

Величко Л.Н., Вит В.В., Малецкий А.П., Богданова А.В.

ДИНАМИКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМОЙ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ ФОТОКОАГУЛЯЦИИ И КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ (ФОТОКОАГУЛЯЦИЯ + β -АППЛИКАЦИОННАЯ ТЕРАПИЯ)

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины», Одесса, Украина

Ключевые слова: увеальная меланома, фотокоагуляция, β -аппликационная терапия, молекулярные маркеры активации лимфоцитов

Для изучения лечебного патоморфоза после проведения различных методов лечения необходимо знание молекулярных путей, которые активируются во время клеточного стресса и приводят к гибели опухолевой клетки по так называемому иммуногенному типу, что обеспечивает поступление соответствующих сигналов в иммунную систему. Этот процесс может привести к развитию опухолеспецифического иммунитета, когда и первичная опухоль и метастазы в различных органах и тканях подвергаются воздействию со стороны иммунной системы, что способствует повышению отдаленной выживаемости [1, 2, 3]. Такие непрямые эффекты – в пределах или за пределами места воздействия – указывают на возможность разработки новых терапевтических подходов, включающих иммунотерапию.

Достижение положительного эффекта при применении органосохраняющего лечения увеальных меланом является результатом не только прямого повреждающего действия физических факторов на клетки опухоли. Происходит также активация различных биологических механизмов, направленных на углубление деструкции поврежденных клеток, резорбцию и выделение продуктов их распада [4].

Цель - изучить характер иммунного ответа у больных увеальной меланомой после проведения фотокоагуляции и комбинированной терапии (фотокоагуляция + β -аппликационная терапия).

Материал и методы

В данном исследовании проводилось сравнение уровня экспрессии маркеров активации лимфоцитов периферической крови у больных увеальной меланомой до и после проведения фотокоагуляции и комбинированной терапии (фотокоагуляция + β -аппликационная терапия).

I группа (n=42) – проводилась фотокоагуляция.

II группа (n=6) – проводилась комбинированная терапия (фотокоагуляция + β -аппликационная терапия).

Определение уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови CD7⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD95⁺, CD150⁺ проводилось гистоиммуноцитохимическим методом [5].

CD7⁺ – член молекулярного семейства IgSF с молекулярной массой 40 кД. Экспрессирован на тимоцитах, зрелых Т-клетках, НК-клетках, полипотентных гемопоэтических стволовых клетках, кроветворных и лимфоидных клетках-предшественниках. Функционирует как костимуляторная молекула, индуктор секреции цитокинов, модификатор адгезии клеток.

CD25⁺ – Тас-антиген-высоко O- N-гликозирированная молекула типа I. Молекулярная масса 55 кД. Выраженная экспрессия в Т-клетках, стимулированных ФГА, в В-клетках, стимулированных анти-IgM-антителами, моноцитах и макрофагах, активированных ЛПС. Функционирует как рецептор ИЛ-2, лигандами которого являются ИЛ-2, CD122⁺ (ИЛ-2R β) и CD132⁺ (ИЛ-2R β).

CD38⁺ – одноцепочечная трансмембранная молекула типа II (АДФ-рибозилциклаза). Молекулярная масса 45 кД. Экспрессируется на большинстве гемопоэтических клеток, преимущественно на ранних стадиях дифференцировки и при активации. Высокий уровень экспрессии на плазматических клетках. Выявляется в ткани головного мозга, почках, мышцах. Функционирует как регулятор активации и пролиферации, зависящий от клеточного микроокружения, участвует в адгезии лимфоцитов и эндотелиальных клеток. Используется для мониторинга при ВИЧ-инфекции и иммунофенотипировании лейкозов и лимфом.

CD45⁺ - рецептор протеинтирозинфосфатазы - длинная одноцепочечная трансмембранная молекула типа I. Молекулярная масса изоформ CD45⁺ – 180, 200, 210, 220 кД. Общий лейкоцитарный антиген (LCA). Высокий уровень экспрессии на всех гемопоэтических клетках. Особенно высокая плотность экспрессии на лимфоцитах (10% их поверхности приходится на CD45⁺). Для различных субпопуляций кроветворных клеток характерна экспрессия разных изоформ: CD 45RO на кортикальных тимоцитах, активированных Т-клетках, Т-клетках памяти; CD 45RA на медуллярных тимоцитах, покоящихся Т-клетках и т.д. Может наблюдаться экспрессия многих изоформ на одном типе клеток. Лиганды – галектин-1, CD2⁺, CD3⁺, CD4⁺, ассоциированный с фосфатазой лимфоцитов фосфопротеин (LPAP). CD45⁺ участвует в активации лимфоцитов через TCR и BCR, в рецептор-опосредуемой активации других типов лейкоцитов.

CD54⁺ – молекула межклеточной адгезии – 1 (ICAM-1), член семейства IgSF. Молекулярная масса 90 кД. Высокий уровень экспрессии на активированных эндотелиальных клетках, клетках некоторых солидных опухолей, умеренный – на активированных Т- лимфоцитах, активированных В- лимфоцитах и моноцитах. Экспрессия CD54⁺ индуцируется на эпителиальных, эндотелиальных клетках и фибробластах при действии цитокинов (ФНО, ИЛ-1, ИФγ). Взаимодействие с CD11a/CD18 (LFA-1) или CD11b/CD18 (Mac-1) приводит к развитию иммунных реакций и/или воспаления. Является рецептором риновируса и эритроцитов, инфицированных малярийными паразитами.

CD95⁺ – антиген апоптоза 1 (APT1), или