dalyje yra vietos, sąveikaujančios su ITAM sritis turinčiu DAP12 adaptoriniu baltymu), beje, NKG2E bei NKG2H baltymai taip pat yra tos pačios mRNR molekulės alternatyvaus splaisingo produktai (194).

Visų minėtų heterodimerinių CD94/NKG2 receptorių ligandas yra HLA-E molekulė (pelių organizme Qa-1b) – tai neklasikinė, mažai polimorfiška MHC-Ib klasės molekulė, kurią ekspresuoja įvairių audinių ląstelės (194). HLA-E molekulės sudaro kompleksus su peptidais, kilusiais iš įvairių baltymų signalinių (lyderinių) sekų (196), tačiau CD94/NKG2 receptoriai atpažįsta tik tokias HLA-E molekules, kurios sudaro kompleksus su nanopeptidais, kilusiais iš įvairių MHC-I klasės molekulių signalinių sekų (196,198).

Homodimerinis NKG2D receptorius yra aktyvinantis, o jo ligandai yra įvairios *i MHC-I panašios molekulės*, tokios kaip MICA, MICB, ULBP1-4 ir kt. (196,198).

Nustatyta, kad NKR raiška T limfocituose padidėja infekcinių bei onkologinių susirgimų metu (170,199), be to, įvairūs jų raiškos pokyčiai gali būti susiję su vėžio progresavimu (171).

Tiriant NKR raišką onkologinėmis ligomis sergančių ligonių CD8⁺ T limfocitų paviršiuje, bene didžiausias dėmesys yra skiriamas inhibuojančiam CD94/NKG2A receptoriui. Nustatyta, kad jį ekspresuojančių T ląstelių kiekio padidėjimas naviką infiltruojančių T limfocitų populiacijoje gali būti stebimas esant įvairių lokalizacijų navikams ir yra siejamas su prastesne ligos prognoze (194).

Yra duomenų, kad CD94/NKG2A raišką CD8⁺ T limfocitų paviršiuje gali skatinti navikinių ląstelių išskiriami citokinai, tokie kaip IL-15 bei TGFβ (200). Pvz., tiriant gimdos kaklelio karcinomą infiltruojančių T limfocitų populiacijas, nustatyta, kad jose NKG2A ekspresuojančių CD8⁺ T limfocitų buvo gerokai daugiau nei tose CD8⁺ T limfocitų populiacijose, kurios infiltruoja normalų gimdos kaklelio audinį ar cirkuliuoja periferiniame kraujyje. Taip pat nustatyta, kad gimdos kaklelio karcinomos ląstelės gausiai išskyrė citokinus IL-15 bei TGFβ, o kultivuojant šias ląsteles su CD8⁺ T limfocitais, pastaruosiuose buvo skatinama CD94/NKG2A raiška. Naudojant blokuojančius monokloninius antikūnus, specifinius IL-15 ir TGFβ, CD94/NKG2A raiška CD8⁺ T limfocituose buvo inhibuojama (200).

2.3.4. Citotoksiniai ir imunomoduliuojantys CD8^hCD57⁺ T limfocitai

Įrodyta, kad CD8^hCD57⁺ T limfocitai gali itin gausiai ekspresuoti perforiną ir granzimus (13,14,154,165,201) bei išskirti neįprastai didelius citokino IFNγ kiekius (15,16,154,157,169,202,203).

Yra duomenų, kad būtent citotoksiniu poveikiu pasižymintys CD8^hCD57⁺ T limfocitai atlieka svarbų vaidmenį, sukeldami hepatito C virusais infekuotų hepatocitų žūtį (204), taigi tikėtina, kad navikiniams antigenams specifiniai citotoksiniai CD8^hCD57⁺ T limfocitai yra svarbus priešnavikinio imuninio atsako komponentas.

● **Perforinas** – tai citolizinis baltymas, randamas CD8⁺ T limfocitų bei NK ląstelių citoplazmoje esančiose rūgštinėse, į lizosomas panašiose, citolizinėse granulėse, kuriose jis yra kartu su granzimais bei granulzinu (205,206).

Teigiamą krūvį turintys perforinas ir granzimai citolizinėse granulėse sudaro nekovalentinius kompleksus su proteoglikanu serglicinu (207).

Kai T limfocitas ar NK ląstelė yra aktyvinami, citolizinės granulės egzocitozės būdu patenka į imunologinę sinapsę, susidarančią tarp T limfocito / NK ląstelės ir taikininės ląstelės (205,208,209).

Pagal klasikinį modelį, iš granulių atsipalaidavęs perforinas taikininės ląstelės membranoje polimerizuojasi (esant Ca^{2+}) ir sudaro 5-20 nm skersmens kanalus, pro kuriuos į ląstelę patenka granzimai. Esant didelei perforino koncentracijai, gali būti suardomas ląstelės membranos vientisumas, ir į ląstelę nekontroliuojamai plūsta natrio jonai bei vanduo, sukeldami osmozę (209,210,211).

Pastaraisiais metais gausėja duomenų, kad šis modelis nėra visiškai teisingas (207,209,210), nes nėra įrodymų, jog *in vivo* taikininės ląstelės membranoje formuotąsi *stabilūs* poliperforino kanalai (209). Be to, įrodyta, kad granzimai į ląstelę patenka ne pasyviai pro membraninius poliperforino kanalus, o receptorinės endocitozės būdu (210), pvz., po sąveikos su manozės 6-fosfato receptoriumi (granzimo B atveju) (209,210). Maža to, nustatyta, kad poliperforino formuojamų kanalų skersmuo yra per mažas, kad pro juos praeitų didelės globulinės granzimų molekulės (207).

Taigi, kol kas neaišku, koks yra tikslus perforino veikimo mechanizmas, nors ir yra įrodyta, kad jis būtinas tam, kad pasireikštų granulėse sukauptų citolizinių molekulių poveikis, pvz., nesant perforino, nepasireiškia granzimų citotoksinis poveikis (209,210). Akivaizdus perforino poreikis, naikinant viduląsteliniais mikroorganizmais infekuotas bei navikines ląsteles, išryškėja transgeninėse pelėse, kurių genome nėra perforiną koduojančių genų (210,212).

Pasiūlytas modelis, pagal kurį perforinas, granzimai bei serglicinas sudaro bendrą citolizinį kompleksą, kurio visi trys komponentai yra būtini citotoksiam poveikiui pasireikšti (207,213). Teigiama, kad dalyvaujant perforinui, minėtą kompleksą endocituoja taikininės ląstelės (jose susidarant gigantiškoms endosomoms), o tada perforinas formuoja poras endosomų membranoje ir įgalina granzimų patekimą į citoplazmą. Serglicinas yra reikalingas, tačiau tikslus jo vaidmuo nežinomas (207). Vis dėlto ir šis modelis turi neaiškumų – niekaip nepavyksta nustatyti perforino taikinių ląstelių viduje (213).

- **Granzimai** – tai fermentai serino proteazės, kurios randamos CD8^+ T limfocitų bei NK ląstelių citoplazmos citolizinėse granulėse. Žmogaus organiz-

me randami 5 rūšių granzimai, kurie skiriasi savo specifiškumu substratams – tai granzimai A, B (labiausiai ištirti), K, H ir M (214).

Kaip jau minėta, **granzimų poveikis taikininei ląstelei yra visiškai priklausomas nuo perforino buvimo** (209,210,212).

Granzimas B yra geriausiai ištirtas. Jo citotoksinis poveikis taikininei ląstelei labiausiai susijęs su *nuo mitochondrijų priklausomu apoptozės mechanizmu* paleidimu, kai yra pažeidžiama mitochondrijų išorinės membranos sandara, iš vidinės membranos atpalaiduojamas citochromas c, ir aktyvinama apoptozę sukeliančių fermentų kaspazių kaskada (214,215).

Nors granzimo B apoptozę sukiantis poveikis labiausiai siejamas būtent su kaspazėmis, nustatyta, kad yra ir kiti, nuo kaspazių nepriklausomi, jo citotoksinio poveikio mechanizmai, pvz., jis sukelia pūslių susidarymą taikininės ląstelės membranoje ir pažeidžia jos struktūrą bei funkcijas. Šis poveikis susijęs su kinazės Rock II, kuri dalyvauja aktomiozino susitraukimo mechanizme, inaktyvinimu (fermento suskaidymu) (214,215).

Granzimas A sukelia ląstelių apoptozę, įjungdamas mechanizmus, nesusijusius su kaspazių aktyvinimu, tačiau susijusius su mitochondrijomis. Priešingai nei granzimas B, jis neveikia mitochondrijų išorinės membranos, tačiau pažeidžia jų vidinę membraną (išnyksta jos elektrinis biopotencialas), o tai sudaro sąlygas reaktyvioms deguonies formoms iš mitochondrijų gausiai patekti į citoplazmą, kur jos inicijuoja ląstelės žūtį sukeliančius procesus (214,215).

Nustatyta, kad granzimas A gali tiesiogiai skaidyti baltymus, stabilizuojančius branduolio membranos vientisumą (lamininus), palaikančius chromatino struktūrą (histonus, SET baltymą) bei dalyvaujančius DNR pažeidimų reparacijoje (214).

Granzimo A sukeltos apoptozės metu ląstelėje susidaro viengrandžiai DNR trūkiai, tuo tarpu granzimas B žūstančioje ląstelėje sukelia oligonukleosominių DNR fragmentų susidarymą (214,215).

Granzimai H, K ir M yra mažiau ištirti, jų veikimo mechanizmas nėra tiksliai žinomas. Yra žinoma, kad granzimas M sukelia greitą ląstelių žūtį, įjungdamas nuo kaspazių bei mitochondrijų nepriklausomus apoptozės mechanizmus.

Yra duomenų, kad granzimas M gali netiesiogiai reguliuoti granzimo B aktyvumą (214).

• **Interferonas γ (IFN γ)** – tai II tipo interferonas, kurį išskiria CD4⁺ T_H1 limfocitai, dalis CD8⁺ T limfocitų (ypač CD8^hCD57⁺ T limfocitai (15,16)), NK ląstelės, taip pat tam tikromis sąlygomis jį gali išskirti B limfocitai, makrofagai, dendritinės ląstelės (18).

IFN γ priešnavikinio poveikio mechanizmai (17,18,51,52,87):

♦ įrodyta, kad IFN γ gali citotoksiškai veikti navikines ląsteles, indukuodamas jose proapoptotinius, antiproliferacinius molekulinis signalus, tai pat slopindamas angiogenezę. Tai ***tiesioginis priešnavikinis IFN γ poveikis.***

Visi toliau aptariami IFN γ veikimo mechanizmai navikines ląsteles veikia netiesiogiai, t. y. aktyvina priešnavikinį imuninį atsaką. Tai ***imuno-moduliuojantis IFN γ poveikis:***

♦ IFN γ aktyvina navikinio antigeno pateikimą (peptido pavidalu) MHC-I bei MHC-II keliais, t. y. įgalina baltyminių antigenų būti „matomu“ CD4⁺ bei CD8⁺ T limfocitams. Be to, IFN γ gali induktuoti MHC-II klasės molekulių raišką įvairių ląstelių, tame tarpe ir navikinių, paviršiuje (įprastai šias molekules ekspresuoja tik profesionalios APL), taigi jos tiesiogiai gali pateikti antigeną naiviesiems bei atminties CD4⁺ T limfocitams (kaip minėta, šie T limfocitai yra būtini naiviųjų bei atminties CD8⁺ T limfocitų aktyvinimo procese);

♦ IFN γ (dalyvaujant IL-12) skatina CD4⁺ T_H1 limfocitų susidarymą iš T_H0 ląstelių bei slopina pastarųjų diferenciaciją T_H2 limfocitų susidarymo kryptimi, t. y. skatina ląstelinio imuninio atsako formavimąsi;

♦ IFN γ svarbus naiviesiems bei atminties CD8⁺ T limfocitams diferencijuojantis į citotoksinius T limfocitus, kurie yra pripažįstami pagrindiniu priešnavikinio imuninio atsako komponentu (48,184);

♦ $\text{IFN}\gamma$ (kartu su IL-2) skatina NK ląstelių virtimą kur kas aktyvesniu priešnavikiniu poveikiu pasižyminčiomis *limfokinių aktyvintomis ląstelėmis* (LAK). Taip $\text{IFN}\gamma$ aktyvina ir nespecifinio priešnavikinio imuninio atsako komponentus.

Taigi, $\text{CD8}^{\text{h}}\text{CD57}^{\text{+}}\text{IFN}\gamma^{\text{+}}$ T limfocitai, itin gausiai išskiriantys $\text{IFN}\gamma$, pasižymi tiek tiesioginiu citotoksiniu poveikiu navikinėms ląstelėms, tiek imunomoduliuojančiu poveikiu priešnavikiniam imunitetui.

2.3.5. $\text{CD8}^{\text{h}}\text{CD57}^{\text{+}}$ T limfocitų vaidmuo priešnavikiniame imunitete

Įrodyta, kad $\text{CD8}^{\text{h}}\text{CD57}^{\text{+}}$ T limfocitų populiacijos gausėjimas susijęs su onkologine patologija - vėžiu sergančių ligonių organizme šių T limfocitų populiacijos pagausėjimas yra nustatomas tiek periferiniame kraujyje, tiek NIL populiacijoje (12,48,143,168,171,216).

$\text{CD8}^{\text{h}}\text{CD57}^{\text{+}}$ T limfocitų populiacijos svarbą onkologinių susirgimų atveju atskleidžia faktas, kad naviką pašalinus iš organizmo, šių T limfocitų kiekis sumažėja, nors prieš tai būna padidėjęs (48). Yra duomenų, kad $\text{CD8}^{\text{h}}\text{CD57}^{\text{+}}$ T limfocitų populiacijos gausėjimas tiesiogiai koreliuoja su piktybinio naviko stadijos didėjimu, t. y. ligos progresavimu (216).

Kadangi stebimos sąsajos tarp navikinio proceso bei $\text{CD8}^{\text{h}}\text{CD57}^{\text{+}}$ T limfocitų populiacijos kiekybinių kitimų ligonių periferiniame kraujyje bei navike, šių pokyčių įvertinimas gali būti naudingas, charakterizuojant priešnavikinį imunitetą, o tai itin svarbu klinikinėje onkologinėje praktikoje, prognozuojant ligos eigą ir parenkant optimalią gydymo taktiką, ypač prognozuojant priešnavikinės imunoterapijos efektyvumą bei vertinant jos skyrimo tikslingumą.

2.4. Inkstų ląstelių karcinoma ir odos melanoma – imunogeniškiausi žmogaus piktybiniai navikai

- **Inkstų ląstelių karcinoma (ILK)** – tai dažniausiai pasitaikantis inkstų piktybinis navikas, sudarantis apie 90 % visų šios lokalizacijos piktybinių navikų ir apie 2-3 % visų suaugusiųjų piktybinių navikų (217,218). Apie 80 % atvejų ILK pasireiškia 40-70 metų (dažniausiai virš 60 metų) žmonėms, vyrams dažniau nei moterims (santykis 3:2) (218).

Skiriami 4 ILK histologiniai variantai: *šviesiųjų ląstelių* (dažniausiai pasitaikanti, sudaranti apie du trečdalius visų ILK), *papilinė* (speninė, chromofilinė), *surenkamųjų latakų*, *chromofobinė* (217,218).

ILK ląstelės yra atsparios spindulinei terapijai bei chemoterapijai, todėl esant pažengusiai ligai (kai chirurginio gydymo jau negalima taikyti), bene vieningai liekantys gydymo būdai yra sisteminė imunoterapija (skiriant rIFN α , rIL-2 ar rIL-21) ir neseniai pradėta taikyti biologinių taikinių terapija (sorafenibas, sunitinibas, temsirolimus, everolimus), taip pat skiriamas angiogenezės inhibitorius bevacizumabas (217-219).

- **Odos melanoma** – tai odoje susiformuojantis melanocitų kilmės agresyvus piktybinis navikas, sudarantis apie 5 % visų odos pirminių navikų (26). Dažniausiai pasireiškia vyresnio amžiaus žmonėms, nors pastaruoju metu ši liga vis dažniau diagnozuojama jauniems suaugusiems bei paaugliams ar netgi vaikams (220,221).

Skiriami 4 pagrindiniai odos melanomos histologiniai variantai (26,219): *paviršiumi plintanti melanoma* (sudaro apie 55 % visų odos melanomų, pradinėse stadijose pasižymi horizontaliu augimu), *mazginė melanoma* (sudaro apie 20 % visų odos melanomų, jai iškart būdingas vertikalus augimas; tai agresyviausia odos melanomos forma, pasižyminti prasta prognoze), *lentigo maligna melanoma* (sudaro apie 8 % visų odos melanomų, formuojasi iš piktybinio šlako, dažniausiai pasireiškia veido odoje) ir *akrolentiginė melanoma* (sudaro apie 4 % visų odos melanomų, formuojasi delnų, padų odoje, rečiau panagėse, retai

– burnos gleivinėje). Apie 12 % atvejų pasitaiko retos ar neklasifikuojamos odos melanomos histologinės formos.

Piktybinės melanomos ląstelės dažniausiai būna atsparios spindulinei terapijai, jų jautrumas chemoterapijai irgi menkas (26), todėl esant didelės rizikos ar išplitusiai ligai, pirmo pasirinkimo gydymo būdas dažniausiai yra sisteminė citokinų imunoterapija (26,28,219).

Inkstų ląstelių karcinoma ir odos melanoma yra visiškai skirtingos histogenezės navikai, kuriuos vienija viena bendra savybė – jie yra laikomi pačiais imunogeniškiausiais žmogaus piktybiniais navikais (23-25,27,28).

Imunogeniškumas – tai antigeno (šiuo atveju, navikinio) gebėjimas sukelti jam *specifinį* humoralinį ar / ir ląstelinį imuninį atsaką. Kadangi navikinės ląstelės yra kilusios iš normalių organizmo ląstelių, tai ir dauguma jų ekspresuojamų baltymų yra „savi“ (išskyrus onkogeninių virusų sukeltus navikus). Tam, kad imuninė sistema atpažintų navikinių ląstelių ekspresuojamus antigenus, turi būti pakitusi jų struktūra arba raiškos pobūdis, t. y. turi pasireikšti to antigeno „svetimumas“ (normalus baltymas turi tapti navikiniu) (51,52,222). Matyt, optimalus šių veiksnių derinys ir lemia stipriausias (lyginant su kitais navikais) odos melanomos bei ILK ląstelių (tiksliau, jų ekspresuojamų antigenų) imunogenines savybes.

Yra žinomi įvairūs melanomos bei ILK ląstelių ekspresuojami navikiniai antigenai, kuriuos atpažįsta specifinio imuniteto komponentai (53,223-226).

Vienas svarbiausių naviko imunogeniškumo požymių yra jo pirminio židinio ar metastazių (antrinių židinių) *savaiminė regresija* (23,31-34), t. y. navikinio audinio sunykimas, netaikant specifinio priešnavikinio gydymo (227,228). Šis reiškinys pasitaiko itin retai (2,228) ir labiausiai yra būdingas odos melanomai bei inkstų ląstelių karcinomai (23,33), taip pat neuroblastomoms (33), nors iš esmės gali pasitaikyti, esant bet kokios lokalizacijos bei kilmės piktybiniam navikui (34).

Odos melanomos metastazių savaiminė regresija pasitaiko mažiau kaip 1 % visų atvejų (33,229). Dažniausiai savaime nyksta melanomos metastazės odoje (navikiniai židiniai kitose odos vietose, nei yra pirminis navikas), poodyje bei sritiniuose limfmazgiuose, o metastazės vidaus organuose savaime nyksta itin retai (33). Tiesa, apie 3-15 % atvejų pasitaiko pirminės melanomos dalinė ar visiška regresija, tačiau neretai tai yra prastos prognozės ženklas, nes pirminis odos melanomos židinis pradeda regresuoti tada, kai kitose lokalizacijose susidaro jos metastazių (33,230).

Pirminės ILK savaiminė regresija pasitaiko išimtiniais atvejais (231), kiek dažniau (< 1 % visų ILK atvejų) pasitaiko jos metastazių savaiminis nykimas, ir labiausiai linkę regresuoti ILK antriniai židiniai plaučiuose (50-60 % visų ILK savaiminės regresijos atvejų), rečiau kauluose, kepenyse, smegenyse, itin retai pleuroje, kasoje, antinksčiuose (232-236). Dažniausiai ILK metastazių savaiminis nykimas stebimas po pirminio naviko citoredukcinės terapijos – chirurginio pašalinimo, inksto arterijos (*a. renalis*) embolizacijos ar radiodažninės abliacijos (232,233).

Taigi, nepaisant melanomos bei ILK imunogeniškumo, jų metastazių spontaninė regresija pasitaiko labai retai. Be to, skiriant *neindividualizuotą* citokinų imunoterapiją (sisteminį rIFN α ar rIL-2), atsakas į gydymą pasiekiamas tik apie 10-20 % pacientų (27,28,219,235,237). Tikėtina, kad šis reiškinys gali būti susijęs ir su tuo, kad citokinų imunoterapija skiriama, neatsižvelgiant į pacientų specifinius imuninės sistemos rodiklius, nes jie kol kas nenustatyti. Neatmestina galimybė, kad taikant kitus priešnavikinės imunoterapijos metodus (pvz., terapinę vakcinaciją navikiniais antigenais „pakrautomis“ dendritinėmis ląstelėmis), bet neįvertinant imunologinių rodiklių, taip pat bus sunku prognozuoti gydymo efektyvumą.

3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODIKA

3.1. Tiriamieji

2007-2009 metais Vilniaus universiteto Onkologijos institute ištirti 53 pacientai ir 26 sąlyginai sveiki savanoriai kraujo donorai. Visi tyrimo dalyviai pasirašė informuoto asmens sutikimo formą (žr. prieduose).

- Onkourologijos skyriuje ištirtas 31 pacientas, sergantis vietiškai išplitusia ar metastazavusia šviesiųjų ląstelių tipo inkstų ląstelių karcinoma.

- Torakalinės chirurgijos ir onkologijos skyriaus Galvos ir kaklo chirurgijos poskyryje ištirti 22 pacientai, sergantys didelės rizikos odos melanoma.

Didelės rizikos odos melanomos grupei buvo priskirti pacientai, kuriems nustatytos metastazės sritiniuose limfmazgiuose, ir atlikta pirminio naviko ekscizija bei sritinė limfadenektomija.

- Kontrolinę grupę sudarė 26 sąlyginai sveiki individai.

Tiriamųjų charakteristikos pateikiamos rezultatų skyrelyje.

3.2. Tiriamųjų atrankos kriterijai

Įtraukimo į tyrimą kriterijai:

- visiems tyrimo dalyviams ≥ 18 metų;
- visiems onkologiniams pacientams - histologiškai verifikuotas navikas;
- išplitusiu inkstų vėžiu sergantiems pacientams - nustatytos limfogeninės ar / ir hematogeninės metastazės ar nerezektabilus pirminis inkstų navikas;
- didelės rizikos odos melanoma sergantiems pacientams – pašalintas pirminis navikas ir melanomos metastazės sritiniuose limfmazgiuose;
- kontrolinei grupei – panašaus amžiaus individai, nesirgę ir nesergantys onkologinėmis ligomis, taip pat nesergantys neįtraukimo kriterijuose išvardintomis ligomis.

Neįtraukimo kriterijai:

- anksčiau taikyta imunoterapija, chemoterapija ar spindulinė terapija;
- kitos lokalizacijos antras piktybinis navikas;
- autoimuninės ligos;
- lėtinis alkoholizmas;
- ūmi ar lėtinė infekcinė liga;
- anksčiau atlikta kraujo kamieninių ląstelių ar solidinio organo alogeninė transplantacija;
- sunki psichikos liga.

3.3. Tyrimai

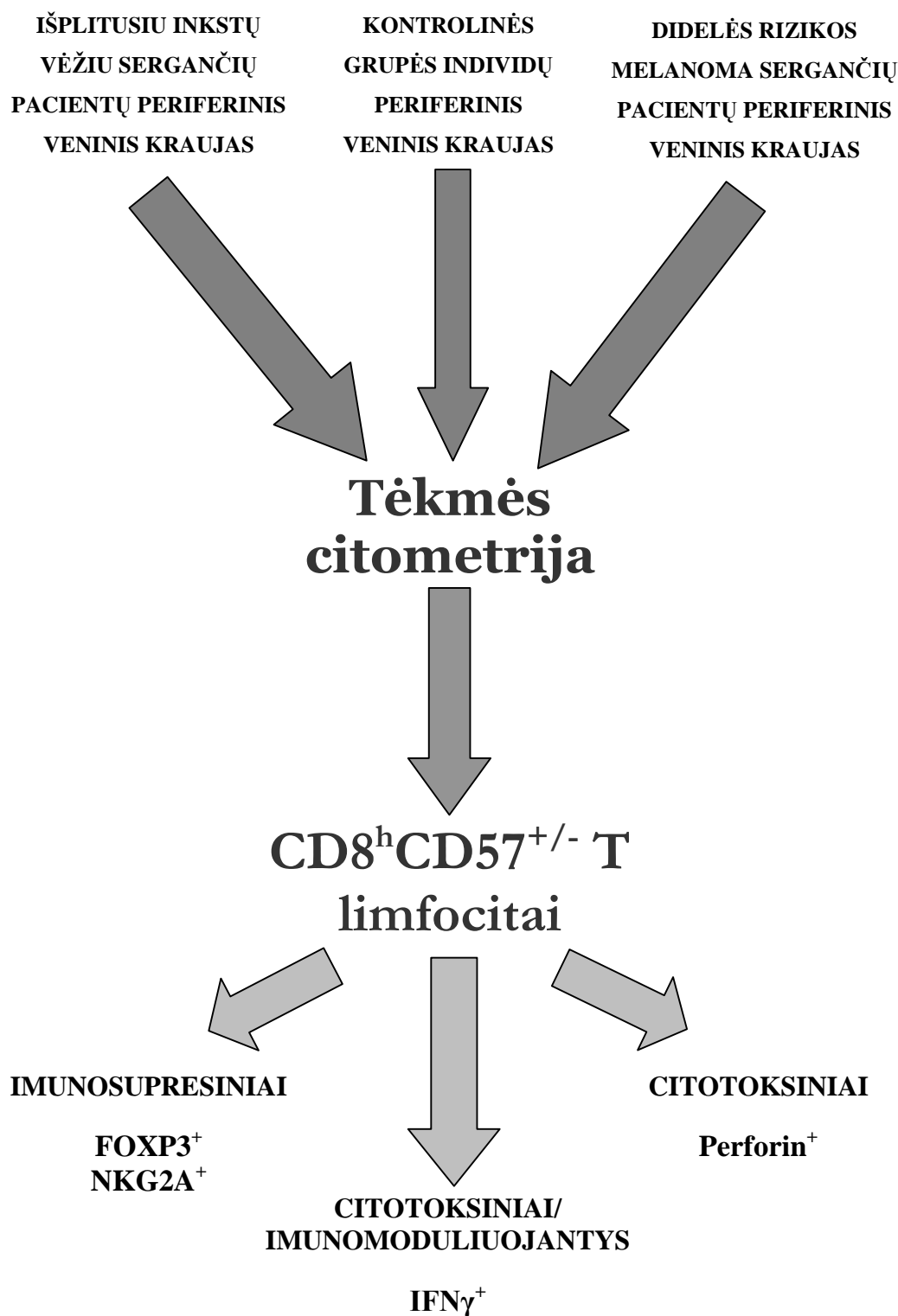
- Periferinio veninio kraujo tyrimai atlikti Vilniaus universiteto Onkologijos instituto Mokslinių tyrimų centro Imunologijos laboratorijoje bei Vilniaus universiteto Onkologijos instituto Laboratorių tyrimų skyriuje.
- Navikų histopatologinis tyrimas atliktas Valstybiniame patologijos centre.

3.4. Tyrimo protokolo schema

1. Sutikimą pasirašiusiam ir kriterijus atitinkančiam tiriamajam vieną kartą buvo imamas periferinis veninis kraujas:

- išplitusiu inkstų vėžiu sergantiems pacientams kraujas buvo imamas 5-7-ą dieną po pirminio naviko operacijos, inkstų arterijos (*a. renalis*) embolizacijos ar biopsijos (jei navikas buvo nerezektabilus ar pacientas neoperabilus);
- didelės rizikos odos melanoma sergantiems pacientams kraujas buvo imamas 5-7-ą dieną po operacijos, kurios metu atlikta pirminio naviko ekscizija ir / ar sritinė limfadenektomija;
- kontrolinės grupės individams kraujas buvo imamas profilaktinio sveikatos tikrinimo metu.

2. Tėkmės citometrijos būdu buvo tiriama imunosupresinės ir citotoksines bei citotoksines / imunomoduliuojančias T limfocitų savybes atspindinčių žymenų raiška tiriamųjų periferinio kraujo $CD8^hCD57^+$ ir $CD8^hCD57^-$ T limfocitų populiacijose.



1 pav. Supaprastinta eksperimentinio darbo schema

3.5. Darbo metodika

3.5.1. Medžiagos ir priemonės

1 lentelė. Tyrime naudotos medžiagos ir priemonės

Medžiagos ir priemonės	Apibūdinimas	Gamintojas
anti-CD8-PerCP	CD8 antigenams specifiniai monokloniniai antikūnai (mo Ak), konjuguoti su PerCP	<i>BD Biosciences</i>
anti-CD57-FITC	CD57 antigenams specifiniai mo Ak, konjuguoti su FITC	<i>BD Biosciences</i>
IgG _{2a} -FITC, IgG ₁ -PE	Izotipinės kontrolės	<i>BD Biosciences</i>
anti-NKG2A-PE	NKG2a (CD159a) antigenams specifiniai mo Ak, konjuguoti su PE	<i>Beckman Coulter Immunotech</i>
anti-perforin-PE	Perforinui specifiniai mo Ak, konjuguoti su PE	<i>BD Biosciences</i>
anti-FOXP3-PE	FOXP3 molekulėms specifiniai mo Ak, konjuguoti su PE	<i>eBioscience</i>
anti-IFN γ -PE	IFN γ specifiniai mo Ak, konjuguoti su PE	<i>BD Biosciences</i>
<i>FACS[®] Lysing Solution</i>	Eritrocitų suardymui (lizavimui) skirtas buferinis tirpalas	<i>BD Biosciences</i>
<i>CellWash[™]</i>	Ląstelių plovimui skirtas buferinis tirpalas	<i>BD Biosciences</i>
<i>Cell FIX[™]</i>	Ląstelių fiksavimui skirtas buferinis tirpalas	<i>BD Biosciences</i>
<i>Fixation/Permeabilization[™] solution</i>	Ląstelių fiksavimui ir permeabilizavimui skirtas buferinis tirpalas	<i>eBioscience</i>
<i>Permeabilization Buffer[™]</i>	Ląstelių plovimui po permeabilizacijos skirtas buferinis tirpalas	<i>eBioscience</i>
RPMI 1640 terpė	Naudota gaminant ląstelių kultūrų terpę	<i>Biological Industries</i>
Fetalinis veršelių serumas	Naudotas gaminant ląstelių kultūrų terpę	<i>Gibco</i>
Penicilinas G ir streptomocinas	Antibiotikai, naudoti gaminant ląstelių kultūrų terpę	<i>Sigma Aldrich</i>
Brefeldinas A	Baltymų sekreciją iš ląstelės blokuojanti medžiaga, kurios tirpalas naudotas tiriant viduląstelinio IFN γ raišką	<i>Invitrogen</i>
Jonomicinas	Medžiaga, kurios tirpalas naudotas limfocitų stimuliavimui, tiriant viduląstelinio IFN γ raišką	<i>Sigma Aldrich</i>
PMA (forbolio 12-miristato-13-acetatas)	Medžiaga, kurios tirpalas naudotas limfocitų stimuliavimui, tiriant viduląstelinio IFN γ raišką	<i>Fluka</i>
CO2CELL inkubatorius	Naudotas ląstelių inkubavimui stimuliacijos metu	<i>MMM Group</i>
Centrifuga <i>Rotixa 50RS</i>	Naudota ląstelių centrifugavimui	<i>Hettich ZENTRIFUGEN</i>
Tėkmės citometrijos mėgintuvėlis	5 ml talpos mėgintuvėliai, kuriuose buvo atliekamas T limfocitų paviršinių ir viduląstelinio žymenų dažymas bei citometrinė analizė	<i>BD Biosciences</i>
<i>BD Vacutainer[®] CPT[™]</i> mėgintuvėlis	8 ml talpos mėgintuvėlis su antikoagulantu natrio citratu, tankio gradientą formuojančia medžiaga bei geliu, naudotas vienpakopiam PKVL atskyrimui tankio gradientu	<i>BD Biosciences</i>
<i>BD Vacutainer[®]</i>	2 ml talpos mėgintuvėlis su antikoagulantu EDTA, naudotas surenkant periferinį veninį kraują, skirtą žymenų, kurių detekcijai netaikyta stimuliacija, nustatymui	<i>BD Biosciences</i>
<i>Automatinės pipetės</i>	Naudotos tiksliai dozuojant mėginius bei reagentus	<i>BIOHIT</i>
<i>FACSsort tėkmės citometras</i>	Naudotas atliekant tėkmės citometrinę analizę	<i>BD Biosciences</i>

3.5.2. Periferinio kraujo paėmimas

Periferinis veninis kraujas visiems tiriamiesiems buvo imamas iš alkūnės linkio venos vieną kartą į 2 vakuuminius mėgintuvėlius:

1. 8 ml talpos *BD Vacutainer*[®] *CPT*TM mėgintuvėlį. Šis kraujas naudotas vienbranduolių ląstelių (limfocitų ir monocitų) atskyrimui, jų stimuliacijai ir viduląstelinio IFN γ raiškos CD8⁺ T limfocituose nustatymui. Stimuliacija buvo pradėta 1 val. po kraujo paėmimo (privaloma pradėti ne vėliau kaip per 6 val.);
2. 2 ml talpos su antikoagulantu EDTA. Šis kraujas naudotas T limfocitų paviršinių žymenų bei viduląstelinio žymenų, kurių detekcijai nereikalinga stimuliacija, nustatymui. Kraujas buvo tiriamas 0,5-1 val. po paėmimo (privaloma tirti ne vėliau kaip per 24 val.).

Mėgintuvėliai su krauju į laboratoriją buvo pristatomi stovelyje vertikaloje padėtyje ir vengiant didesnių temperatūros pokyčių (leistinas transportavimo temperatūros intervalas yra +4 - +30° C).

3.5.3. Nestimuliuotų limfocitų paviršiaus žymenų dažymas

Į 1, 2, 3 ir 4-ą tėkmės citometrijos mėgintuvėlius automatine pipete buvo pilama po 100 μ l periferinio veninio kraujo ir po 20 μ l šių monokloninių antikūnų (mo Ak):

- 1 mėgintuvėlis: anti-CD57-FITC + anti-NKG2A-PE + anti-CD8-PerCP;
- 2 mėgintuvėlis: IgG_{2a}-FITC + anti-CD8-PerCP;
- 3 mėgintuvėlis: anti-CD57-FITC + anti-CD8-PerCP;
- 4 mėgintuvėlis: anti-CD57-FITC + anti-CD8-PerCP.

Ląstelės buvo inkubuojamos 15 min. kambario temperatūroje tamsoje.

Po inkubacijos eritrocitai 10 min. buvo lizuojami *FACS*[®] *Lysing Solution* tirpalu (pilta po 1 ml į kiekvieną mėgintuvėlį), ląstelės centrifuguotos, superna-

tantas nupiltas (jame liko suirę eritrocitai), o nusėdusios ląstelės buvo 2 kartus plautos *CellWashTM* buferiniu tirpalu.

1-ame mėgintuvėlyje esančios ląstelės buvo fiksuotos, pilant 500 µl *Cell-FIXTM* buferinio tirpalo ir laikytos + 4° C temperatūroje iki citometrinės analizės (ne ilgiau kaip 24 val.).

3.5.4. Nestimuliuotų limfocitų viduląstelinių žymenų dažymas

2, 3 ir 4-ame mėgintuvėliuose esančios ląstelės buvo fiksuojamos, permeabilizuojamos ir dažomos su mo Ak viduląsteliniams žymenims:

- a) į kiekvieną mėgintuvėlį buvo pilta po 500 µl *Fixation/PermeabilizationTM* buferinio tirpalo, ir ląstelės inkubuotos 30 min. kambario temperatūroje tamsoje;
- b) ląstelės buvo plaunamos 1 ml permeabilizavimo buferiniu tirpalu, centrifuguojamos 250 g greičiu 7 min., supernatantas nupiltas, ląstelės nenusausintos (likusiame laše vyko viduląstelinių žymenų dažymas);
- c) į kiekvieną mėgintuvėlį buvo pilama po 20 µl atitinkamų mo Ak viduląsteliniams žymenims: IgG₁-PE (į 2-ą mėg.), anti-FOXP3-PE (į 3-ą mėg.), anti-perforin-PE (į 4-ą mėg.). Ląstelės buvo inkubuojamos 30 min. kambario temperatūroje tamsoje;
- d) ląstelės buvo plaunamos 1 ml permeabilizavimo buferiniu tirpalu, centrifuguotos 250 g greičiu 7 min., resuspenduotos 500 µl *Cell-WashTM* buferinio tirpalo ir laikytos + 4°C temperatūroje iki citometrinės analizės (ne ilgiau kaip 24 val.).

Perforino raiškos nustatymui stimuliacija netaikyta, nes, atlikus kontrolinius bandymus, paaiškėjo, kad po stimuliavimo perforino raiška CD8^hCD57⁺ T limfocituose nepadidėdavo, tačiau labai padidėdavo perforinui specifinių mo Ak (IgM klasės) nespecifinė sąveika su CD8^hCD57⁺ T limfocitais.

Tiriant IFN γ raišką, šis reiškinys nebuvo stebėtas, todėl jo raiškos nustatymui CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje buvo taikomas nespecifinis stimuliavimas (tai įprasta procedūra, tiriant IFN γ raišką T limfocituose).

3.5.5. Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių (PKVL) atskyrimas, stimuliavimas ir IFN γ raiškos nustatymas

Periferinis veninis kraujas buvo surinktas į 8 ml talpos *BD Vacutainer*[®] *CPT*TM mėgintuvėlį, kuris skirtas PKVL atskyrimui iš kraujo vienos pakopos būdu. Kraujas buvo centrifuguojamas 1800 g greičiu 15 min. kambario temperatūroje.

Po centrifugavimo susidaręs PKVL sluoksnis („baltas žiedas“) nusiurbtas, ląstelės 2 kartus plautos, kiekvieną kartą pilant po 5 ml *CellWash*TM buferinio tirpalo.

Ląstelės buvo suskaičiuotos (naudojant Gorjajevo kamerą) ir resuspenduotos ląstelių kultūrų terpėje, gaunant suspensiją, kurios koncentracija buvo 1×10^6 ląst/ml. Ląstelių kultūrų terpę sudarė 90 % RPMI 1640 terpės, 10 % fetalinio veršelių serumo, taip pat buvo pridėta antibiotikų – 100 IU/ml penicilino G ir 100 μ g/ml streptomicino.

Į du sterilius tėkmės citometrijos mėgintuvėlius (pažymėtus N ir S) buvo pilama po 1 ml ląstelių suspensijos, tada į abu mėgintuvėlius pilta po 10 μ l 0,1 mg/ml brefeldino A tirpalo. Į S mėgintuvėlį pilta 1 μ l 1 mg/ml jonomicino tirpalo ir 5 μ l 10 μ g/ml PMA tirpalo.

Abu mėgintuvėliai 6 val. buvo laikomi 37,5° C, 5 % CO₂ atmosferoje inkubatoriuje CO2CELL. S mėgintuvėlyje vyko T limfocitų stimuliacija, o N mėgintuvėlyje buvo kontrolinės nestimuluotos ląstelės. Abiejuose mėgintuvėliuose buvo blokuota IFN γ sekrecija iš ląstelių (brefeldino A poveikis), todėl buvo galima palyginti viduląstelinio IFN γ kiekius prieš ir po stimuliacijos.

Toliau buvo atliekamas paviršinių žymenų (CD8 ir CD57) bei viduląstelinio IFN γ dažymas pagal 3.5.3. ir 3.5.4. skirsniuose aprašytas metodikas. Skirtumas tas, kad T limfocitus dažant su mo Ak paviršiniams žymenims, nereikėjo atlikti

eritrocitų lizavimo, nes šiuo atveju buvo naudojamos iš kraujo išskirtos vienbranduolės ląstelės.

Ląsteles nudažius, jos iš karto buvo analizuojamos tėkmės citometru.

3.5.6. Limfocitų populiacijų analizė tėkmės citometru

Ląstelių analizė buvo atlikta *FACSort* tėkmės citometru, turinčiu oru aušinamą 15 mW galingumo argono jonų lazerį, kurio šviesos emisija - 488 nm (mėlyna spalva).

Aparatas matuoja penkis analizuojamų ląstelių parametrus - priekinę (FSC) ir šoninę (SSC) šviesos sklaidas (pagal kurias ląstelės suskirstomos, atsižvelgiant į jų dydį ir granuliuotumą) bei tris skirtingos spalvos fluorescencijas, kurias fiksuoja atskiri šviesos absorbcijos ieškikliai (detektoriai).

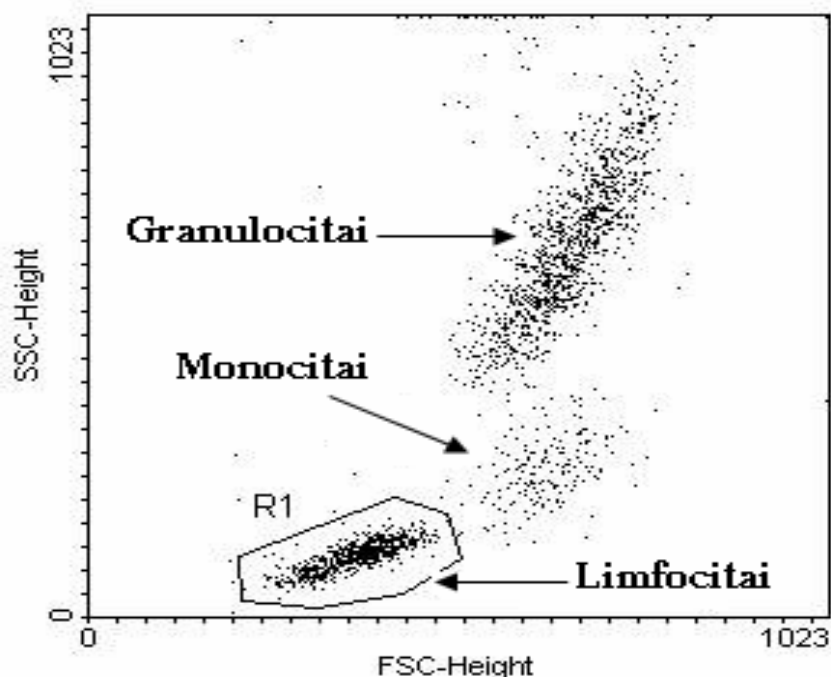
FACSort srautiniame citometre įmontuoti 530/30 nm bangos ilgio (žalios spalvos), 585/42 nm bangos ilgio (oranžinės spalvos) ir > 670 nm bangos ilgio (raudonos spalvos) šviesos absorbcijos ieškikliai.

Argono jonų lazerio skleidžiama mėlynos spalvos šviesa sužadina fluorochromus (jų aktyvius centrus), kurie spinduliuoja tam tikro ilgio (spalvos) šviesos bangas. Su šiais fluorochromais yra konjuguoti atitinkami mo Ak.

Mes naudojome mo Ak, konjuguotus su šiais fluorochromais:

- a) fluoresceino izotiocianatu (FITC), kuriam po sužadinimo būdinga žalios spalvos fluorescencija;
- b) fikoeritrinu (PE) – oranžinės spalvos fluorescencija;
- c) peridinino-chlorofilo proteinu (PerCP) – raudonos spalvos fluorescencija.

Limfocitai nuo monocitų ir granulocitų buvo atskiriami pagal priekinę ir šoninę lazerio šviesos sklaidas. Pagal priekinį šviesos išsklaidymą (iki 20° kampu) ląstelės suskirstomos atsižvelgiant į jų dydį, o pagal šoninį išsklaidymą (iki 90° kampu) – atsižvelgiant į ląstelių vidinį granuliuotumą. Iš visų leukocitų limfocitams būdingas mažiausias dydis ir granuliuotumas (2 pav.).



2 pav. Leukocitų populiacijų taškinis grafikas. Priekinė sklaida FSC (angl. forward scatter) atspindi ląstelių dydį, o šoninė sklaida SSC (angl. side scatter) – jų vidinį granuliuotumą. Pagal dydį ir vidinį granuliuotumą, leukocitai suskirstomi į limfocitų, monocitų ir granulocitų sritis

CD8^h T limfocitų populiacijų ir subpopuliacijų nuošimčiai leukocituose ar CD8⁺ T limfocituose buvo nustatomi pagal atitinkamų monokloninių antikūnų (konjuguotų su konkrečiais fluorochromais ir sudarančių imuninius kompleksus su jiems specifiniais antigenais) fluorescencijas.

Galimai monokloninių antikūnų nespecifinei sąveikai su įvairiomis ląstelėje esančiomis molekulėmis atskirti naudotos izotipinės kontrolės.

Ląstelės buvo analizuojamos, taikant kompiuterinę programą *CellQuest* (*BD Biosciences*).

Kiekvienam bandiniui buvo analizuota po 10^4 ląstelių. Atliekant kontrolinius bandomuosius eksperimentus, buvo rinkta po 2×10^5 ląstelių. Pastebėjus, kad įvairių subpopuliacijų nuošimtis praktiškai nesiskiria tiek analizuojant po 10^4 , tiek ir po 2×10^5 ląstelių, nuspręsta kiekvienam bandiniui tirti po 10^4 ląstelių, taip taupant monokloninius antikūnus.

Automatiniu hemocitometru buvo nustatyta bendra leukocitų koncentracija (ląst/μl) tiriamųjų periferiniame veniniame kraujyje. Pagal ją buvo apskaičiuotas CD8^hCD57⁺, CD8^hCD57⁻ ir CD8^{low} T limfocitų nuošimtis CD8⁺ T limfocitų populiacijoje, bei įvairių CD8^h T limfocitų subpopuliacijų nuošimtis buvo perskaičiuotas į koncentracijas (kai norėta lyginti šių T limfocitų absoliučius skaičius).

3.6. Statistiniai metodai

Visi gautų duomenų statistiniai skaičiavimai atlikti, naudojant kompiuterinę programą STATISTICA (7 versija).

Duomenų pasiskirstymo normalumas buvo įvertintas, taikant *Šapiro ir Wilko (Shapiro-Wilk's) W testą*.

Jei duomenų pasiskirstymas buvo parametrinis (simetrinis, normalusis, gausoidinis, Gauso), tai skirtumų statistinis reikšmingumas tarp grupių buvo vertinamas pagal *parametrinį Stjudento (Student's) t testą*.

Jei duomenų pasiskirstymas buvo neparametrinis, tai jų skirtumų statistinis reikšmingumas tarp grupių buvo vertinamas pagal *neparametrinį Mano ir Vitnio (Mann-Whitney's) U testą*.

Imunosupresines ir citotoksines bei imunomoduliuojančias savybes atspindinčių žymenų raiškos skirtumų tarp CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijų statistinis reikšmingumas įvertintas, taikant **Vilkoksono (Wilcoxon's) kriterijų**.

Vertinant priklausomybės tarp kintamųjų laipsnį, buvo apskaičiuotas *Spirmeno (Spearman's) ranginės koreliacijos koeficientas (r_s)*. Koreliacijos ryšys buvo vertinamas kaip *silpnas*, jei r_s = 0,01-0,29, *vidutinis*, jei r_s = 0,3-0,69 ir *stiprus*, jei r_s = 0,7-0,99.

Statistiškai reikšmingais vertinti dydžiai, kurių $p < 0,05$.

Imunosupresines ir citotoksines bei imunomoduliuojančias savybes atspindinčių žymenų raiškos skirtumai CD8^h limfocitų populiacijose buvo lyginami tarp:

- ♦ išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų ir kontrolinės grupės individų;

- ◆ didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų ir kontrolinės grupės individų;
- ◆ išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų ir didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų.

4. TYRIMO REZULTATAI

4.1. Tiriamųjų charakteristikos

4.1.1. Išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų grupė

Ištirtas 31 pacientas, sergantis vietiškai ar atokiai išplitusia šviesiųjų ląstelių tipo inkstų ląstelių karcinoma. Visi tyrime dalyvavę išplitusiu inkstų vėžiu sergantys pacientai 2007-2009 metais buvo gydyti Vilniaus universiteto Onkologijos instituto Onkourologijos skyriuje.

Pacientams kraujas buvo imamas 5-7-ą dieną po inksto pirminio naviko pašalinimo operacijos (dalinės ar visiškos nefrektomijos), inkstų arterijos (*a. renalis*) embolizacijos ar naviko biopsijos (jei navikas buvo nerezektabilus arba pacientas neoperabilus).

Pacientų duomenys pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė. Išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų charakteristikos

Charakteristika	Skaičius
<i>Visų ligonių skaičius</i>	31
<i>Lytis:</i>	
vyrai	27
moterys	4
<i>Amžius (metais):</i>	
Mediana	57
Vidurkis	60
Intervalas	42-81

4.1.2. Didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupė

Ištirti 22 pacientai, sergantys didelės rizikos odos melanoma. Visi pacientai 2007-2009 metais buvo gydyti Vilniaus universiteto Onkologijos instituto Torakalinės chirurgijos ir onkologijos skyriaus Galvos ir kaklo chirurgijos poskyryje.

Didelės rizikos odos melanomos grupei buvo priskirti ligoniai, kuriems nustatytos metastazės sritiniuose limfmazgiuose, ir atlikta pirminio naviko ekscizija bei sritinė limfadenektomija.

Pacientams kraujas buvo imamas 5-7-ą dieną po operacijos, kurios metu buvo atlikta pirminio naviko ekscizija ir / ar sritinių limfmazgių pašalinimas.

Pacientų duomenys pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė. Didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų charakteristikos

Charakteristika	Skaičius
<i>Visų ligonių skaičius</i>	22
<i>Lytis:</i>	
vyrai	12
moterys	10
<i>Amžius (metais):</i>	
Mediana	67
Vidurkis	65
Intervalas	40-86

4.1.3. Kontrolinė grupė

Ištirti 26 savanoriai sąlyginai sveiki kraujo donorai, kuriems kraujas buvo paimtas profilaktinio sveikatos patikrinimo metu 2007-2009 metų laikotarpiu.

Kontrolinės grupės asmenų duomenys pateikti 4 lentelėje.

4 lentelė. Kontrolinės grupės asmenų charakteristikos

Charakteristika	Skaičius
<i>Visų žmonių skaičius</i>	26
<i>Lytis:</i>	
vyras	11
moterys	15
<i>Amžius (metais):</i>	
Mediana	54,5
Vidurkis	56
Intervalas	41-81

4.2. Imuninės sistemos rodikliai

4.2.1. T limfocitų populiacijų ir subpopuliacijų nuošimčio ir koncentracijos reikšmių pasiskirstymo normalumo (parametriškumo) nustatymas

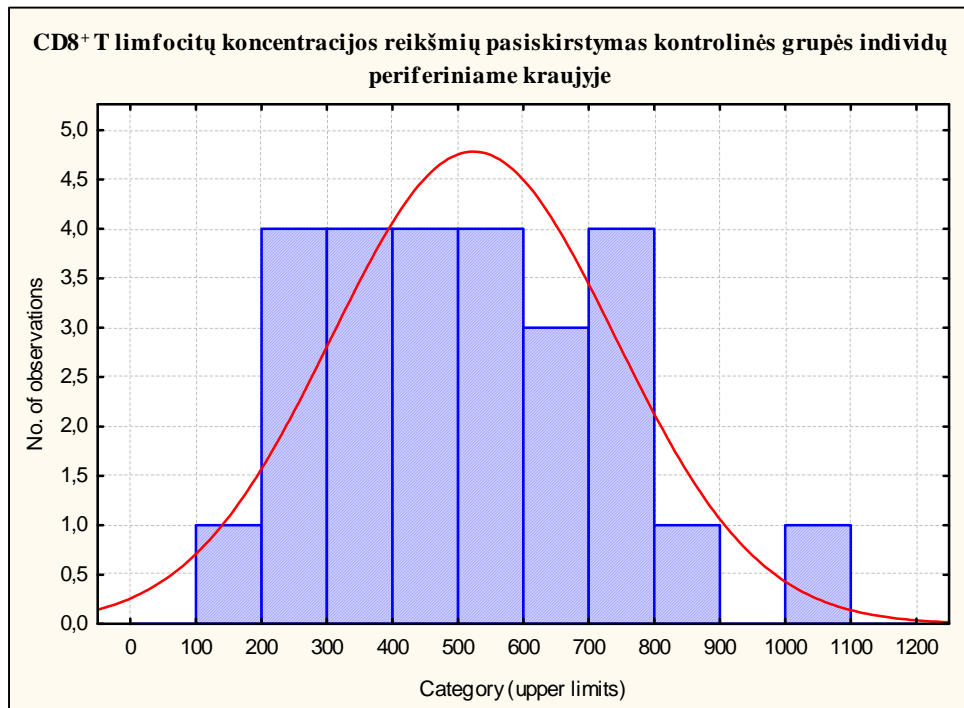
Visų mūsų nagrinėtų T limfocitų populiacijų ir subpopuliacijų nuošimčio bei koncentracijos reikšmių pasiskirstymo normalumas buvo įvertintas, taikant *Šapiro ir Vilko (Shapiro-Wilk's) W testą*, kurio rezultatai pateikti 5 lentelėje, o duomenų pasiskirstymo grafikų pavyzdžiai 3 ir 4 pav.

Priklausomai nuo duomenų pasiskirstymo pobūdžio, jų statistinei analizei buvo taikomi atitinkami matematiškai pagrįsti statistiniai metodai, kurie apibū-dinti skyrelyje „3.6. Statistiniai metodai“.

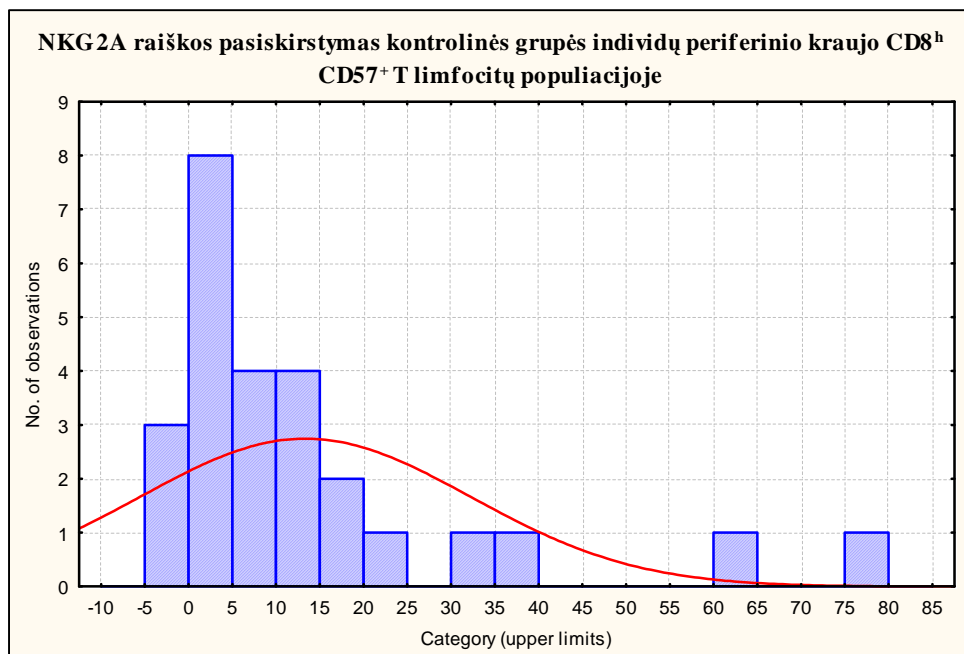
5 lentelė. T limfocitų populiacijų ir subpopuliacijų Šapiro ir Vilko W testo rezultatai

T limfocitai	Kontrolinė grupė		Inkstų vėžys		Melanoma	
	W	p	W	p	W	p
CD8 ⁺ % limfocitų populiacijoje	0,96009	0,4*	0,90543	0,00	0,94406	0,2*
CD8 ⁺ (ląst/μl)	0,96655	0,5*	0,93578	0,07*	0,95566	0,5*
CD8 ^h CD57 ⁺ % CD8 ⁺ T limfocitų populiacijoje	0,93730	0,1*	0,95688	0,2*	0,95184	0,3*
CD8 ^h CD57 ⁻ % CD8 ⁺ T limfocitų populiacijoje	0,93060	0,08*	0,96766	0,45*	0,95334	0,4*
CD8 ^{low} % CD8 ⁺ T limfocitų populiacijoje	0,96440	0,5*	0,96443	0,4*	0,93129	0,1*
FOXP3 ⁺ % CD8 ^h CD57 ⁺ T limfocitų populiacijoje	0,62374	0,02	0,73396	0,00	0,87891	0,00
FOXP3 ⁺ % CD8 ^h CD57 ⁻ T limfocitų populiacijoje	0,68965	0,00	0,47321	0,00	0,72285	0,00
CD8 ^h CD57 ⁺ FOXP3 ⁺ (ląst/μl)	0,69237	0,00	0,74221	0,00	0,42753	0,00
CD8 ^h CD57 ⁻ FOXP3 ⁺ (ląst/μl)	0,58625	0,00	0,47854	0,00	0,57121	0,00
NKG2A ⁺ % CD8 ^h CD57 ⁺ T limfocitų populiacijoje	0,58523	0,00	0,81624	0,00	0,84018	0,00
NKG2A ⁺ % CD8 ^h CD57 ⁻ T limfocitų populiacijoje	0,85718	0,00	0,74044	0,00	0,42753	0,00
CD8 ^h CD57 ⁺ NKG2A ⁺ (ląst/μl)	0,48477	0,00	0,66267	0,00	0,72149	0,00
CD8 ^h CD57 ⁻ NKG2A ⁺ (ląst/μl)	0,48573	0,00	0,82735	0,00	0,85224	0,00
Perforin ⁺ % CD8 ^h CD57 ⁺ T limfocitų populiacijoje	0,70226	0,00	0,88856	0,00	0,57121	0,00
Perforin ⁺ % CD8 ^h CD57 ⁻ T limfocitų populiacijoje	0,66723	0,00	0,85177	0,00	0,65935	0,00
CD8 ^h CD57 ⁺ Perforin ⁺ (ląst/μl)	0,80807	0,00	0,79279	0,00	0,65935	0,00
CD8 ^h CD57 ⁻ Perforin ⁺ (ląst/μl)	0,62605	0,00	0,60316	0,00	0,75730	0,00
IFNγ ⁺ % CD8 ^h CD57 ⁺ T limfocitų populiacijoje	0,70501	0,00	0,59313	0,00	0,75730	0,00
IFNγ ⁺ % CD8 ^h CD57 ⁻ T limfocitų populiacijoje	0,93687	0,1*	0,73376	0,00	0,72329	0,00
CD8 ^h CD57 ⁺ IFNγ ⁺ (ląst/μl)	0,34163	0,00	0,69258	0,00	0,72329	0,00
CD8 ^h CD57 ⁻ IFNγ ⁺ (ląst/μl)	0,60883	0,00	0,73902	0,00	0,47050	0,00

***parametrinis pasiskirstymas (kai $p > 0,05$)**



3 pav. Normalaus (parametrinio, simetrinio) duomenų pasiskirstymo pavyzdys

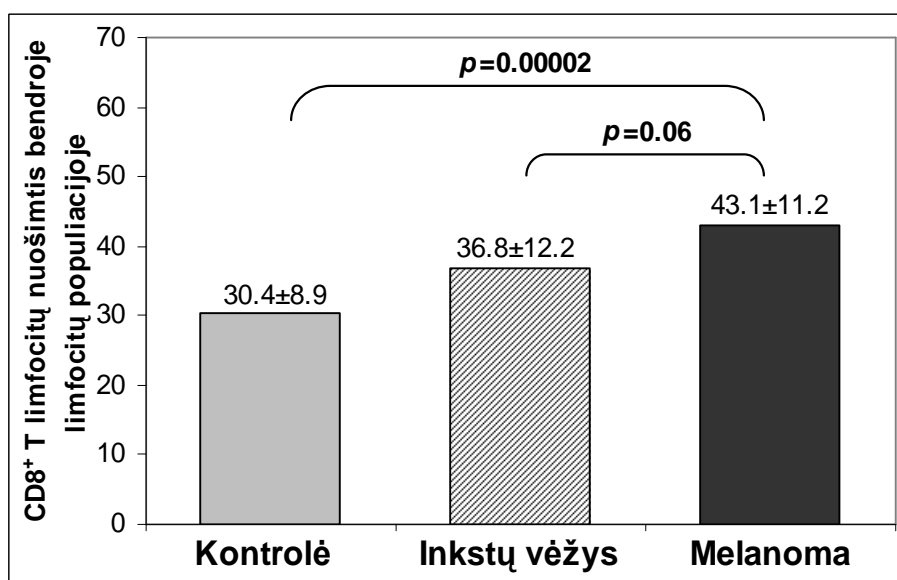


4 pav. Nenormalaus duomenų pasiskirstymo pavyzdys

4.2.2. CD8⁺ T limfocitų ir jų populiacijų kiekybiniai skirtumai tiriamųjų periferiniame kraujyje

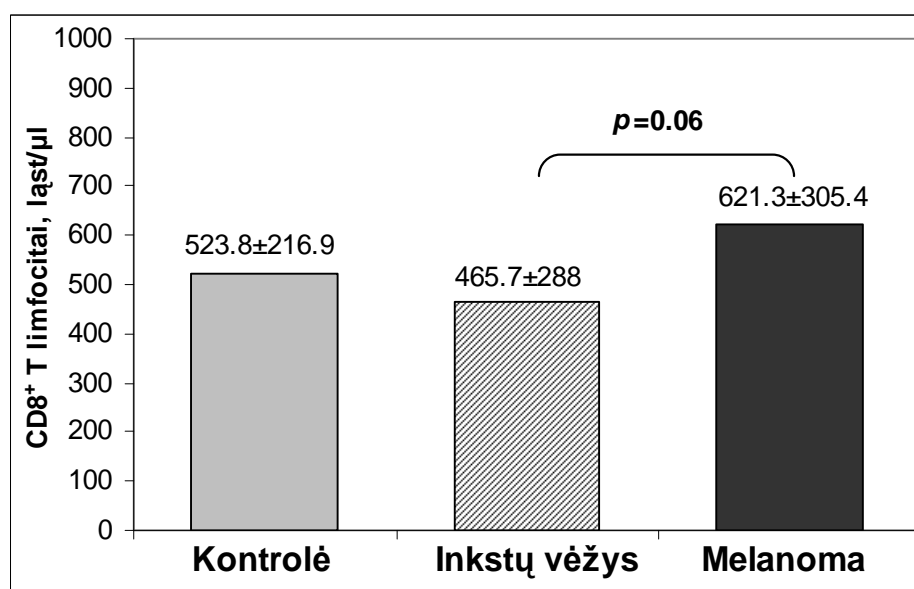
Lyginant periferinio kraujo CD8⁺ T limfocitų nuošimtį bendroje limfocitų populiacijoje, nustatyta, kad:

1. išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų periferiniame kraujyje statistiškai patikimų skirtumų nerasta, lyginant su kontroline grupe;
2. didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėje CD8⁺ T limfocitų nuošimtis limfocitų populiacijoje buvo statistiškai patikimai didesnis, lyginant su kontroline grupe;
3. tarp išplitusiu inkstų vėžiu ir didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupių, statistiškai patikimų skirtumų nerasta. Stebima tik tendencija, kad CD8⁺ T limfocitų nuošimtis yra didesnis didelės rizikos odos melanoma sergančių periferinio kraujo bendroje limfocitų populiacijoje (5 pav.).



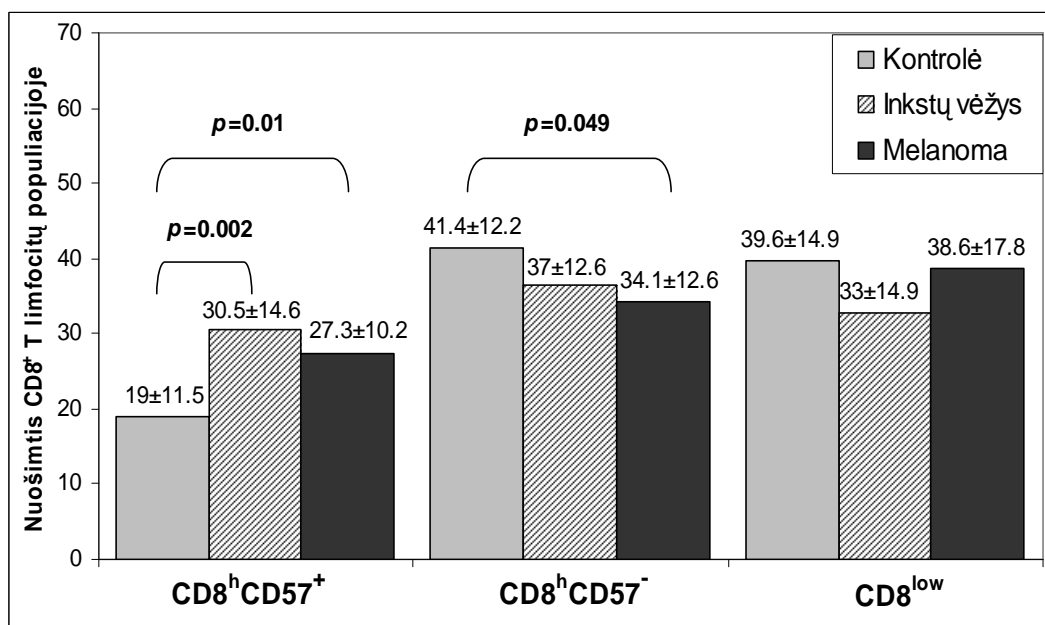
5 pav. CD8⁺ T limfocitų nuošimtis bendroje visų limfocitų populiacijoje kontrolinės grupės individų ($n = 26$) bei išplitusiu inkstų vėžiu ($n = 31$) ar didelės rizikos odos melanoma ($n = 22$) sergančių pacientų periferiniame kraujyje (*U testas*)

Vis dėlto, lyginant absoliučius CD8⁺ T limfocitų skaičius, kurie realiai atspindi specifinio ląstelinio imuninio atsako intensyvumą, statistiškai reikšmingų skirtumų tarp inkstų vėžiui ar odos melanoma sergančių pacientų ir kontrolinės grupės individų nerasta (6 pav.): inkstų vėžiui sergančių pacientų periferiniame kraujyje CD8⁺ T limfocitų buvo nežymiai mažiau, o odos melanoma sergančių pacientų grupėje - nežymiai daugiau, lyginant su kontrolinės grupės individualais. Stebima tik tendencija ($p = 0,06$), kad CD8⁺ T limfocitų yra daugiau odos melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje, lyginant su inkstų vėžiui sergančiais pacientais.



6 pav. CD8⁺ T limfocitų koncentracija (ląst/μl) kontrolinės grupės individų ($n = 26$) bei išplitusiu inkstų vėžiu ($n = 31$) ar didelės rizikos odos melanoma ($n = 22$) sergančių pacientų periferiniame kraujyje (t testas)

Detaliau analizuojant CD8⁺ T limfocitų populiaciją, buvo nustatytas įvairių subpopuliacijų kiekybinis persitvarkymas joje - lyginant su kontrolinės grupės individualais, išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėse buvo statistiškai patikimai išaugęs CD8^hCD57⁺ T limfocitų nuošimtis (7 pav.).

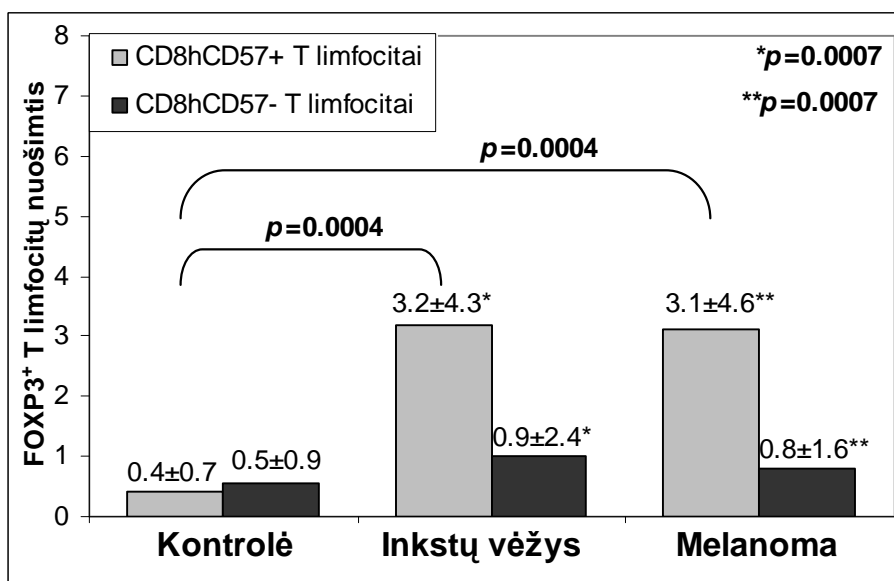


7 pav. Kiekybiniai persitvarkymai išplitusiu inkstų vėžiu ($n = 31$) ar didelės rizikos odos melanoma ($n = 22$) sergančių pacientų periferinio kraujo CD8⁺ T limfocitų populiacijoje, lyginant su kontroline grupe ($n = 26$) (*t* testas)

Lyginant išplitusiu inkstų vėžiu ir didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupes tarpusavyje, nerasta statistiškai reikšmingų kiekybinių skirtumų periferinio kraujo CD8⁺ T limfocitų populiacijoje (7 pav.).

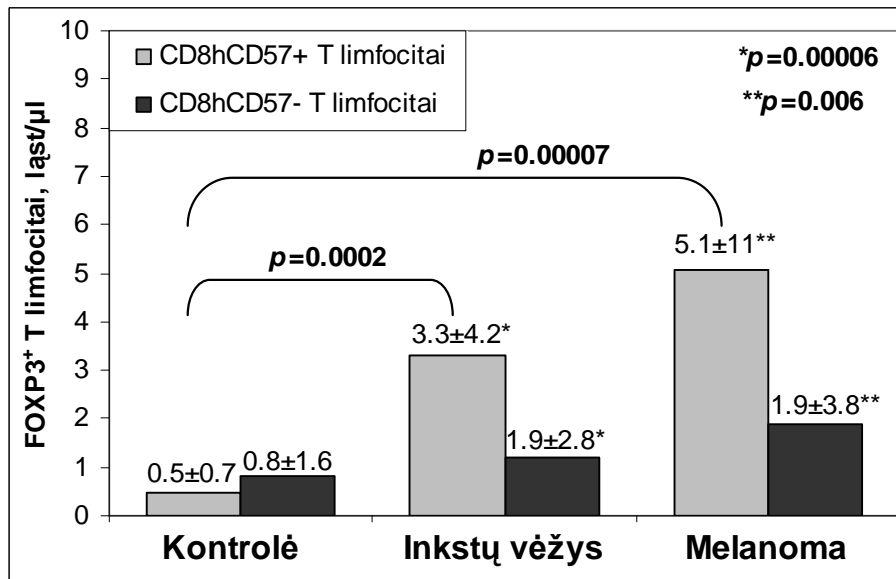
4.2.3. FOXP3 raiška tiriamųjų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijose

Tiriant CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiaciją, nustatyta, kad imunosupresines savybes atspindintį FOXP3 žymenį ekspresuojančių T ląstelių nuošimtis buvo statistiškai patikimai didesnis išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje, lyginant su kontroline grupe (8 pav.). Be to, CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ T limfocitų subpopuliacijos nuošimčio padidėjimas CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje buvo labai panašus abiejose onkologinių ligonių grupėse.



8 pav. FOXP3 ekspresuojančių T limfocitų nuošimčio skirtumai išplitusiu inkstų vėžiu ($n = 31$) ar didelės rizikos odos melanoma ($n = 22$) sergančių pacientų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijoje, lyginant su kontroline grupe ($n = 26$) (U testas)

Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolinės grupės individų ir išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupių buvo rasti ir lyginant CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ T limfocitų absoliučius skaičius (koncentraciją) periferiniame kraujyje (9 pav.).



9 pav. FOXP3 ekspresuojančių CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų koncentracijos skirtumai išplitusiu inkstų vėžiu (n = 31) ar didelės rizikos odos melanoma (n = 22) sergančių pacientų periferiniame kraujyje, lyginant su kontroline grupe (n = 26) (U testas)

Kontrolinės grupės individų periferiniame kraujyje FOXP3 ekspresuojančių T ląstelių buvo nežymiai daugiau CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijoje tiek lyginant nuošimtį, tiek ir absoliučius T limfocitų skaičius, tuo tarpu tirtų onkologinių ligonių periferiniame kraujyje FOXP3 ekspresuojančių T ląstelių nuošimtis ir absoliutūs skaičiai akivaizdžiai padidėjo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje (8 ir 9 pav.).

Pagal imunosupresinių CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ T ląstelių subpopuliacijos nuošimtį CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje, mūsų tirtus onkologinius ligonius ir kontrolinės grupės individus galima suskirstyti į atskiras grupes (6 lent.).

6 lentelė. Tiriamųjų skirstymas į grupes pagal $CD8^hCD57^+FOXP3^+$ T ląstelių subpopuliacijos nuošimtį $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje

$CD8^hCD57^+FOXP3^+$ T ląstelių nuošimtis $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje	Kontrolinės grupės individai (n = 26)	Inkstų vėžiu sergantys pacientai (n = 31)	Odos melanoma sergantys pacientai (n = 22)
0 (nėra)	n = 17 (65,4 %)	n = 7 (22,6 %)	n = 4 (18,2 %)
0,1-1 (mažai)	n = 4 (15,4 %)	n = 6 (19,3 %)	n = 6 (27,3 %)
1,1-2 (vidutiniškai)	n = 5 (19,2 %)	n = 5 (16,1 %)	n = 3 (13,6 %)
> 2 (2-20,54) - daug	n = 0 (0 %)	n = 13 (42 %)	n = 9 (40,9 %)

Tiriamieji į šias grupes buvo suskirstyti pagal FOXP3 žymenį ekspresuojančių $CD8^hCD57^+$ T limfocitų nuošimtį kontrolinės grupės individų periferiniame kraujyje, laikantis nuostatos, kad sveikų žmonių periferiniame kraujyje esanti dalis atitinka normos ribas.

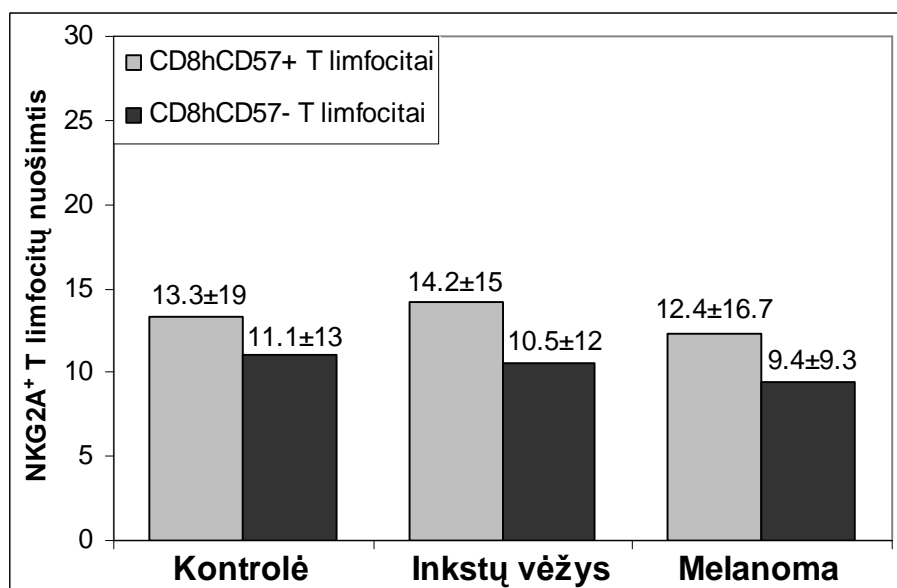
Tiriant FOXP3 žymens raišką $CD8^hCD57^-$ T limfocitų populiacijoje, statistškai reikšmingų skirtumų tarp tiriamųjų grupių nerasta nei lyginant nuošimtį, nei absoliučius T limfocitų skaičius (8 ir 9 pav.).

Lyginant FOXP3 ekspresuojančių T ląstelių nuošimtį ir absoliučius skaičius kontrolinės grupės individų periferinio kraujo $CD8^hCD57^+$ ir $CD8^hCD57^-$ T limfocitų populiacijose, statistškai patikimų skirtumų nerasta, tuo tarpu išplitusiu inkstų vėžiu bei didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėse FOXP3 raiška buvo statistškai patikimai didesnė $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje, lyginant su $CD8^hCD57^-$ T limfocitais (8 ir 9 pav.).

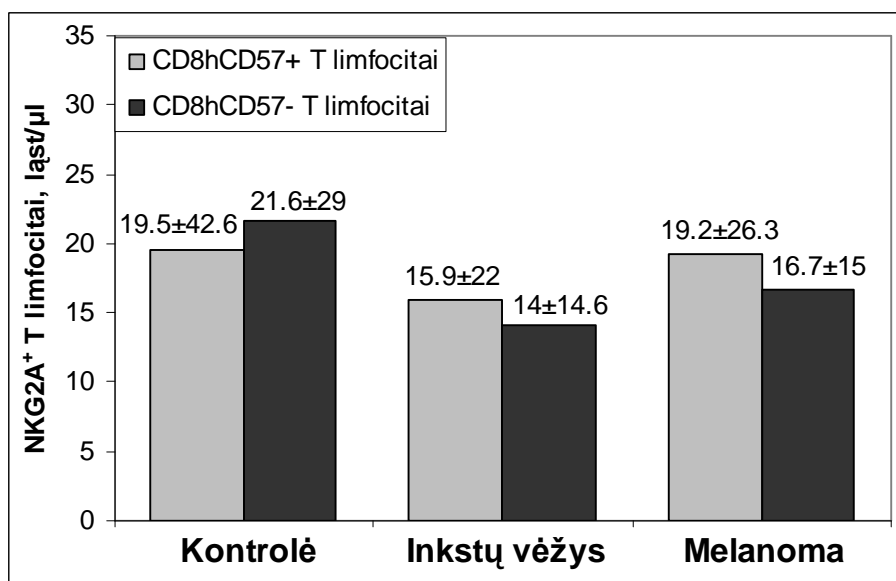
Šie rezultatai rodo, kad mūsų tirtų onkologinių ligonių periferiniame kraujyje esminiai FOXP3 raiškos skirtumai stebimi būtent $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje.

4.2.4. NKG2A (CD159a) raiška tiriamųjų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijose

Tiriant netiesiogines imunosupresines T limfocitų savybes atspindinčio paviršinio NKG2A žymens raišką CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje, statistškai patikimų skirtumų tarp tiriamųjų grupių nerasta nei lyginant NKG2A ekspresuojančių T ląstelių nuošimtį CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje, nei CD8^hCD57⁺NKG2A⁺ T limfocitų koncentraciją periferiniame kraujyje (10 ir 11 pav.).



10 pav. NKG2A ekspresuojančių T limfocitų nuošimtis išplitusiu inkstų vėžiu ($n = 31$) ar didelės rizikos odos melanoma ($n = 22$) sergančių pacientų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijose, lyginant su kontroline grupe ($n = 26$) (U testas)



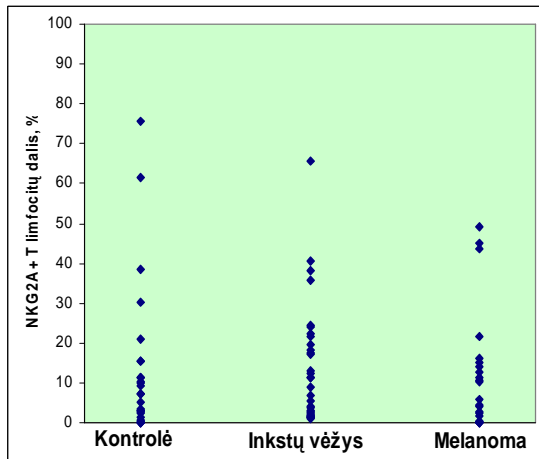
11 pav. NKG2A ekspresuojančių CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų koncentracija išplitusiu inkstų vėžiu ($n = 31$) ar didelės rizikos odos melanoma ($n = 22$) sergančių pacientų periferiniame kraujyje, lyginant su kontroline grupe ($n = 26$) (U testas)

Taip pat nerasta statistiškai patikimų NKG2A raiškos skirtumų CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijoje tarp tiriamųjų grupių (10 ir 11 pav.).

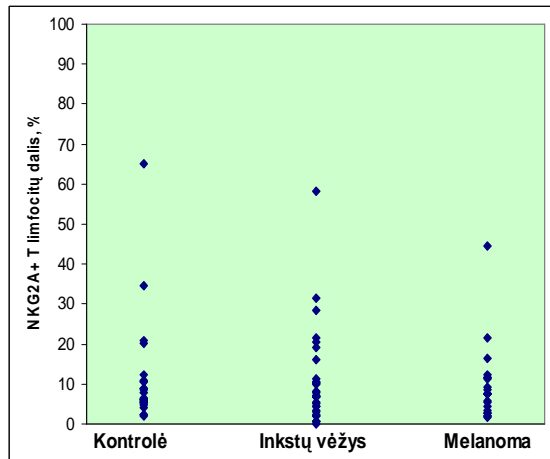
Lyginant NKG2A raišką CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijose, statistiškai patikimų skirtumų tarp tiriamųjų grupių nerasta (10 ir 11 pav.).

Šie rezultatai rodo, kad, lyginant su kontrolinės grupės individualais, išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijose statistiškai reikšmingų NKG2A raiškos skirtumų nėra.

Reikia paminėti, kad visose tiriamųjų individų grupėse NKG2A žymens raiška CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijose buvo labai dispersiška (12 ir 13 pav.).



12 pav. NKG2A raiškos išsibirstymas tiriamųjų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje



13 pav. NKG2A raiškos išsibirstymas tiriamųjų periferinio kraujo CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijoje

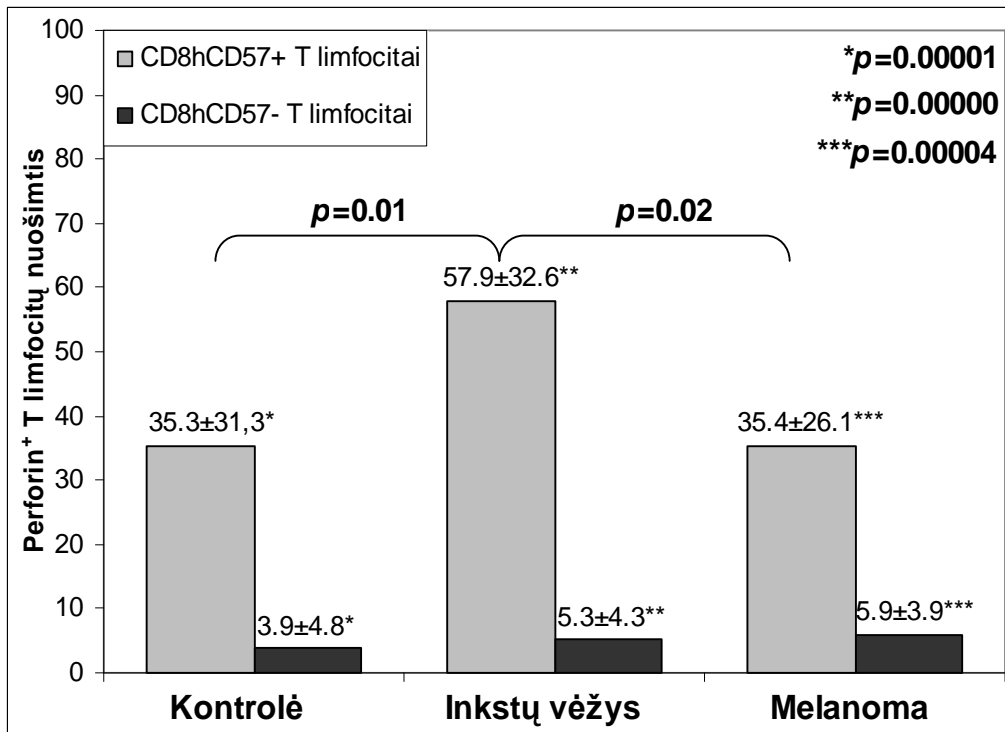
Pastebėtina, kad NKG2A raiškos išsibirstymas CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijose buvo labiausiai išreikštas kontrolinėje grupėje, o mažiausias išsibirstymas – didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėje. Be to, tirtų onkologinių ligonių periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje NKG2A raiškos išsibirstymas apie vidutinę reikšmę buvo tolygesnis, lyginant su kontroline grupe.

4.2.5. Perforino raiška tiriamųjų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijose

Tiriant CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiaciją, nustatyta, kad perforiną ekspresuojančių T ląstelių nuošimtis buvo statistiškai patikimai didesnis išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų periferiniame kraujyje, lyginant su kontrole, tuo tarpu didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje nerasta CD8^hCD57⁺Perforin⁺ T ląstelių subpopuliacijos nuošimčio skirtumų (14 pav.).

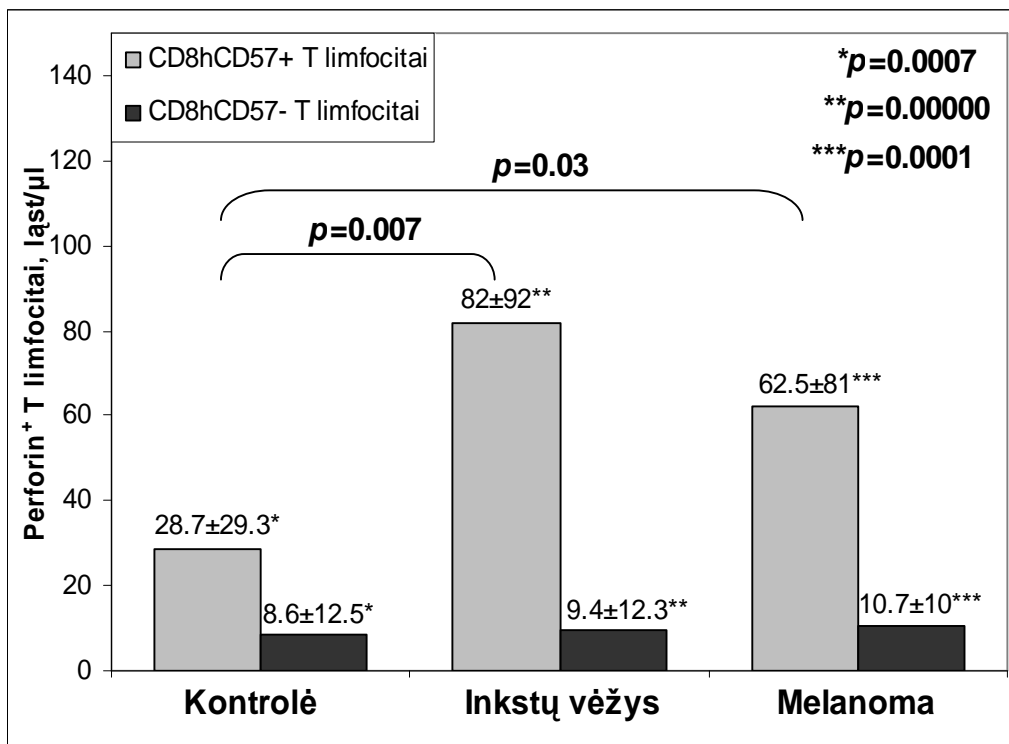
Lyginant išplitusiu inkstų vėžiu ir didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupes tarpusavyje, nustatyta, kad perforiną ekspresuojančių T ląstelių

nuošimtis buvo statistiškai patikimai didesnis išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje (14 pav.).



14 pav. Perforiną ekspresuojančių T limfocitų nuošimčio skirtumai išplitusiu inkstų vėžiu ($n = 31$) ar didelės rizikos odos melanoma ($n = 22$) sergančių pacientų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijose, lyginant su kontroline grupe ($n = 26$) (U testas)

Lyginant perforiną ekspresuojančių CD8^hCD57⁺ T limfocitų absoliučius skaičius tiriamųjų periferiniame kraujyje, rezultatai kiek skyrėsi - nustatyta, kad CD8^hCD57⁺Perforin⁺ T ląstelių buvo statistiškai patikimai daugiau tiek išplitusiu inkstų vėžiu, tiek ir didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėse, lyginant su kontrolinės grupės individualais, tuo tarpu statistiškai reikšmingų skirtumų tarp inkstų vėžiu ir odos melanoma sergančių pacientų grupių nerasta (15 pav.).



15 pav. Perforiną ekspresuojančių $CD8^hCD57^+$ ir $CD8^hCD57^-$ T limfocitų koncentracija išplitusiu inkstų vėžiu ($n = 31$) ar didelės rizikos odos melanoma ($n = 22$) sergančių pacientų periferiniame kraujyje, lyginant su kontroline grupe ($n = 26$) (U testas)

Pagal $CD8^hCD57^+$ Perforin⁺ T ląstelių subpopuliacijos nuošimtį $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje, mūsų tirtus onkologinius ligonius ir kontrolinės grupės individus galima suskirstyti į atskiras grupes (7 lent.).

7 lentelė. Tiriamųjų skirstymas į grupes pagal $CD8^hCD57^+Perforin^+$ T ląstelių subpopuliacijos nuošimtį $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje

$CD8^hCD57^+Perforin^+$ T ląstelių nuošimtis $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje	Kontrolinės grupės individai (n = 26)	Inkstų vėžiu sergantys pacientai (n = 31)	Odos melanoma sergantys pacientai (n = 22)
Iki 13,74 (mažai)	n = 12 (46,1 %)	n = 6 (19,3 %)	n = 5 (22,7 %)
13,75-55,55 (vidutiniškai)	n = 6 (23,1 %)	n = 7 (22,6 %)	n = 13 (59,1 %)
55,56-84,74 (daug)	n = 6 (23,1 %)	n = 10 (32,3 %)	n = 2 (9,1 %)
> 84,74 (labai daug)	n = 2 (7,7 %)	n = 8 (25,8 %)	n = 2 (9,1 %)

Tiriamieji į šias grupes buvo suskirstyti pagal perforiną ekspresuojančių $CD8^hCD57^+$ T limfocitų nuošimtį kontrolinės grupės individų periferiniame kraujyje, laikantis nuostatos, kad sveikų žmonių kraujyje esanti dalis atitinka normos ribas.

Tiriant perforino raišką periferinio kraujo $CD8^hCD57^-$ T limfocitų populiacijoje, statistiškai patikimų skirtumų tarp tiriamųjų grupių nerasta nei lyginant perforiną ekspresuojančių T ląstelių nuošimtį $CD8^hCD57^-$ populiacijoje, nei $CD8^hCD57^+Perforin^+$ T limfocitų koncentraciją periferiniame kraujyje (14 ir 15 pav.).

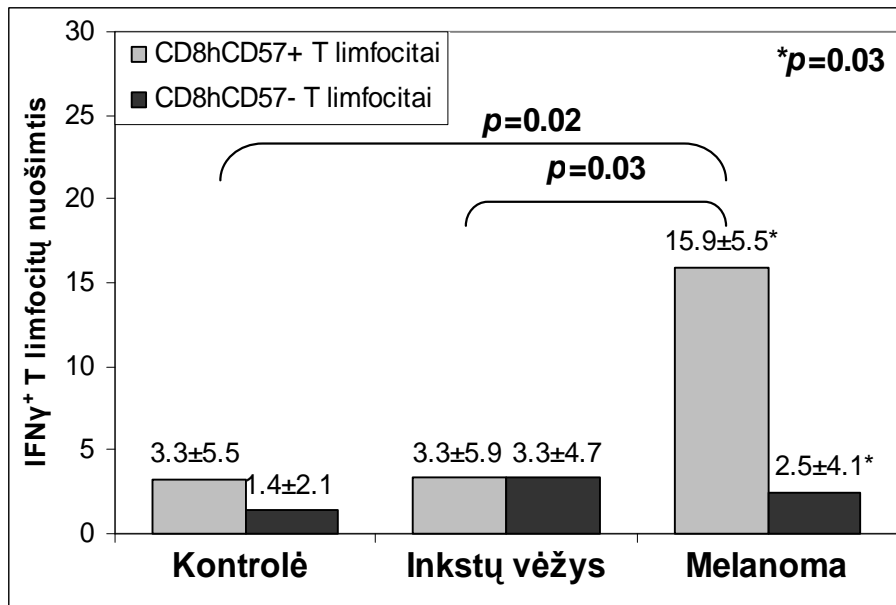
Tiriant perforino raiškos skirtumus tarp $CD8^hCD57^+$ ir $CD8^hCD57^-$ T limfocitų populiacijų, nustatyta, kad visose tiriamųjų grupėse perforinas buvo statistiškai patikimai gausiau ekspresuojamas $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje (14 ir 15 pav.).

Gauti rezultatai rodo, kad tiek sveikų žmonių, tiek ir tirtų onkologinių ligonių $CD8^hCD57^+$ T limfocitai yra kur kas labiau linkę ekspresuoti perforiną nei CD^hCD57^- T limfocitai.

4.2.6. Viduląstelinio IFN γ raiška tiriamųjų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijose

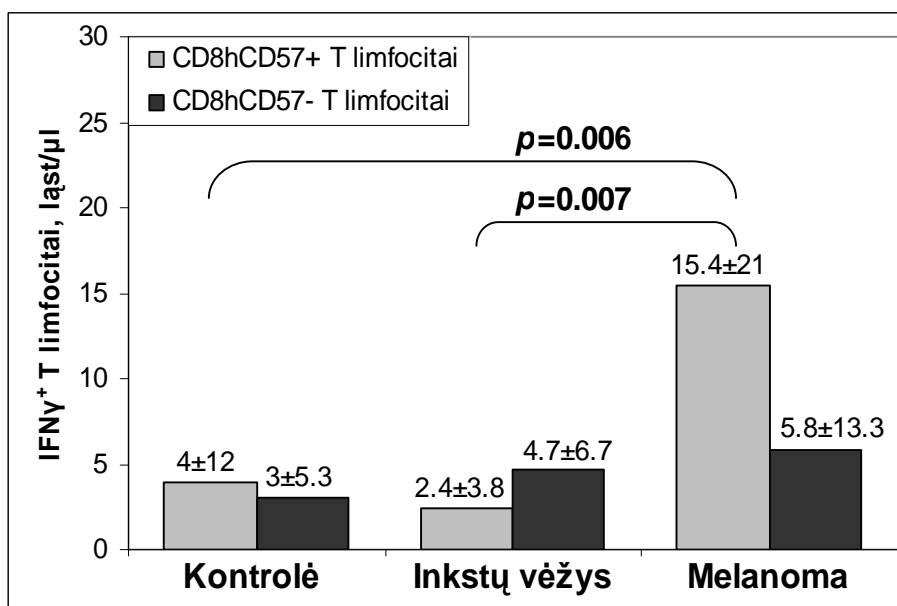
Tiriant viduląstelinio IFN γ raišką CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje, nustatyta, kad ši citotoksines ir imunomoduliuojančias savybes atspindintį žymenį ekspresuojančių CD8^hCD57⁺ T limfocitų nuošimtis buvo statistiškai patikimai didesnis didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje, lyginant su kontroline grupe, o tarp išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų ir kontrolinės grupės individų nerasta viduląstelinio IFN γ raiškos skirtumų CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje (16 pav.).

Statistiškai reikšmingi viduląstelinio IFN γ raiškos skirtumai CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje nustatyti tarp išplitusiu inkstų vėžiu ir didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupių – pastarojoje CD8^hCD57⁺IFN γ ⁺ T limfocitų nuošimtis buvo statistiškai patikimai didesnis (16 pav.).



16 pav. Viduląstelinį IFN γ ekspresuojančių T limfocitų nuošimčio skirtumai išplitusiu inkstų vėžiu ($n = 21$) ar didelės rizikos odos melanoma ($n = 16$) sergančių pacientų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijose, lyginant su kontroline grupe ($n = 22$) (U testas)

Lyginant viduląstelinį IFN γ ekspresuojančių CD8^hCD57⁺ T limfocitų koncentraciją tiriamųjų periferiniame kraujyje, tendencijos išliko tokios pačios - CD8^hCD57⁺IFN γ ⁺ T ląstelių buvo statistiškai patikimai daugiau didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėje, lyginant su kontroline grupe, o tarp išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų ir kontrolinės grupės individų statistiškai patikimų CD8^hCD57⁺IFN γ ⁺ T ląstelių koncentracijos skirtumų periferiniame kraujyje nerasta. Lyginant onkologinių ligonių grupes tarpusavyje, nustatyta, kad CD8^hCD57⁺IFN γ ⁺ T limfocitų koncentracija buvo statistiškai patikimai didesnė odos melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje (17 pav.).



17 pav. Viduląstelinį IFN γ ekspresuojančių CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų koncentracija išplitusiu inkstų vėžiu ($n = 21$) ar didelės rizikos odos melanoma ($n = 16$) sergančių pacientų periferiniame kraujyje, lyginant su kontroline grupe ($n = 22$) (*U testas*)

Pagal CD8^hCD57⁺IFN γ ⁺ T ląstelių subpopuliacijos nuošimtį CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje, kontrolinės grupės individus ir išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančius pacientus galima suskirstyti į atskiras grupes (8 lent.).

8 lentelė. Tiriamųjų skirstymas į grupes pagal $CD8^hCD57^+IFN\gamma^+$ T ląstelių subpopuliacijos nuošimtį $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje

$CD8^hCD57^+IFN\gamma^+$ T ląstelių nuošimtis $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje	Kontrolinės grupės individai (n = 22)	Inkstų vėžiu sergantys pacientai (n = 21)	Odos melanoma sergantys pacientai (n = 16)
0 (nėra)	n = 11 (50 %)	n = 8 (38 %)	n = 3 (18,75 %)
0,1-10 (mažai)	n = 9 (40,9 %)	n = 11 (52,4 %)	n = 7 (43,75 %)
10,1-23 (vidutiniškai)	n = 2 (9,1 %)	n = 1 (4,8 %)	n = 3 (18,75 %)
> 23 (daug)	0 (0 %)	n = 1 (4,8 %)	n = 3 (18,75 %)

Tiriamieji į grupes buvo suskirstyti pagal viduląstelinį $IFN\gamma$ ekspresuojančių $CD8^hCD57^+$ T limfocitų nuošimtį kontrolinės grupės individų periferiniame kraujyje, laikantis nuostatos, kad sveikų individų kraujyje esanti šių T limfocitų dalis atitinka normos ribas.

Tiriant viduląstelinio $IFN\gamma$ raišką $CD8^hCD57^-$ T limfocitų populiacijoje, statistiškai patikimų skirtumų tarp tiriamųjų grupių nerasta nei lyginant $IFN\gamma$ ekspresuojančių T ląstelių nuošimtį $CD8^hCD57^-$ T limfocitų populiacijoje, nei $CD8^hCD57^+IFN\gamma^+$ T ląstelių koncentraciją periferiniame kraujyje (16 ir 17 pav.).

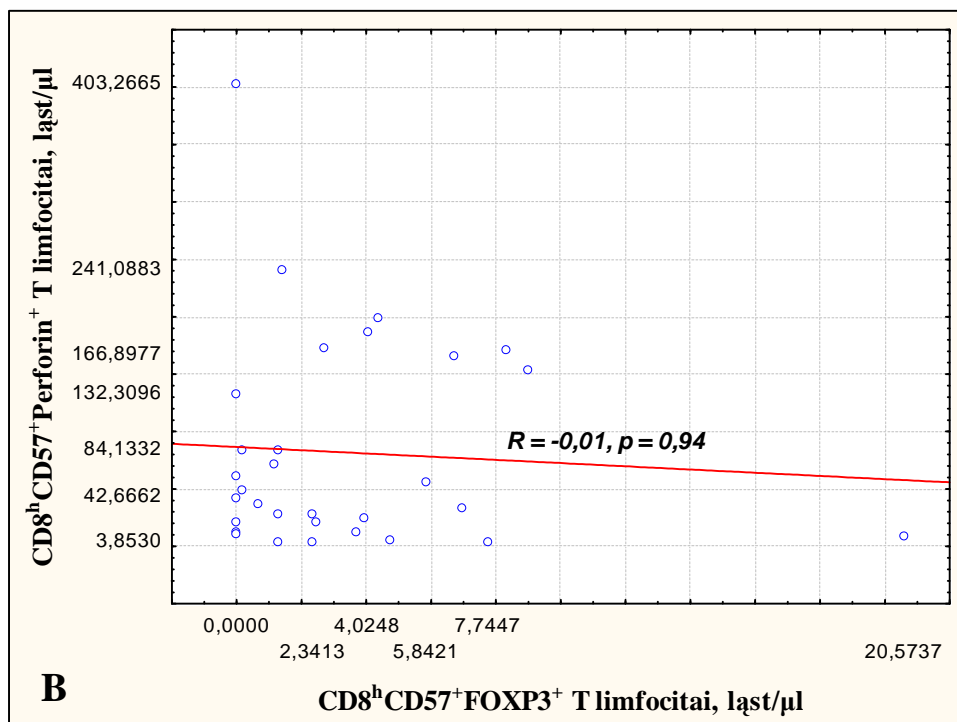
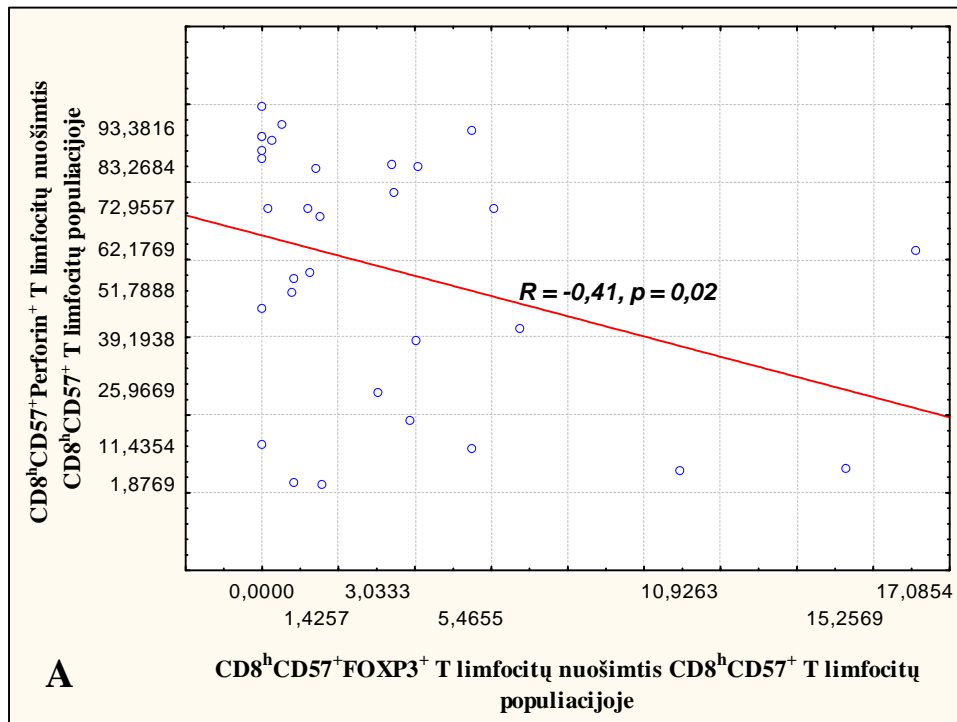
Tiriant viduląstelinį $IFN\gamma$ ekspresuojančių T ląstelių nuošimčio skirtumus tarp periferinio kraujo $CD8^hCD57^+$ ir $CD8^hCD57^-$ T limfocitų populiacijų, nustatyta, kad kontrolinės grupės individų bei išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų grupėse nebuvo statistiškai patikimų $IFN\gamma$ raiškos skirtumų tarp minėtų populiacijų, tuo tarpu didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėje $IFN\gamma$ raiška buvo statistiškai patikimai didesnė $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje, lyginant su $CD8^hCD57^-$ T limfocitais (16 pav.).

Lyginant $CD8^hCD57^+IFN\gamma^+$ ir $CD8^hCD57^-IFN\gamma^+$ T limfocitų koncentracijų skirtumus periferiniame kraujyje, statistiškai patikimų skirtumų nerasta nei vienoje tiriamųjų grupėje (17 pav.).

4.2.7. Sąsajos tarp imunosupresines ir citotoksines bei imunomoduliuojančias savybes atspindinčių žymenų raiškos tirtų onkologinių ligonių periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje

Nustačius, kad išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje stebimi statistiškai reikšmingi imunosupresines bei citotoksines ir imunomoduliuojančias T limfocitų savybes atspindinčių žymenų raiškos skirtumai, siekta išsiaiškinti, ar yra koreliacija tarp šių žymenų raiškos.

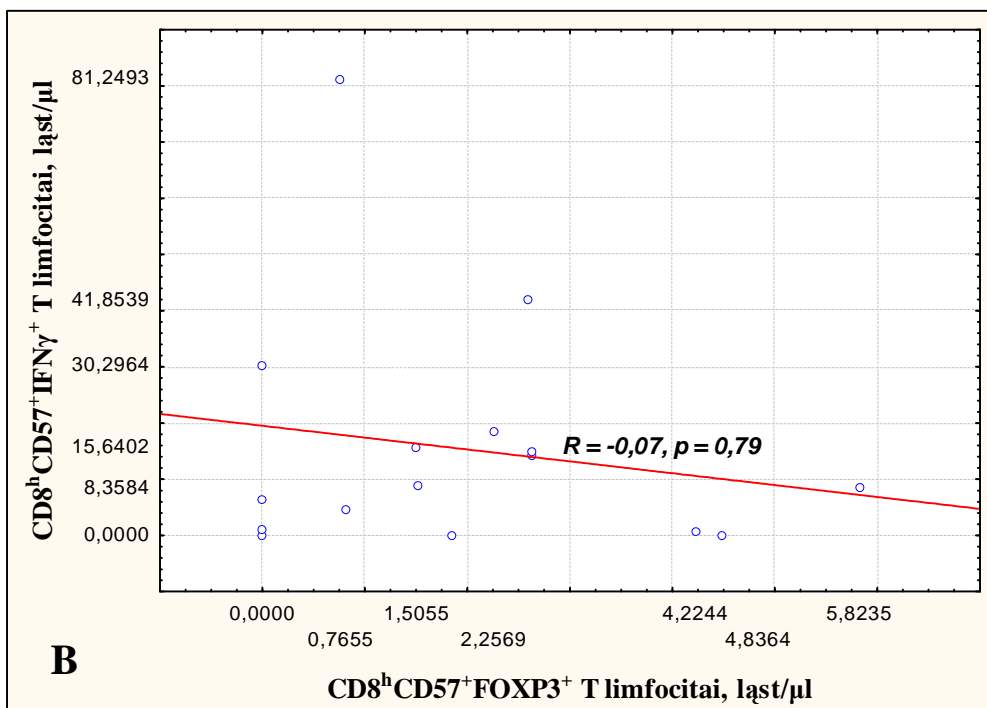
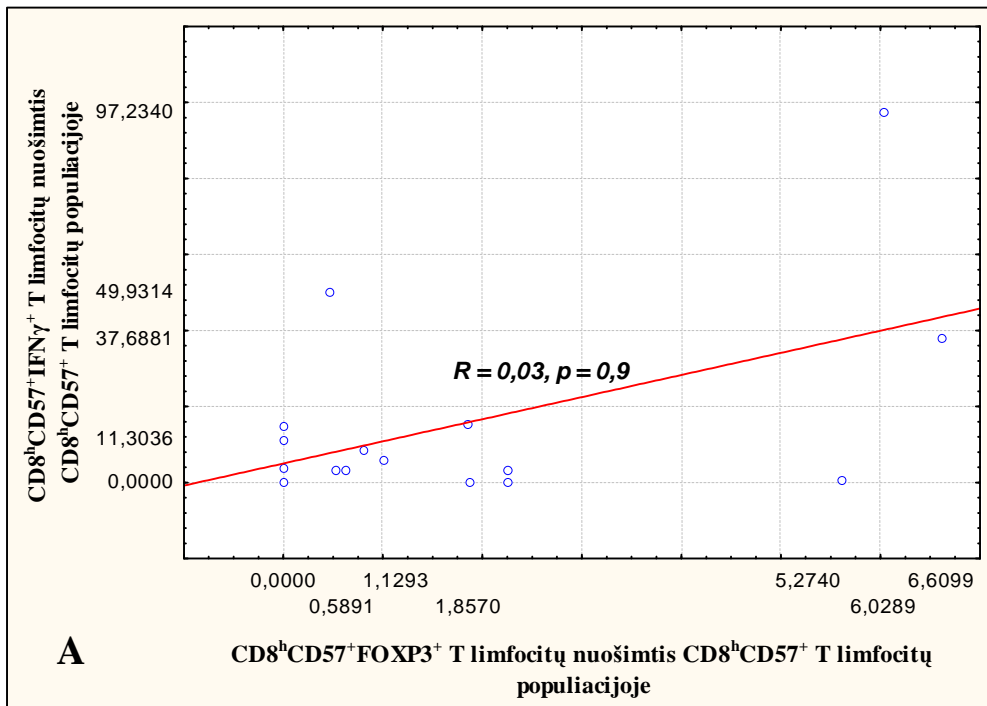
Nustatyta, kad išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų grupėje nėra stiprios ir biologiškai reikšmingos koreliacijos tarp FOXP3 ir perforino raiškos periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje, t. y. šių žymenų raiška yra tarpusavyje nepriklausoma, lyginant tiek FOXP3 ar perforiną ekspresuojančių T ląstelių nuošimtį CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje (18A pav.), tiek CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ ir CD8^hCD57⁺Perforin⁺ T limfocitų absoliučius skaičius periferiniame kraujyje (18B pav.).



18 pav. *Sirmeno ranginė koreliacija tarp FOXP3 ir perforino raiškos išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų grupėje: A – tiriant FOXP3 ar perforiną ekspresuojančių T ląstelių nuošimtį CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje, B – tiriant CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ ir CD8^hCD57⁺Perforin⁺ T limfocitų absoliučius skaičius periferiniame kraujyje*

Nustatyta, kad didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėje taip pat nėra statistiškai reikšmingos koreliacijos tarp FOXP3 ir IFN γ raiškos periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje, tiek lyginant FOXP3 ar viduląstelinį IFN γ ekspresuojančių T ląstelių nuošimtį CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje, tiek CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ ir CD8^hCD57⁺IFN γ ⁺ T limfocitų absoliučius skaičius tiriamųjų periferiniame kraujyje (19 pav.).

Išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų grupėje rasta individų, kurių periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje buvo labai didelis perforiną ekspresuojančių T limfocitų nuošimtis (> 84,74 %), tačiau visai nerasta FOXP3 ekspresuojančių T limfocitų (9 lent.).



19 pav. *Spirmeno ranginė koreliacija tarp FOXP3 ir IFN γ raiškos didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėje: A – tiriant FOXP3 ar viduląstelinį IFN γ ekspresuojančių T ląstelių nuošimtį CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje, B – tiriant CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ ir CD8^hCD57⁺IFN γ ⁺ T limfocitų absoliučius skaičius periferiniame kraujyje*

9 lentelė. FOXP3 bei perforiną ekspresuojančių T ląstelių nuošimtis išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje

Ligonio kodas	CD8 ^h CD57 ⁺ FOXP3 ⁺ T ląstelių nuošimtis CD8 ^h CD57 ⁺ T limfocitų populiacijoje	CD8 ^h CD57 ⁺ Perforin ⁺ T ląstelių nuošimtis CD8 ^h CD57 ⁺ T limfocitų populiacijoje
GAD	0,85 (mažai)	55,4 (vidutiniškai)
BAR	3,03 (daug)	25,97 (vidutiniškai)
BAC	0 (nėra)	99,58 (labai daug)
ZAB	1,53 (vidutiniškai)	71,22 (daug)
KAR	6,06 (daug)	73,21 (daug)
ELJ	0,25 (mažai)	90,62 (labai daug)
DOM	0 (nėra)	12,43 (mažai)
ABL	1,19 (vidutiniškai)	72,98 (daug)
MIL	0 (nėra)	85,85 (labai daug)
VEG	4,04 (daug)	39,19 (vidutiniškai)
OKU	3,4 (daug)	84,70 (daug)
MOT	0 (nėra)	91,82 (labai daug)
SAV	0 (nėra)	47,27 (vidutiniškai)
TICH	0 (nėra)	91,70 (labai daug)
JAK	0,16 (mažai)	72,96 (daug)
BAL	4,09 (daug)	84,10 (daug)
MALV	0 (nėra)	88,28 (labai daug)
GEL	3,46 (daug)	77,17 (daug)
SAK	0,77 (mažai)	51,79 (vidutiniškai)
SUT	15,26 (daug)	6,32 (mažai)
SIM	0,54 (mažai)	94,97 (labai daug)
KAU	1,23 (vidutiniškai)	56,62 (daug)
MALM	10,93 (daug)	5,63 (mažai)
SUR	0,85 (mažai)	2,60 (mažai)
OZA	1,55 (vidutiniškai)	1,88 (mažai)
KIS	1,43 (vidutiniškai)	83,27 (daug)
MAR	17,09 (daug)	62,18 (daug)
VAL	5,5 (daug)	11,44 (mažai)
SAL	3,89 (daug)	18,45 (vidutiniškai)
PET	5,47 (daug)	93,38 (labai daug)
VEN	6,72 (daug)	42,06 (vidutiniškai)

Didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėje šis reiškinys nebuvo toks būdingas – rasta tik viena pacientė, kurios CD8^hCD57⁺ T limfocitų

populiacijoje vidulastelinio IFN γ raiška buvo didelė (> 23 %), o FOXP3 – maža (0,1-1 %) (10 lent.). Beje, rasti du pacientai, kurių CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje vidulastelinio IFN γ raiška buvo vidutinė (10,1-23 %), o FOXP3 visai nebuvo (10 lent.). Reikia atkreipti dėmesį ir į tai, kad perforino raiška CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje buvo tiriama visiems tyrime dalyvavusiems išplitusiu inkstų vėžiu sergantiems pacientams (n = 31), o didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėje IFN γ raiška CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje buvo nustatyta tik 16 tiriamųjų.

10 lentelė. FOXP3 ar IFN γ ekspresuojančių T ląstelių nuošimtis didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje

Ligonio kodas	FOXP3 ⁺ T ląstelių nuošimtis CD8 ^h CD57 ⁺ T limfocitų populiacijoje	IFN γ ⁺ T ląstelių nuošimtis CD8 ^h CD57 ⁺ T limfocitų populiacijoje
VAI	0,63 (mažai)	3,45 (mažai)
TUB	0,47 (mažai)	49,93 (daug)
PET	2,25 (daug)	3,24 (mažai)
BALM	0 (nėra)	11,30 (vidutiniškai)
VRU	2,26 (daug)	0 (nėra)
VDO	5,62 (daug)	0,79 (mažai)
MIK	6,03 (daug)	97,23 (daug)
DOV	1,86 (vidutiniškai)	15,19 (vidutiniškai)
AUG	0 (nėra)	0 (nėra)
PEI	1,88 (vidutiniškai)	0 (nėra)
RAD	0 (nėra)	3,81 (mažai)
BUB	1,02 (mažai)	5,81 (mažai)
ZAC	5,27 (daug)	nenustatyta
RAM	0 (nėra)	14,81 (vidutiniškai)
STR	20,54 (daug)	nenustatyta
BALV	1,13 (vidutiniškai)	nenustatyta
RUS	2,25 (daug)	nenustatyta
SVE	6,61 (daug)	37,69 (daug)
STA	0,53 (mažai)	3,08 (mažai)
SAK	8,76 (daug)	nenustatyta
KRI	0,59 (mažai)	nenustatyta
PLE	0,82 (mažai)	8,49 (vidutiniškai)

5. REZULTATŲ APTARIMAS

Šis tyrimas buvo atliktas, siekiant įvertinti skirtingas funkcines savybes atspindinčių žymenų raiškos kiekybinius skirtumus onkologinių ligonių periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijose, lyginant su kontroline grupe. Tyrimams pasirinkome dvi nozologines vėžio 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 (23-25,27,28). 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 (26-28,217,219). Taigi istoriškai susiklostė tokia situacija, kad šie navikai yra vieni parankiausių, tiriant sąsajas tarp piktybinio proceso ir imuninės sistemos pokyčių.

Prieš tirdami CD8^hCD57⁺ bei CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijų ir jų subpopuliacijų kiekybinius skirtumus, palyginome CD8⁺ T limfocitų koncentraciją (absoliučius CD8⁺ T limfocitų skaičius) tiriamųjų periferiniame kraujyje. Mūsų duomenimis, išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje nestebėta statistiškai reikšmingų CD8⁺ T limfocitų koncentracijos skirtumų, lyginant su kontrolinės grupės individais (6 pav.). Tiesa, vertinant CD8⁺ T limfocitų nuošimtį bendroje limfocitų populiacijoje, nustatyta, kad jis buvo statistiškai patikimai didesnis odos melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje, lyginant su kontroline grupe (5 pav.). Tačiau vertinti CD8⁺ T limfocitų nuošimčio bendroje limfocitų populiacijoje skirtumus nėra racionalu - kur kas objektyviau ir informatyviau specifinio citotoksinio imuninio atsako pajėgumą atspindi absoliutus CD8⁺ T limfocitų skaičius, t. y. jų koncentracija (ląst/μl) periferiniame kraujyje.

Nors CD8⁺ T limfocitų koncentracija tirtųjų periferiniame kraujyje statistiškai patikimai nesiskyrė, tačiau vyko įvairių CD8⁺ T limfocitų populiacijų kiekybinis persitvarkymas, statistiškai reikšmingai padidėjant CD8^hCD57⁺ T lim-

focitų populiacijai išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje, lyginant su kontrolinės grupės individais (7 pav.). Kiti autoriai taip pat nustatė $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijos pagausėjimą onkologinių ligonių periferiniame kraujyje ar / ir pačiame navikiniame audinyje (12,48,143,166-168). Taigi, jei šios populiacijos padidėjimas yra stebimas įvairiomis vėžio formomis sergančių pacientų organizme, tikėtina, kad tai susiję su navikine patologija, todėl $CD8^hCD57^+$ T limfocitai gali būti svarbus priešnavikinio imuninio atsako komponentas.

Apibūdinant $CD8^hCD57^+$ T limfocitų funkcines savybes, pateikiami prieštaringi duomenys – vieni autoriai šiuos T limfocitus traktuoja kaip imunosupresinius ir $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijos gausėjimą sieja su imuninio atsako slopinimu, kas yra naudinga kontroliuojant alotransplantato atmetimą ar autoimunines reakcijas, tačiau nepageidautina onkologinės patologijos atveju (19,20,149,168,175,176,178-180). Kiti autoriai teigia, kad $CD8^hCD57^+$ T limfocitai pasižymi stipriu citotoksiniu bei imunomoduliuojančiu poveikiu ir yra aktyvus specifinio ląstelinio imuninio atsako komponentas (13,14,16,48,165,171,201-203).

Taigi, apibendinant įvairių tyrėjų pateikiamus rezultatus, aiškėja, kad $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacija yra labai heterogeniška, t. y. sudaryta iš įvairių subpopuliacijų, pasižyminčių citotoksiniu (165,201), citotoksiniu / imunomoduliuojančiu (169,203) bei imunosupresiniu poveikiais (19,20,149,168).

Akivaizdu, jog vien tik $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijos nuošimčio nustatymas onkologinėmis ligomis sergančių pacientų periferinio kraujo $CD8^+$ T limfocitų populiacijoje neatskleidžia $CD8^hCD57^+$ 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 $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje – toks ir buvo šio darbo tikslas.

Toliau aptariami imunosupresines, citotoksines bei imunomoduliuojančias T limfocitų savybes atspindinčių žymenų raiškos skirtumai mūsų tirtų individų grupių periferinio kraujo $CD8^hCD57^+$ ir $CD8^hCD57^-$ T limfocitų populiacijose.

Pagal konkrečių biožymenų raišką, CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijas galima suskirstyti į atskiras subpopuliacijas - imunosupresines (FOXP3⁺, NKG2A⁺), citotoksines (Perforin⁺) ar citotoksines / imunomoduliuojančias (IFNγ⁺).

Aptariant rezultatus, vertinami ne mūsų tirtų subpopuliacijų koncentracijos (absoliučių skaičių), o jų nuošimčio skirtumai išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijose, lyginant su kontroline grupe, nes būtent skirtingų subpopuliacijų nuošimčio skirtumai atspindi vidinius persitvarkymus, vykstančius minėtose T limfocitų populiacijose.

Mūsų duomenimis, net 65 % kontrolinės grupės individų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje imunosupresinės CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ subpopuliacijos visai nėra, tuo tarpu tarp išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų tokių individų yra tik atitinkamai 23 % ir 18 % (6 lent.). Įdomu yra tai, kad klinikinis atsakas į priešnavikinę citokinų imunoterapiją (skiriant sisteminių rIFNα ar rIL-2) pasiekiamas tik apie 10-20 % išplitusiu inkstų vėžiu ar odos melanoma sergančių pacientų (27,28,219,235, 237), todėl neatmestina prielaida, jog priešnavikinė imunoterapija veiksminga būtent tiems onkologiniams ligoniams, kurie visai neturi imunosupresiniu poveikiu pasižyminčios CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ T limfocitų subpopuliacijos.

Svarbu tai, kad net 42 % išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų ir 41 % didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje imunosupresinių CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ T ląstelių subpopuliacija buvo labai padidėjusi ir sudarė daugiau nei 2 % visų CD8^hCD57⁺ T limfocitų, tuo tarpu kai kontrolinėje grupėje nerasta nei vieno individo su taip išreikšta imunosupresinių CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ T limfocitų subpopuliacija (6 lent.). 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 imunosupresi-

niu 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.

Reikia paminėti, kad kontrolinėje grupėje taip pat buvo rasta individų, kurių periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje nustatyta imunosupresinė CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ T limfocitų subpopuliacija. Tačiau jos nuošimtis sąlyginai sveikų individų kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje buvo mažas arba vidutinis (6 lent.). Be to, tarp išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančiųjų, tokių individų buvo, nors ir nežymiai, bet daugiau. Tai vėlgi rodo, jog imunosupresinės CD8^hCD57⁺FOXP3⁺ T limfocitų subpopuliacijos pagausėjimas (net ir mažas arba vidutinis) yra labiau būdingas onkologiniams ligoniams.

Tiriant FOXP3 žymens raišką CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje, nerasta statistiškai patikimų skirtumų tarp tiriamųjų grupių.

Taigi, apibendrinant FOXP3 raiškos skirtumų tiriamųjų grupėse rezultatus, paaiškėja, kad esminiai šio imunosupresinės T limfocitų savybes atspindinčio žymens raiškos skirtumai stebimi onkologinių ligonių CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje.

Tiriant netiesiogines imunosupresines savybes atspindinčio NKG2A (CD159a) žymens raišką CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje, nerasta statistiškai patikimų skirtumų tarp tiriamųjų grupių. Reikia paminėti, kad visose tirtose grupėse tarp individų labai skyrėsi NKG2A ekspresuojančių T ląstelių nuošimtis CD8^hCD57⁺ T ir CD8^hCD57⁻ limfocitų populiacijose (12 ir 13 pav.). Mūsų rezultatai sutampa su Casado ir bendraautorų, kurie taip pat nustatė, kad NKG2A (kaip ir kitų inhibuojančių NKR) raiška periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje buvo labai išsibarsčiusi tiek sveikų individų, tiek odos melanoma sergančių pacientų grupėse, o statistiškai patikimų NKG2A raiškos skirtumų tarp melanoma sergančių pacientų ir kontrolinės grupės individų CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijų jie nenustatė (171).

Tiriant NKG2A raišką periferinio kraujo CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijoje, statistiškai reikšmingų skirtumų tarp tiriamųjų grupių nerasta. Taip pat nenustatyta statistiškai patikimų NKG2A raiškos skirtumų tarp CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijų, o tai jau nesutampa su Casado ir bendraautorių duomenimis, kur teigiama, kad NKG2A raiška yra statistiškai patikimai gausesnė CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje tiek kontrolinės grupės individų, tiek ir odos melanoma sergančių pacientų grupėse (171). Šiuos mūsų ir Casado grupės rezultatų nesutapimus iš dalies paaiškina kitas šių tyrėjų straipsnis, kuriame jie teigia, jog inhibuojančių NKR (tame tarpe ir NKG2A) raiška yra būdinga daliai CD8^hCD57⁻ (CD8^hCD28⁺) T limfocitų, nes CD8^hCD57⁻iNKR⁺ fenotipas atitinka tarpinę diferenciacijos stadiją, kai naivieji CD8^h T limfocitai virsta efektoriniais T limfocitais (184). Taigi, tikėtina, jog dalies mūsų tirtų individų periferiniame kraujyje buvo aptinkami būtent šios „pereinamosios“ diferenciacijos stadijos CD8^hCD57⁻NKG2A⁺ T limfocitai, todėl mes ir nenustatėme NKG2A raiškos skirtumų tarp CD8^hCD57⁺ ir CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijų.

Tiriant citotoksinių CD8^hCD57⁺Perforin⁺ T ląstelių subpopuliacijos kiekybinius skirtumus, nustatyta, kad jos nuošimtis statistiškai patikimai didesnis išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje, lyginant su kontroline grupe, tačiau nerasta perforino raiškos skirtumų CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje tarp kontrolinės grupės individų ir didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupių (14 pav.). Lyginant mūsų tirtų onkologinių ligonių grupes tarpusavyje buvo rasta, kad CD8^hCD57⁺Perforin⁺ T limfocitų subpopuliacijos nuošimtis CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje statistiškai patikimai didesnis išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų grupėje (14 pav.).

Beje, labai didelis CD8^hCD57⁺Perforin⁺ T ląstelių nuošimtis (> 84,74 %) CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje nustatytas net 25,8 % išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų, tuo tarpu kontrolinėje bei didelės rizikos odos mela-

noma sergančių pacientų grupėse tokių individų buvo tik atitinkamai po 7,7 % ir 9,1 % (7 lent.).

Imunologiniu požiūriu įdomus faktas, kad visose tiriamųjų grupėse perforino raiška buvo statistiškai patikimai didesnė $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje, lyginant su $CD8^hCD57^-$ T limfocitais. Tai rodo, jog perforino raiška yra kur kas labiau būdinga $CD8^hCD57^+$ T limfocitams. Šie rezultatai sutampa su kitų tyrėjų duomenimis, kur teigiama, kad būtent $CD8^hCD57^+$ T limfocitai pasižymi stipriomis citotoksinėmis savybėmis (13,14,165,201).

Vertinant viduląstelinio $IFN\gamma$ raiškos skirtumus tarp tiriamų individų grupių, stebėtos priešingos nei perforino raiškos tendencijos – viduląstelinį $IFN\gamma$ ekspresuojančių T ląstelių nuošimtis $CD8^hCD57^+$ 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 $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje tarp išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų ir kontrolinės grupės individų. Lyginant tirtų onkologinių pacientų grupes tarpusavyje, nustatyta, kad $CD8^hCD57^+IFN\gamma^+$ T ląstelių subpopuliacijos nuošimtis $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje buvo statistiškai patikimai didesnis didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėje (16 pav.).

Lyginant viduląstelinio $IFN\gamma$ raiškos skirtumus tarp $CD8^hCD57^+$ ir $CD8^hCD57^-$ T limfocitų populiacijų, rasta, kad jis statistiškai patikimai gausiau ekspresuojamas tik didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje, o išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų $CD8^hCD57^+$ ir $CD8^hCD57^-$ T populiacijose viduląstelinį $IFN\gamma$ ekspresuojančių limfocitų nuošimtis nesiskyrė ir sudarė 3,3 % (16 pav.).

Tiriant perforino bei $IFN\gamma$ raišką periferinio kraujo $CD8^hCD57^-$ T limfocitų populiacijoje, statistiškai reikšmingų skirtumų tarp tirtų individų grupių nerasta (14 ir 16 pav.).

Citotoksines bei citotoksines / imunomoduliuojančias T limfocitų savybes atspindinčių žymenų raiškos tyrimų rezultatai rodo, kad mūsų tirtų onkologinių

ligonių periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje gausėja navikines ląsteles atakuojančių ir jų naikinimą sukeliančių T limfocitų subpopuliacijų nuošimtis, tačiau esant skirtingoms nozologinėms vėžio formoms (šiuo atveju, inkstų vėžiui ar odos melanomai), vyksta skirtingų navikines ląsteles atakuojančių subpopuliacijų kiekybiniai persitvarkymai. Ar šie skirtumai turi reikšmės bendram priešnavikinio imuninio atsako efektyvumui, sunku pasakyti. Galima tik kelti prielaidą, kad CD8^hCD57⁺IFN γ ⁺ T limfocitų subpopuliacijos pagausėjimas galėtų būti susijęs su stipresniu priešnavikiniu poveikiu, nes CD8^hCD57⁺IFN γ ⁺ T limfocitų itin gausiai ekspresuojamas ir išskiriamas IFN γ pasižymi ne tik tiesioginiu citotoksiniu poveikiu navikinėms ląstelėms (17), bet dar ir aktyvina nespecifinio ir specifinio ląstelinio imuninio atsako vystymąsi (18), t. y. tarsi pasižymi „dvigubu“ priešnavikiniu poveikiu.

Būtina paminėti, kad išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų grupėje rastas vienas pacientas (tai sudaro 4,8 % šios grupės individų), kurio periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje buvo didelis viduląstelinį IFN γ ekspresuojančių T ląstelių nuošimtis (> 23 %) (8 lent.), o didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėje buvo rasti du pacientai (9,1 % šios grupės individų), kurių periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje buvo labai didelis CD8^hCD57⁺Perforin⁺ T ląstelių nuošimtis (> 84,74 %) (6 lent.). Tai rodo, kad perforiną ekspresuojančių T ląstelių nuošimčio padidėjimas CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje nėra išskirtinai būdingas tik inkstų vėžiu sergantiems pacientams, o CD8^hCD57⁺IFN γ ⁺ T ląstelių subpopuliacijos padidėjimas – tik odos melanoma sergantiems pacientams. Tiesiog perforino raiškos pagausėjimas CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje yra *labiau* būdingas, sergant inkstų vėžiu, o IFN γ raiškos pagausėjimas – sergant odos melanoma, nors šio reiškinių priežastį sunku paaiškinti.

Pabrėžtina yra tai, kad tiek pagal imunosupresinių, tiek ir pagal citotoksinių bei citotoksinių / imunomoduliuojančių subpopuliacijų nuošimtį CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje kontrolinės grupės individus bei mūsų tirtus onkologinius pacientus galima suskirstyti į atskiras grupes (6, 7 ir 8 lent.). Taigi, navikines ląsteles atakuojančių ir imunosupresinių CD8^hCD57⁺ T limfocitų subpopu-

liacijų pagausėjimas stebimas ne visų onkologinių ligonių periferiniame kraujyje. Įvertinant dar ir tai, kad onkologinių ligonių grupėse nerasta koreliacijos tarp imunosupresinių bei citotoksinių ir imunomoduliuojančių žymenų raiškos $CD8^hCD57^+$ populiacijoje (18 ir 19 pav.), aiškėja, jog kiekvieno ligonio organizme priešnavikinio imuninio atsako pobūdis yra individualus ir „chaotiškas“, t. y. funkciškai konkuruojančių subpopuliacijų kiekybiniai persitvarkymai $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje yra tarpusavyje nesusiję, todėl vieno ligonio organizme gali padidėti tiek citotoksinė, tiek ir imunosupresinė subpopuliacijos, o kito ligonio – citotoksinė subpopuliacija gali padidėti, o imunosupresinė likti maža, ir panašiai. Būtent *imunosupresinių ir navikines ląsteles atakuojančių subpopuliacijų tarpusavio kiekybinis santykis ir turėtų nulemti bendrą (visuminį, suminį) $CD8^hCD57^+$ T limfocitų sukeliama priešnavikinio imuninio atsako pobūdį individualaus paciento organizme.*

Įdomu tai, kad išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų grupėje rasta individų, kurių periferinio kraujo $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje buvo labai didelis citotoksinių $CD8^hCD57^+Perforin^+$ T ląstelių subpopuliacijos nuošimtis, tačiau visai nerasta imunosupresinių $CD8^hCD57^+FOXP3^+$ T limfocitų subpopuliacijos (9 lent.). Tikėtina, kad būtent šiems išplitusiu inkstų vėžiu sergančioms pacientams priešnavikinė imunoterapija ir turėtų būti efektyviausia. Įdomiausia yra tai, kad tokių pacientų buvo rasta 23 %, o faktas, kad klinikinis atsakas į priešnavikinę citokinų imunoterapiją pasiekiamas apie 10-20 % išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų (27,217,235,237), tik palaiko mūsų hipotezę.

Didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų grupėje iš pirmo žvilgsnio šis reiškinys nėra toks būdingas - rasta viena pacientė, kurios $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje viduląstelinio $IFN\gamma$ raiška buvo didelė (> 23 %), o FOXP3 – maža (0,1-1 %) (10 lent.). Ši pacientė tesudarė 6,25 % mūsų tirtų didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų, kuriems buvo nustatyta $IFN\gamma$ raiška (n = 16). Tačiau reikia atkreipti dėmesį į tai, kad odos melanoma sergančių pacientų grupėje buvo rasti du pacientai (tai sudaro 12,5 % pacientų, kuriems buvo nustatyta viduląstelinio $IFN\gamma$ raiška), kurių $CD8^hCD57^+$ T limfoci-

tų populiacijoje $CD8^hCD57^+IFN\gamma^+$ T subpopuliacijos nuošimtis buvo vidutinis (10,1-23 %), o imunosupresinės $CD8^hCD57^+FOXP3^+$ subpopuliacijos visai nerasta (10 lent.). Įvertinant tai, kad $IFN\gamma$ pasižymi „dvigubu“ priešnavikiniu poveikiu (tiesioginiu citotoksiniu ir imunomoduliuojančiu), galima teigti, kad net ir vidutinė $IFN\gamma$ raiška atspindi stiprias priešnavikines $CD8^hCD57^+$ T limfocitų savybes. Todėl tikėtina, kad priešnavikinė imunoterapija turėtų būti efektyviausia būtent tiems pažengusia odos melanoma sergantiems pacientams, kurių $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijoje imunosupresinės $CD8^hCD57^+FOXP3^+$ T limfocitų subpopuliacijos visai nėra, o citotoksiniu / imunomoduliuojančiu poveikiu pasižymintys $CD8^hCD57^+IFN\gamma^+$ T limfocitų subpopuliacijos nuošimtis yra vidutinis arba didelis. Mes radome 12,5 % tokių didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų. Šiuo atveju faktas, kad klinikinis atsakas į priešnavikinę citokinų imunoterapiją pasiekiamas apie 10-20 % odos melanoma sergančių ligonių (26,28,219), vėlgi tampa argumentu, remiančiu mūsų hipotezę.

Galima numatyti, kad įvairių subpopuliacijų (ypač imunosupresinės (20)) 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 pasižymintys imuninės sistemos komponentus).

Siekiant įvertinti $CD8^hCD57^+$ T limfocitų populiacijos ir jos subpopuliacijų prognostinę reikšmę potencialiam atsakui į priešnavikinę imunoterapiją, būtina atlikti papildomus klinikinius tyrimus.

6. IŠVADOS

1. Išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje nerasta statistiškai patikimų $CD8^+$ T limfocitų koncentracijos (ląst/ μ 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 ($p = 0,02$) di-

desnė didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje, o išplitusiu inkstų vėžiu sergančių pacientų grupėje nerasta statistiškai patikimų IFN γ raiškos skirtumų;

d) perforino raiškos padidėjimas periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje nėra išskirtinai būdingas tik išplitusiu inkstų vėžiu sergantiems pacientams, o IFN γ raiškos padidėjimas – tik didelės rizikos odos melanoma sergantiems pacientams, nes tarp sergančiųjų išplitusiu inkstų vėžiu rasta 10 % individų, kurių CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje buvo vidutiniškai ar gausiai ekspresuojamas IFN γ , o odos melanoma sergančių pacientų grupėje buvo rasta 9 % individų, kurių CD8^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje buvo labai gausiai ekspresuojamas perforinas.

4. Išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo CD8^hCD57⁺ 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^hCD57⁺ T limfocitų populiacijoje.
6. Išplitusiu inkstų vėžiu ar didelės rizikos odos melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo CD8^hCD57⁻ T limfocitų populiacijoje nestebima FOXP3, NKG2A, perforino ar IFN γ raiškos skirtumų, lyginant su kontroline grupe.

7. PUBLIKACIJŲ IR PRISTATYMŲ SĄRAŠAS

1. Strioga M, Dobrovolskienė N, Lukšienė A, Kazlauskaitė N, Purvinienė R, Jokūbauskienė L, Petraitis T, Characiejus D, Pašukonienė V. CD8⁺CD57⁺ 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^hCD57⁺ 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.
3. „*Two faces of antitumor immunity*“: žodinis pranešimas V-ajame Baltijos onkologų kongrese, kuris vyko 2010 metų gegužės 14-15 dienomis Rygoje (Latvija).
4. „*CD8^{high}CD57⁺ 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).

8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 2007 May;117(5):1137-46.
2. Abdelrazeq AS. Spontaneous regression of colorectal cancer: a review of cases from 1900 to 2005. *Int J Colorectal Dis.* 2007 Jul;22(7):727-36.
3. Igney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol.* 2002 June;71(6):907-20.
4. Whiteside TL. Tricks tumors use to escape from immune control. *Oral Oncol.* 2009 Oct;45(10):e119-23.
5. Beyer M, Schultze JL. Immunoregulatory T cells: role and potential as a target in malignancy. *Curr Oncol Rep.* 2008 Mar;10(2):130-6.
6. Kuniwa Y, Miyahara Y, Wang HY, Peng W, Peng G, Wheeler TM, Thompson TC, Old LJ, Wang RF. CD8⁺Foxp3⁺ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Dec;13(23):6947-58.
7. 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.
8. Barkholt L, Bregni M. Current immunotherapy for solid tumors. *Immunotherapy.* 2009 May;1(3):483-93.
9. Yoshimoto T, Morishima N, Okumura M, Chiba Y, Xu M, Mizuguchi J. Interleukins and cancer immunotherapy. *Immunotherapy.* 2009 Sep;1(5):825-44.
10. Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev.* 2005 Jun;205:158-69.
11. Effros RB. Replicative senescence of CD8 T cells: potential effects on cancer immune surveillance and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Oct;53(10):925-33.

12. Filaci G, Fenoglio D, Fravega M, Ansaldo G, Borgonovo G, Traverso P, Villaggio B, et al. CD8⁺CD28⁻ T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. *J Immunol.* 2007 Oct;179(7):4323-34.
13. Le Priol Y, Puthier D, Lécureuil C, Combadière C, Debré P, Nguyen C, Combadière B. High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8⁺CD57⁺ cells in HIV-infected and uninfected individuals. *J Immunol.* 2006 Oct;177(8):5145-54.
14. Weng NP, Akbar AN, Goronzy J. CD28⁻ T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol.* 2009 Jul;30(7):306-12.
15. 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⁺ T cells. *Blood.* 2003 Apr;101(7):2711-20.
16. Ohkawa T, Seki S, Dobashi H, Koike Y, Habu Y, Ami K, Hiraide H, Sekine I. Systematic characterization of human CD8⁺ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8⁺ T cells. *Immunology.* 2001 Jul;103(3):281-90.
17. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329-60.
18. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004 Feb;75(2):163-89.
19. Meloni F, Morosini M, Solari N, Passadore I, Nascimbene C, Novo M, Ferrari M, Cosentino M, Marino F, Pozzi E, Fietta AM. Foxp3 expressing CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺CD28⁻ T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Hum Immunol.* 2006 Jan-Feb;67(1-2):1-12.
20. 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.
21. Banham AH, Powrie FM, Suri-Payer E. FOXP3⁺ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol.* 2006 Nov;36(11):2832-6.
 22. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):330-6.
 23. MacAdam DH. Spontaneous Regression: Cancer and the immune system. Xlibris Corporation, 2003.
 24. Heine A, Holderried TAW, Brossart P. Immunotherapy in renal cell carcinoma. *Immunotherapy.* 2009 Jan;1(1): 97-107.
 25. Jorritsma A, Schumacher TNM, Haanen JBAG. Immunotherapeutic strategies: the melanoma example. *Immunotherapy.* 2009 Jul;1(4):679-90.
 26. Juozaitytė E (sudarytoja). Onkologija šeimos gydytojui, II dalis (klinikinė onkologija). Kaunas: „Vitae Litera“, 2008.
 27. Gouttefangeas C, Stenzl A, Stevanovic S, Rommensee HG. Immunotherapy of renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Jan;56(1):117-28.
 28. Kim CJ, Dessureault S, Gabrilovich D, Reintgen DS, Slingluff CL Jr. Immunotherapy for melanoma. *Cancer Control.* 2002 Jan-Feb;9(1): 22-30.
 29. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004 Aug;21(2):137-48.
 30. Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol.* 2007 Apr;19(2):203-8.
 31. Saleh F, Renno W, Klepacek I, Ibrahim G, Dashti H, Asfar S, Behbehani A, et al. Direct evidence on the immune-mediated spontaneous regression of human cancer: An incentive for pharmaceutical companies to develop a

- novel anti-cancer vaccine: Cancer vaccine and immunotherapy. *Curr Pharm Des.* 2005;11(27):3531-43.
32. Dunn GP, Lewis JS Jr, Sunwoo JB, Uppaluri R. Spontaneous regression of cutaneous head and neck melanoma: implications for the immunologic control of neoplasia. *Head Neck.* 2008 Feb;30(2):267-72.
33. King M, Spooner D, Rowlands DC. Spontaneous regression of metastatic malignant melanoma of the parotid gland and neck lymph nodes: a case report and a review of the literature. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2001;13(6):466-9.
34. Pakhmode VK. Understanding the possible mechanisms of spontaneous regression of oral cancer. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2007;11:2-4.
35. Sahin U, Türeci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 Dec;92(25):11810-3.
36. Echchakir H, Dorothée G, Vergnon I, Menez J, Chouaib S, Mami-Chouaib F. Cytotoxic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen display similar HLA tetramer binding but distinct functional avidity and tissue distribution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002 Jul; 99(14):9358–63.
37. Anderson SK. Biology of natural killer cells: What is the relationship between natural killer cells and cancer? Will an increased number and/or function of natural killer cells result in lower cancer incidence? *J Nutr.* 2005 Dec;135(12):2910S.
38. Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, Cocco L, Vitale M. NK cells and cancer. *J Immunol.* 2007 Apr;178(7):4011-16.
39. Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, Xu Y, Li YW, Tang ZY. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol.* 2007 Jun;25(18):2586-93.
40. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, et al. Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high

- CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Dec;102(51):18538-43.
41. Alvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, Bosch R, García JF, Jaén J, Banham AH, Roncador G, Montalbán C, Piris MA. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb;11(4):1467-73.
 42. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006 Sep;313(5795):1960-4.
 43. Janikashvili N, Larmonier N, Katsanis E. Personalized dendritic cell-based tumor immunotherapy. *Immunology*. 2010 Jan;2(1):57-68.
 44. Thomas-Kaskel AK, Veelken H. Dendritic-cell vaccination for prostate cancer. *Immunotherapy*. 2009 Jan;1(1):63-72.
 45. O'Rourke MG, Johnson MK, Lanagan CM, See JL, O'Connor LE, Slater GJ, Thomas D, et al. Dendritic cell immunotherapy for stage IV melanoma. *Melanoma Res*. 2007 Oct;17(5):316-22.
 46. Chang JW, Hsieh JJ, Shen YC, Ho E, Chuang CK, Chen YR, Liao SK, et al. Immunotherapy with dendritic cells pulsed by autologous dactinomycin-induced melanoma apoptotic bodies for patients with malignant melanoma. *Melanoma Res*. 2009 Oct;19(5):309-15.
 47. Jonasch E, Wood C, Tamboli P, Pagliaro LC, Tu SM, Kim J, Srivastava P, et al. Vaccination of metastatic renal cell carcinoma patients with autologous tumour-derived vitespen vaccine: clinical findings. *Br J Cancer*. 2008 Apr;98(8):1136-41.
 48. 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.
 49. Garcia KC, Teyton L, Wilson IA. Structural basis of T cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:369-97.

50. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:419-66.
51. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology* 6th ed. Saunders Company, 2009.
52. Goldsby RA, Osborne BA, Kindt TJ. *Kuby Immunology* 6th ed. W.H. Freeman and Co, New York, 2007.
53. Boon T, Coulie PG, van der Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:175-208.
54. Konishi J, Yamazaki K, Yokouchi H, Shinagawa N, Iwabuchi K, Nishimura M. The characteristics of human NKT cells in lung cancer—CD1d independent cytotoxicity against lung cancer cells by NKT cells and decreased human NKT cell response in lung cancer patients. *Hum Immunol.* 2004 Nov;65(11):1377-88.
55. Smyth MJ, Crowe NY, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Godfrey DI. NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol.* 2002 Apr;14(2):165-71.
56. Terabe M, Berzofsky JA. NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *Trends Immunol.* 2007 Nov;28(11):491-6.
57. Tanaka Y, Kobayashi H, Tanabe K, Minato N. Human $\gamma\delta$ T cells: application to cancer immunotherapy. *Clin Immunol.* 2009;131(1):S38-9.
58. Brandes M, Willimann K, Bioley G, Lévy N, Eberl M, Luo M, Tampé R, et al. Cross-presenting human $\gamma\delta$ T cells induce robust CD8⁺ $\alpha\beta$ T cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 Feb;106(7):2307–12.
59. Yuasa T, Sato K, Ashihara E, Takeuchi M, Maita S, Tsuchiya N, Habuchi T, Maekawa T, Kimura S. Intravesical administration of $\gamma\delta$ T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Apr;58(4):493-502.
60. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008 Aug 1;112(3):461-9.

61. Dosiou C, Giudice LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev.* 2005 Feb;26(1):44-62.
62. Fassett MS, Davis DM, Valter MM, Cohen GB, Strominger JL. Signaling at the inhibitory natural killer cell immune synapse regulates lipid raft polarization but not class I MHC clustering. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Dec;98(25):14547-52.
63. De Jager PL, Rossin E, Pyne S, Tamayo P, Ottoboni L, Viglietta V, Weiner M, et al. Cytometric profiling in multiple sclerosis uncovers patient population structure and a reduction of CD8^{low} cells. *Brain.* 2008 Jul;131(Pt7):1701-11.
64. Averdam A, Petersen B, Rosner C, Neff J, Roos C, Eberle M, Aujard F, et al. A novel system of polymorphic and diverse NK cell receptors in primates. *PLoS Genet.* 2009 Oct;5(10):e1000688 (1-15).
65. Empson VG, McQueen F, Dalbeth N. The natural killer cell: a further innate mediator of gouty inflammation. *Immunol Cell Biol.* 2009 Nov;(online);
66. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* 2006 May;20(3):123-37.
67. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene.* 2008 Oct;27(45):5932-43.
68. Braun S, Gerhartz HH, Schmetzer HM. Lymphokine-activated killer (LAK) cells and cytokines synergize to kill clonal cells in acute myeloid leukemia (AML) in vitro. *Haematologia (Budap.).* 2000;30(4):271-88.
69. Harris DT. Lymphokine-activated killer (LAK) cell activity is not a continuously inducible activity: implications for LAK cell and IL-2 immunotherapy. *Cancer Ther.* 2004;2:525-32.
70. Vollmers HP, Brändlein S. Natural antibodies and cancer. *N Biotechnol.* 2009 Jun;25(5):294-8.
71. Lake DF, Huynh WC, Hersh EM. Natural and induced human antibody response to cancer. *Cancer Invest.* 2000;18(5):480-9.

72. Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett.* 2008 Aug;267(2):204-15.
73. Chen JJW, Lin YC, Yao PI, Yuan A, Chen HY, Shun CT, Tsai MF, Chen CH, Yang PC. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *J Clin Oncol.* 2005 Feb;23(5):953-64.
74. Shih JY, Yuan A, Chen JJW, Yang PC. Tumor-associated macrophage: its role in cancer invasion and metastasis. *J Cancer Mol.* 2006;2(3):101-6.
75. Luo Y, Zhou H, Krueger J, Kaplan C, Lee SH, Dolman C, Markowitz D, et al. Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *J Clin Invest.* 2006 Aug;116(8):2132-41.
76. Pollard JW. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukoc Biol.* 2008 Sep;84(3):623-30.
77. Smyth MJ, Hayakawa Y. Evidence for the existence of cancer immunosurveillance. *Ann Cancer Res Ther.* 2004;12(1-2):9-32.
78. Teng MWL, Swann JB, Koebel CM, Schreiber RD, Smyth MJ. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol.* 2008 Oct;84(4):988-93.
79. Quesnell B. Tumor dormancy and immunoescape. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica (APMIS).* 2008 Jul-Aug;116(7-8):685-94.
80. Park JM, Terabe M, Donaldson DD, Forni G, Berzofsky JA. Natural immunosurveillance against spontaneous, autochthonous breast cancers revealed and enhanced by blockade of IL-13-mediated negative regulation. *Cancer Immunol Immunother.* 2008 Jun;57(6):907-12.
81. Campoli M, Ferrone S, Zea AH, Rodriguez PC, Ochoa AC. Mechanisms of tumor evasion. *Cancer Treat Res.* 2005;123:61-88.
82. Elkord E, Dangoor A, Burt DJ, Southgate TD, Daayana S, Harrop R, Drijfhout JW, et al. Immune evasion mechanisms in colorectal cancer liver metastasis patients vaccinated with TroVax (MVA-5T4). *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Oct;58(10):1657-67.

83. Beck C, Schreiber H, Rowley D. Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer. *Microsc Res Tech*. 2001 Feb;52(4):387-95.
84. Raffaghello L, Prigione I, Airoidi I, Camoriano M, Morandi F, Bocca P, Gambini C, Ferrone S, Pistoia V. Mechanisms of immune evasion of human neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2005 Oct;228(1-2):155-61.
85. Mapara MY, Sykes M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol*. 2004 Mar;22(6):1136-51.
86. Kosmaczewska A, Ciszak L, Potoczek S, Frydecka I. The significance of Treg cells in defective tumor immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008 May-Jun;56(3):181-91.
87. Adomaitienė D, Janulevičiūtė N, Kazakevičius R, Vaičiuvėnas V. *Klinikinės imunologijos įvadas*. Kaunas: "Šviesa", 2001.
88. Wilson TJ, Nannuru KC, Futakuchi M, Singh RK. Cathepsin G-mediated enhanced TGF-beta signaling promotes angiogenesis via upregulation of VEGF and MCP-1. *Cancer Lett*. 2009 Jul; Online (Epub ahead of print).
89. Zhou J, Ding T, Pan W, Zhu LY, Li L, Zheng L. Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer*. 2009 Oct;125(7):1640-8.
90. Kitamura N, Murata S, Ueki T, Mekata E, Reilly RD, Jaffee EM, Tani T. OX40 costimulation can abrogate Foxp3⁺ regulatory T cell-mediated suppression of antitumor immunity. *Int J Cancer*. 2009 Aug;125(3):630-8.
91. Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL. Characteristics of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer*. 2005 Mar;92(5):913-20.
92. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006 Apr;6(4):295-307.
93. Viguiier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L. Foxp3 expressing CD4⁺CD25^{high}

- regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol.* 2004;173(2):1444-53.
94. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):942-9.
95. Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, Omata H, Fujii H. CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother.* 2006 Sep;55(9):1064-71.
96. Morse MA, Hobeika AC, Osada T, Serra D, Niedzwiecki D, Lyerly HK, Clay TM. Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines. *Blood.* 2008 Aug;112(3):610-18.
97. Li L, Li SP, Min J, Zheng L. Hepatoma cells inhibit the differentiation and maturation of dendritic cells and increase the production of regulatory T cells. *Immunol Lett.* 2007 Nov;114(1):38-45.
98. Ai WZ, Hou JZ, Zeiser R, Czerwinski D, Negrin RS, Levy R. Follicular lymphoma B cells induce the conversion of conventional CD4⁺ T cells to T regulatory cells. *Int J Cancer.* 2009 Jan;124(1):239-44.
99. Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:423-49.
100. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol.* 2007 Nov;37 (1):S116-23.
101. Randolph DA, Fathman CG. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and their therapeutic potential. *Annu Rev Med.* 2006;57:381-402.
102. Walker LS. CD4⁺CD25⁺ Treg: divide and rule? *Immunology.* 2004 Feb;111(2):129-37.
103. Kapp JA, Bucy RP. CD8⁺ suppressor T cells resurrected. *Hum Immunol.* 2008 Nov;69(11):715-20.

104. Bach JF. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol*. 2003 Mar;3(3):189-98.
105. Pillai V, Karandikar NJ. Human regulatory T cells: A unique, stable thymic subset or a reversible peripheral state of differentiation? *Immunol Lett*. 2007 Nov;114(1):9-15.
106. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*. 2006 Aug;25(2):195-201.
107. Fehérvári Z, Sakaguchi S. CD4⁺ Tregs and immune control. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(9):1209-17.
108. Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol*. 2003 Dec;171(12):6323-7.
109. Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol*. 2006 Jan;126(1):15-24.
110. Apostolou I, Verginis P, Kretschmer K, Polansky J, Hühn J, von Boehmer H. Peripherally induced Treg: mode, stability, and role in specific tolerance. *J Clin Immunol*. 2008 Nov;28(6):619-24.
111. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF- β -transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity. *J Immunol*. 2007 Jan;178(1):172-8.
112. Martínez-Forero I, García-Munoz R, Martínez-Pasamar S, Inoges S, López-Díaz de Cerio A, Palacios R, Sepulcre J, et al. IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2008 Feb;38(2):576-86.
113. O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(10):1372-8.
114. Chatenoud L, Bach JF. Adaptive human regulatory T cells: myth or reality? *J Clin Invest*. 2006 Sep;116(9):2325-7.
115. Chess L, Jiang H. Resurrecting CD8⁺ suppressor T cells. *Nat Immunol*. 2004 May;5(5):469-71.

116. Wang RF. CD8⁺ regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer. *Hum Immunol*. 2008 Nov;69(11):811-4.
117. Saitoh O, Abiru N, Nakahara M, Nagayama Y. CD8⁺CD122⁺ T cells, a newly identified regulatory T subset, negatively regulate Graves' hyperthyroidism in a murine model. *Endocrinology*. 2007 Dec;148(12):6040-6.
118. Endharti AT, Rifa'i M, Shi Z, Fukuoka Y, Nakahara Y, Kawamoto Y, Takeda K, Isobe K, Suzuki H. Cutting edge: CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN- γ production and proliferation of CD8⁺ T Cells. *J Immunol*. 2005;175(11):7093-7.
119. André S, Tough DF, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Bayry J. Surveillance of antigen-presenting cells by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications. *Am J Pathol*. 2009 May;174(5):1575-87.
120. Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: Novel concepts in the pathogenesis, prevention and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Nov;116(5):961-8.
121. Torgerson TR, Ochs HD. Regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007 Dec;7(6):515-21.
122. Kang SM, Tang Q, Bluestone JA. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in transplantation: progress, challenges and prospects. *Am J Transplant*. 2007 Jun;7(6):1457-63.
123. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood*. 2006 Aug;108(3):804-11.
124. Bignone PA, Banham AH. FOXP3⁺ regulatory T cells as biomarkers in human malignancies. *Expert Opin Biol Ther*. 2008 Dec;8(12):1897-920.
125. Griffiths RW, Elkford E, Gilham DE, Ramani V, Clarke N, Stern PL, Hawkins RE. Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunol Immunother*. 2007 Nov;56(11):1743-53.

126. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schilenger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001 Jun;61(12):4766-72.
127. Perez SA, Karamouzis MV, Skarios DV, Ardavanis A, Sotiriadou NN, Iliopoulou EG, Salagianni ML, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell frequency in HER-2/neu (HER)-positive and HER-negative advanced-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2007 May;13(9):2714-21.
128. Loddenkemper C, Schernus M, Noutsias M, Stein H, Thiel E, Nagorsen D. In situ analysis of FOXP3⁺ regulatory T cells in human colorectal cancer. *J Transl Med.* 2006 Dec;4:52.
129. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanal M, Takabayashi A. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer.* 2006 Sep;98(5):1089-99.
130. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3⁺ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res.* 2006 Sep;12(18):5423-34.
131. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2006 Mar;65(6):2457-64.
132. Cesana GC, DeRaffele G, Cohen S, Moroziewicz D, Mitcham J, Stoutenburg J, Cheung K, Hesdorffer C, Kim-Schulze S, Kaufman HL. Characterization of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006 Mar;24(7):1169-77.
133. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian

- carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):942-9.
134. Shevach EM. Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):900-1.
135. Kudo-Saito C, Schlom J, Camphausen K, Coleman CN, Hodge JW. The requirement of multimodal therapy (vaccine, local tumor radiation, and reduction of suppressor cells) to eliminate established tumors. *Clin Cancer Res.* 2005 Jun;11(12):4533-44.
136. Yu P, Liu W, Krausz T, Chong A, Schreiber H, Fu YX. Intratumoral depletion of CD4⁺ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med.* 2005 Mar;201(5):779-91.
137. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, Solary E, Le Cesne A, Zitvogel L, Chauffert B. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 May;56(5):641-8.
138. Wei WZ, Morris GP, Kong YC. Anti-tumor immunity and autoimmunity: a balancing act of regulatory T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Feb;53(2):73-8.
139. Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Restifo NP, et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 Jul;100(14):8372-7.
140. 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.
141. Effros RB. Replicative senescence of CD8 T cells: potential effects on cancer immune surveillance and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Oct;53(10):925-33.

142. Crocenzi TS, Tretter CP, Waugh M, Ernstoff MS. Suppressor (CD8⁺/CD28⁻) T cells are increased in cancer patients and inhibit helper T-cell proliferation. *Proc Amer Assoc Cancer Res.* 2004;45 (*Abstract*).
143. Sze DM, Giesajtis G, Brown RD, Raitakari M, Gibson J, Ho J, Baxter AG, Fazekas de St Groth B, Basten A, Joshua DE. Clonal cytotoxic T cells are expanded in myeloma and reside in the CD8⁽⁺⁾CD57⁽⁺⁾CD28⁽⁻⁾ compartment. *Blood.* 2001 Nov;98(9):2817-27.
144. Clambey ET, van Dyk LF, Kappler JW, Marrack P. Nonmalignant clonal expansions of CD8⁺ memory T cells in aged individuals. *Immunol Rev.* 2005 Jun;205:170-89.
145. Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Solana R, Grubeck-Loebenstien B, Wikby A. Human immunosenescence: is it infectious? *Immunol Rev.* 2005 Jun;205:257-68.
146. Lazuardi L, Herndler-Brandstetter D, Brunner S, Laschober GT, Lepperdinger G, Grubeck-Loebenstien B. Microarray analysis reveals similarity between CD8⁺CD28⁻ cells from young and elderly persons, but not of CD8⁺CD28⁺ T cells. *Biogerontology.* 2009 Apr;10(2):191-202.
147. Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol.* 2003 Dec;3(12):939-51.
148. Abken H, Hombach A, Heuser C, Kronfeld K, Seliger B. Tuning tumor-specific T-cell activation: a matter of costimulation? *Trends Immunol.* 2002 May;23(5):240-5.
149. Vlad G, Cortesini R, Suci-Foca N. License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC. *J Immunol.* 2005 May;174(10):5907-14.
150. Effros RB. From Hayflick to Walford: the role of T cell replicative senescence in human aging. *Exp Gerontol.* 2004 Jun;39(6):885-90.
151. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):72-6.

152. Wood KL, Knox KS, Wang Y, Day RB, Schnizlein-Bick C, Twigg HL III. Apoptosis of CD57⁺ and CD57⁻ lymphocytes in the lung and blood of HIV-infected subjects. *Clin Immunol*. 2005 Dec;117(3):294-301.
153. Unemori P, Hunt P, Leslie K, Sinclair E, Deeks S, Martin J, Maurer T. CD57⁺, a global marker of immunosenescence, is elevated in an atypical cohort of patients with Kaposi sarcoma and well-controlled HIV. *Infect Agent Cancer*. 2009 Jun;4(2):P43.
154. Focosi D, Bestagno M, Burrone O, Petrini M. CD57⁺ T lymphocytes and functional immune deficiency. *J Leukoc Biol*. 2010 Jan;87(1):107-16. Epub 2009 Oct 30.
155. Arosa FA. CD8⁺CD28⁻ T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset. *Immunol Cell Biol*. 2002 Feb;80(1):1-13.
156. Focosi D, Petrini M. CD57 expression on lymphoma microenvironment as a new prognostic marker related to immune dysfunction. *J Clin Oncol*. 2007 Apr;25(10):1289-91.
157. Bandrés E, Merino J, Vázquez B, Inogés S, Moreno C, Subirá ML, Sánchez-Ibarrola A. The increase of IFN-gamma production through aging correlates with the expanded CD8(+high)CD28(-)CD57(+) subpopulation. *Clin Immunol*. 2000 Sep;96(3):230-5.
158. Spaulding C, Guo W, Effros RB. Resistance to apoptosis in human CD8⁺ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Exp Gerontol*. 1999 Aug;34(5):633-44.
159. Abedin S, Michel JJ, Lemster B, Vallejo AN. Diversity of NKR expression in aging T cells and in T cells of the aged: the new frontier into the exploration of protective immunity in the elderly. *Exp Gerontol*. 2005 Jul;40(7):537-48.
160. Borthwick NJ, Lowdell M, Salmon M, Akbar AN. Loss of CD28 expression on CD8(+) T cells is induced by IL-2 receptor gamma chain signalling cytokines and type I IFN, and increases susceptibility to activation-induced apoptosis. *Int Immunol*. 2000 Jul;12(7):1005-13.

161. Palmer BE, Mack DG, Martin AK, Maier LA, Fontenot AP. CD57 expression correlates with alveolitis severity in subjects with beryllium-induced disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jul;120(1):184-91.
162. Mollet L, Sadat-Sowti, B, Duntze J, Leblond V, Bergeron F, Calvez V, et al. CD8^{hi}CD57⁺ T lymphocytes are enriched in antigen-specific T cells capable of downmodulating cytotoxic activity. *Int Immunol.* 1997 Nov;10(3):311-23.
163. Fateminasab FD, Shahgasempour S, Mirsaeldi SM, Tabarsi P, Mansoori SD, Entezami Z. Increased activation and expansion of a CD57⁺ subset within peripheral CD8⁺ T lymphocytes in Mycobacterium tuberculosis-infected patients. *Arch Iran Med.* 2006 Jan;9(1):53-7.
164. Song K, Coleman RA, Alber C, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Mortari F, LeBrecque DR, Cook RT. T_h1 cytokine response of CD57⁺ T-cell subsets in healthy controls and patients with alcoholic liver disease. *Alcohol.* 2001;24:155-67.
165. Schirmer M, Goldberger C, Würzner R, Duftner C, Pfeiffer KP, Clausen J, Neumayr G, Falkenbach A. Circulating cytotoxic CD8⁺CD28⁻ T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res.* 2002;4(1):71-6.
166. Characiejus D, Pasukonienė V, Kazlauskaitė N, Valuckas KP, Petraitis T, Mauricas M, Den Otter W. Predictive value of CD8^{high}CD57⁺ lymphocyte subset in interferon therapy of patients with renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2002 Nov-Dec;22(6B):3679-83.
167. Characiejus D, Pasukoniene V, Jonusauskaite R, Kazlauskaitė N, Aleknavicius E, Mauricas M, Den Otter W. Peripheral blood CD8^{high}CD57⁺ lymphocyte levels may predict outcome in melanoma patients with adjuvant interferon-alpha. *Anticancer Res.* 2008 Mar-Apr;28(2B):1139-42.
168. Urbaniak-Kujda D, Kapelko-Słowik K, Wołowiec D, Dybko J, Hałoń A, Jaźwiec B, Maj J, Jankowska-Konsur A, Kuliczkowski K. Increased percentage of CD8⁺CD28⁻ 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.
169. García-Muñoz R, Rodríguez-Otero P, Galar A, Merino J, Beunza JJ, Páramo JA, Lecumberri R. Expansion of CD8⁺CD57⁺ T cells in an immunocompetent patient with acute toxoplasmosis. *Adv Hematol.* 2009;2009:173439 (ID).
170. Figueiredo C, Seltsam A, Blasczyk R. Permanent silencing of NKG2A expression for cell-based therapeutics. *J Mol Med.* 2009 Feb;87(2):199-210.
171. Casado JG, Soto R, DelaRosa O, Peralbo E, del Carmen Muñoz-Villanueva M, Rioja L, Peña J, Solana R, Tarazona R. CD8 T cells expressing NK associated receptors are increased in melanoma patients and display an effector phenotype. *Cancer Immunol Immunother.* 2005 Dec;54(12):1162-71.
172. Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem.* 2001 Oct;276(40):37672-8.
173. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-κB to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Apr;102(14):5138-43.
174. Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:209-26.
175. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, Lederman S, Colonna M, Cortesini R, Dalla-Favera R, Suci-Foca N. Tolerization of dendritic cells by T_s cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol.* 2002 Mar;3(3):237-43.
176. Suci-Foca N, Berloco P, Cortesini R. Tolerogenic dendritic cells in cancer, transplantation, and autoimmune diseases. *Hum Immunol.* 2009 May;70(5):277-80.

177. Vlad G, Chang CC, Colovai AI, Berloco P, Cortesini R, Suci-Foca N. Immunoglobulin-like transcript 3: A crucial regulator of dendritic cell function. *Hum Immunol*. 2009 May;70(5):340-4.
178. Suci-Foca N, Cortesini R. Central role of ILT3 in the T suppressor cell cascade. *Cell Immunol*. 2007 Jul;248(1):59-67.
179. Vlad G, Cortesini R, Suci-Foca N. CD8⁺ T suppressor cells and the ILT3 master switch. *Hum Immunol*. 2008 Nov;69(11):681-6.
180. Suci-Foca N, Manavalan JS, Scotto L, Kim-Schulze S, Galluzzo S, Naiyer AJ, Fan J, Vlad G, Cortesini R. Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review. *Int Immunopharmacol*. 2005 Jan;5(1):7-11.
181. Manavalan JS, Kim-Schulze S, Scotto L, Naiyer AJ, Vlad G, Colombo PC, Marboe C, Mancini D, Cortesini R, Suci-Foca N. Alloantigen specific CD8⁺CD28⁻FOXP3⁺ T suppressor cells induce ILT3⁺ILT4⁺ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol*. 2004 Aug;16(8):1055-68.
182. Held W, Coudert JD, Zimmer J. The NK cell receptor repertoire: formation, adaptation and exploitation. *Curr Opin Immunol*. 2003 Apr;15(2):233-7.
183. Yokoyama WM, Plougastel BF. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol*. 2003 Apr;3(4):304-16.
184. Tarazona R, Casado JG, Soto R, DelaRosa O, Peralbo E, Rioja L, Peña J, Solana R. Expression of NK-associated receptors on cytotoxic T cells from melanoma patients: a two-edged sword? *Cancer Immunol Immunother*. 2004 Oct;53(10):911-24.
185. Li G, Yu M, Weyand CM, Goronzy JJ. Epigenetic regulation of killer immunoglobulin-like receptor expression in T cells. *Blood*. 2009 Oct;114(16):3422-30.
186. Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, Peña J, Solana R, Coligan JE. Structure and function of major histocompatibility complex

- (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol*. 2002 Feb;38(9):637-60.
187. Mortarini R, Piris A, Maurichi A, Molla A, Bersani I, Bono A, Bartoli C, et al. Lack of terminally differentiated tumor-specific CD8⁺ T cells at tumor site in spite of antitumor immunity to self-antigens in human metastatic melanoma. *Cancer Res*. 2003 May;63(10):2535-45.
188. Tarazona R, DelaRosa O, Casado JG, Torre-Cisneros J, Villanueva JL, Galiani MD, Peña J, Solana R. NK-associated receptors on CD8 T cells from treatment-naive HIV-infected individuals: defective expression of CD56. *AIDS*. 2002 Jan;16(2):197-200.
189. Varla-Leftherioti M, Spyropoulou-Vlachou M, Niokou D, Keramitsoglou T, Darlamitsou A, Tsekoura C, Papadimitropoulos M, et al. Natural killer (NK) cell receptors' repertoire in couples with recurrent spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol*. 2003 Mar;49(3):183-91.
190. Snyder MR, Weyand CM, Goronzy JJ. The double life of NK receptors: stimulation or co-stimulation? *Trends Immunol*. 2004 Jan;25(1):25-32.
191. Huard B, Karlsson L. A subpopulation of CD8⁺ T cells specific for melanocyte differentiation antigens expresses killer inhibitory receptors (KIR) in healthy donors: evidence for a role of KIR in the control of peripheral tolerance. *Eur J Immunol*. 2000 Jun;30(6):1665-75.
192. Pedersen LØ, Vetter CS, Mingari MC, Andersen MH, Straten P, Bröcker EB, Becker JC. Differential expression of inhibitory or activating CD94/NKG2 subtypes on MART-1-reactive T cells in vitiligo versus melanoma: a case report. *J Invest Dermatol*. 2002 Apr;118(4):595-9.
193. Vivier E, Anfossi N. Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *Nat Rev Immunol*. 2004 Mar;4(3):190-8.
194. Borrego F, Masilamani M, Marusina AI, Tang X, Coligan JE. The CD94/NKG2 family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance. *Immunol Res*. 2006;35(3):263-78.

195. Natarajan K, Dimasi N, Wang J, Mariuzza RA, Margulies DH. Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:853-85.
196. Rajalingam R. Genomic diversity of human natural kill cell receptors. *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) Quarterly, Fourth Quarter.* 2003;138-42.
197. Kabalak G, Koch S, Dobberstein B, The YH, Matthias T, Schnarr S, Schmidt RE, Witte T. Immunoglobulin-like transcripts as risk genes for autoimmunity. *Ann NY Acad Sci.* 2007 Sep;1110:10-4.
198. Petrie EJ, Clements CS, Lin J, Sullivan LC, Johnson D, Huyton T, Heroux A, et al. CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence. *J Exp Med.* 2008 Mar;205(3):725-35.
199. Byers AM, Andrews NP, Lukacher AE. CD94/NKG2A expression is associated with proliferative potential of CD8 T cells during persistent polyoma virus infection. *J Immunol.* 2006 May;176(10):6121-9.
200. Sheu BC, Chiou SH, Lin HH, Chow SN, Huang SC, Ho HN, Hsu SM. Up-regulation of inhibitory natural killer receptors CD94/NKG2A with suppressed intracellular perforin expression of tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes in human cervical carcinoma. *Cancer Res.* 2005 Apr;65(7):2921-9.
201. Hamzaoui A, Chaouch N, Graïri H, Ammar J, Hamzaoui K. Inflammatory process of CD8⁺CD28⁻ T cells in induced sputum from asthmatic patients. *Mediators Inflamm.* 2005 Aug;2005(3):160-6.
202. Eylar EH, Lefranc CE, Yamamura Y, Báez I, Colón-Martinez SL, Rodriguez N, Breithaupt TB. HIV infection and aging: enhanced interferon- and tumor necrosis factor-alpha production by the CD8⁺CD28⁻ T subset. *BMC Immunol.* 2001;2:10(12 pages).
203. Sun Z, Zhong W, Lu X, Shi B, Zhu Y, Chen L, Zhang G, Zhang X. Association of Graves' disease and prevalence of circulating IFN-gamma-producing CD28(-) T cells. *J Clin Immunol.* 2008 Sep;28(5):464-72.

204. Kurokohchi K, Masaki T, Arima K, Miyauchi Y, Funaki T, Yoneyama H, Yoshida S, et al. CD28-negative CD8-positive cytotoxic T lymphocytes mediate hepatocellular damage in hepatitis C virus infection. *Clin Immunol.* 2003 Nov;23(6):518-27.
205. Voskoboinik I, Thia MC, Fletcher J, Ciccone A, Browne K, Smyth MJ, Trapani JA. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain. A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem.* 2005 Mar;280(9):8426-34.
206. Clark R, Griffiths GM. Lytic granules, secretory lysosomes and disease. *Curr Opin Immunol.* 2003 Oct;15(5):516-21.
207. Raja SM, Metkar SS, Froelich CJ. Cytotoxic granule-mediated apoptosis: unraveling the complex mechanism. *Curr Opin Immunol.* 2003 Oct;15(5):528-32.
208. Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med.* 2002 Aug;196(4):493-503.
209. Smyth M. Perforin. *Mod Asp Immunobiol.* 2003;3(1):12.
210. Catalfamo M, Henkart PA. Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Curr Opin Immunol.* 2003 Oct;15(5):522-7.
211. Tamang DL, Alves BN, Elliott V, Redelman D, Wadhwa R, Fraser SA, Hudig D. Regulation of perforin lysis: implications for protein disulfide isomerase proteins. *Cell Immunol.* 2009;255(1-2):82-92.
212. Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature.* 1994 May;369(6475):31-7.
213. Pipkin ME, Lieberman J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol.* 2007 Jun;19(3):301-8.

214. Bots M, Medema JP. Granzymes at a glance. *J Cell Sci.* 2006 Dec;119(Pt 24):5011-4.
215. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2003 May;3(5):361-70.
216. Karagöz B, Bilgi O, Gümüş M, Erikçi AA, Sayan O, Türken O, Kandemir EG, Oztürk A, Yaylacı M. CD8⁺CD28⁻ cells and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of advanced stage lung cancer patients. *Med Oncol.* 2009 Jan. 16 (online): Epub ahead of print.
217. Larkin JMG, Kipps ELS, Powell CJ, Swanton C. Systemic therapy for advanced renal cell carcinoma. *Ther Adv Med Oncol.* 2009;1(1):15-27.
218. Jievaltas M. *Inkstų vėžys.* Kaunas: KMU leidykla, 2006.
219. Valuckas KP, Aleknavičienė B (sudarytojai). *Pagrindinių lokalizacijų piktybinių navikų diagnostikos ir gydymo pagrindai.* Vilnius, 2004.
220. Bataille V, de Vries E. Melanoma-Part 1: epidemiology, risk factors, and prevention. *BMJ.* 2008 Nov;337:a2249(1287-91).
221. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A (Eds). *World health organisation classification of tumours. Pathology and genetics of skin tumours.* Lyon: IARC Press, 2006.
222. Schreiber H, Rowley DA. Quo vadis, specificity? *Science.* 2008 Jan;319(5860):164-5.
223. Parmiani G. Melanoma antigens and their recognition by T cells. *Keio J Med.* 2001 Jun;50(2):86-90.
224. Komohara Y, Harada M, Arima Y, Suekane S, Noguchi M, Yamada A, Itoh K, Matsuoka K. Identification of target antigens in specific immunotherapy for renal cell carcinoma. *J Urol.* 2007 Mar;177(3):1157-62.
225. Zeng G, Lam JS, Caliliw R, Figlin RA, Wang QJ, Belldegrun AS. Identification of T cell clones that recognize shared renal cell carcinoma antigens. *Proc Amer Assoc Cancer Res.* 2004;45:5476.
226. Griffiths RW, Gilham DE, Dangoor A, Ramani V, Clarke NW, Stern PL, Hawkins RE. Expression of the 5T4 oncofoetal antigen in renal cell

- carcinoma: a potential target for T-cell-based immunotherapy. *Br J Cancer*. 2005 Sep;93(6):670–7.
227. Cui Z, Willingham MC, Hicks AM, Alexander-Miller MA, Howard TD, Hawkins GA, Miller MS, et al. Spontaneous regression of advanced cancer: identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 May;100(11):6682-7.
228. Dussan C, Zubor P, Fernandez M, Yabar A, Szunyogh N, Visnovsky J. Spontaneous regression of a breast carcinoma: a case report. *Gynecol Obstet Invest*. 2008;65(3):206-11.
229. Kalialis LV, Drzewiecki KT, Klyver H. Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Res*. 2009 Oct;19(5):275-82.
230. Sakai K, Kageshita T, Ishihara T, Misumi S, Makino T, Ono T. Two cases of melanoma with a spontaneous regression in primary lesions showing rapid progressive disease. Analysis of the Hammond effect. *Nish J Dermatol*. 2001;63(4):398-402 (abstract in English, article in Jap.).
231. Kobayashi K, Sato T, Sunaoshi K, Takahashi A, Tamakawa M. Spontaneous regression of primary renal cell carcinoma with inferior vena caval tumor thrombus. *J Urol*. 2002 Jan;167(1):242-3.
232. Nakajima T, Suzuki M, Ando S, Iida T, Araki A, Fujisawa T, Kimura H. Spontaneous regression of bone metastasis from renal cell carcinoma; A case report. *BMC Cancer*. 2006;6:11 (5 pages).
233. Kim H, Park BK, Kim CK. Spontaneous regression of pulmonary and adrenal metastases following percutaneous radiofrequency ablation of a recurrent renal cell carcinoma. *Korean J Radiol*. 2008 Sep–Oct;9(5):470–2.
234. Thoroddsen A, Gudbjartsson T, Geirsson G, Agnarsson BA, Magnusson K. Spontaneous regression of pleural metastases after nephrectomy for renal cell carcinoma—a histologically verified case with nine-year follow-up. *Scand J Urol Nephrol*. 2002;36(5):396-8.

235. Chang KC, Chan KL, Lam CW. Spontaneous regression of renal cell carcinoma metastases. *Hong Kong Medical Journal (HKMJ)*. 1999;5:72-5.
236. Altschuler EL, Ray A. Spontaneous regression of a pancreatic metastasis of a renal cell carcinoma. *Arch Fam Med*. 1998 Nov-Dec;7(6):516-7.
237. Guida M, Colucci G. Immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma: is it a therapeutic option yet? *Ann Oncol*. 2007 Jun;18(6):vi149-52.

9. PRIEDAI

Priedas nr. 1: Asmens informavimo forma

Mes kviečiame Jus dalyvauti moksliniame klinikiniame tyrime „*CD8^hCD57⁺ T limfocitų reguliacinių savybių tyrimas imunogeniškomis vėžio formomis sergančių pacientų periferiniame kraujyje*“, kuris bus vykdomas Vilniaus universiteto Onkologijos institute.

Šio dokumento tikslas - informuoti Jus apie tyrimą ir pakviesti jame dalyvauti. Labai svarbu, kad Jūs, prieš nusprendamas dalyvauti, gautumėte visą su tyrimu susijusią informaciją, susipažintumėte su visomis procedūromis, galima rizika ir nepatogumais tyrimo metu.

TYRIMO TIKSLAS IR NUMATOMA NAUDA

Šio tyrimo tikslas – ištirti išplitusiu inkstų vėžiu ir didelės rizikos odos melanoma sergančių žmonių periferinio kraujo imunosupresinius / reguliacinius T limfocitus bei jų prognostinę reikšmę, parenkant gydymą ir palyginti gautus rezultatus su sveikų individų analogiškais imunologiniais rodikliais. Šie tyrimai leis įvertinti onkologinių ligonių organizmo apsauginių reakcijų būklę ir ateityje padės ieškoti gydymo metodų, labiau pritaikytų konkrečiam ligoniui.

PROCEDŪROS

Imunologinis tyrimas atliekamas, naudojant periferinį veninį kraują.

- Jei Jūs priklausote tiriamų ligonių grupei arba esate sveikas savanoris ir sutinkate dalyvauti šiame tyrime, tai Jums bus paimta 10 ml kraujo iš venos į 2 vakuuminius mėgintuvėlius – į mėgintuvėlį su juodu/mėlynu dangteliu bus paimta 8 ml, o į mėgintuvėlį su violetiniu dangteliu – 2 ml. Šis kraujas bus naudojamas *tik moksliniams tyrimams* – imunologinių rodiklių nustatymui.

- Jei Jūs esate sveikas individas, dirbate VU Onkologijos institute ir sutinkate dalyvauti tyrime kaip kontrolinės grupės narys, tai profilaktinio sveikatos patikrinimo metu Jums iš viso bus paimta 10 ml kraujo į du vakuuminius mėgintuvėlius:

1. 2 ml talpos su violetiniu dangteliu (antikoaguliantas - EDTA). Šis kraujas bus naudojamas bendram hematologiniam ištyrimui (profilaktinio sveikatos patikrinimo dalis). Po tyrimo likęs kraujas bus panaudotas moksliniams tyrimams - imunologinių rodiklių nustatymui;

2. 8 ml talpos su juodu/mėlynu dangteliu (antikoaguliantas – natrio citratas). Šis kraujas bus naudojamas *tik moksliniams tyrimams* – imunologinių rodiklių nustatymui.

RIZIKA IR DISKOMFORTAS

Žala ir rizika minimali, nes įprastinių procedūrų metu į du vakuuinius mėgintuvėlius Jums bus paimtas kraujas iš rankos linkio venos (iš viso 10 ml). Be to, mums reikės užrašyti ir peržiūrėti šio tyrimo metu gautą informaciją ir duomenis iš Jūsų ligos istorijos, esančios VU Onkologijos institute. Sveiki individai tyrėjams pateiks savo duomenis apie amžių bei kai kurias galimas lėtines ligas.

IŠLAIDOS/KOMPENSACIJOS

Dalyvaujantis tyrime žmogus jokių papildomų išlaidų neturės. Jums nereikės mokėti nei už atliktas procedūras, nei už vizitus pas gydytoją.

KONFIDENCIALUMAS

Visa informacija, susijusi su Jūsų dalyvavimu tyrime, bus konfidenciali. Dalyvaujančiųjų pavardės bus koduojamos, kodus pagrindinis tyrėjas saugos seife. Nei Jūsų pavardė, nei kiti asmeniniai duomenys (asmens kodas, gimimo data, adresas, sveikatos būklė) jokiuose tyrimo dokumentuose ar publikacijose nebus minimi. Su įrašais Jūsų medicininuose dokumentuose teisę susipažinti turės tik tyrėjai. Pasirašydami sutikimą, Jūs tokią teisę jiems suteiksite. Informacija, gauta atliekant tyrimą, gali būti paskelbta, tačiau pagal ją *nebus galima identifikuoti tiriamojo*.

LAISVANORIŠKAS DALYVAVIMAS

Jūsų dalyvavimas šiame tyrime yra laisvanoriškas. Jūs bet kada galite anuliuoti savo sutikimą, nenurodant priežasties. Nedalyvavimas tyrime ar vėlesnis atsisakymas tęsti dalyvavimą neturės jokios įtakos Jūsų tolimesniam gydymui. Pasirašydamas šią sutikimo formą, Jūs neapribojate jokių savo, kaip paciento, teisių.

KONTAKTAI

Iškilus neaiškumams ar ieškant kitos informacijos, Jūs galite kreiptis į pagrindinį tyrėją:

Dr. Vita Pašukonienė, P. Baublio g. 3b-321, LT-08406, Vilnius, tel.: (8-5) 2 19 09 31; elektroninis adresas: vita.pasukoniene@vuoi.lt

Iškilus klausimų dėl dalyvaujančių tyrimo pacientų teisių, Jūs galite kreiptis:

Lietuvos bioetikos komitetas, tel.:(8-5) 2 124 565, fax.:(8-5) 2 124 565, adresas: Didžioji g. 22, LT-01128, Vilnius.

Priedas Nr. 2: INFORMUOTO ASMENS SUTIKIMAS

Klinikinio tyrimo pavadinimas: „*CD8^hCD57⁺ T limfocitų reguliacinių savybių tyrimas imunogeniškomis vėžio formomis sergančių pacientų periferiniame kraujyje*“

Aš perskaičiau pridedamą Asmens informavimo formą ir suprantu šio tyrimo tikslą, o taip pat galimą dalyvavimo šiame tyrime naudą ir riziką. Man buvo duota galimybė ir laikas užduoti klausimus, ir į visus juos buvo atsakyta.

Aš suprantu, kad mano dalyvavimas yra laisvanoriškas, ir kad aš galiu laisvai pasitraukti bet kuriuo metu, nenurodant priežasties, be jokio neigiamo poveikio savo sveikatos priežiūrai ar įstatyminėms teisėms.

Aš leidžiu peržiūrėti mano medicininius duomenis, bet suprantu, kad konfidencialumas bus išsaugotas tokia apimtimi, kokia aprašyta Asmens informavimo formoje. Suprantu, kad taip siekiama patikrinti, ar su tyrimu susijusi informacija yra tiksli ir ar tyrimas vykdomas teisingai. Aš taip pat sutinku, kad šio tyrimo rezultatai gali būti publikuojami, bet kad mano tapatybė nebus atskleista jokioje publikacijoje. Aš sutinku, kad duomenys ir įrašai, neatskleidžiantys mano tapatybės, būtų įtraukiami į duomenų bazę, kuri gali būti naudojama šio tyrimo tikslams ir gali būti perduodama trečiosioms šalims mano valstybėje ir kitur.

Aš laisvanoriškai duodu savo, kaip informuoto asmens, sutikimą dalyvauti šiame tyrime.

_____	_____	_____
Tiriamąjį vardą, pavardę (spausdintomis raidėmis)	Tiriamąjį parašą	Data
_____	_____	
Tyrėjo vardą, pavardę (spausdintomis raidėmis) Įgaliotas pagrindinio tyrėjo	Tyrėjo parašą	
_____	_____	
Pagrindinio tyrėjo vardą, pavardę (spausdintomis raidėmis)	Pagrindinio tyrėjo parašą	

Priedas nr. 3.

Klinikinio tyrimo „ $CD8^h CD57^+$ T limfocitų reguliacinių savybių tyrimas imunogeniškomis vėžio formomis sergančių pacientų periferiniame kraujyje“

DUOMENŲ REGISTRAVIMO ANKETA

Ligonio vardas ir pavardė:

Ligonio kodas (pirmosios 3 pavardės raidės ir imunologinio tyrimo data):

Asmens kodas:

Gimimo data: _____

Imunologinio tyrimo data: _____

Ligonio amžius (imunologinio tyrimo dieną): _____

Adresas: _____

Diagnozė: _____

Naviko histologinio verifikavimo data: _____

Ligos progresavimo nustatymo data: _____

Paskutinio vizito data: _____

Mirties data ir priežastis: _____

Pastabos: _____
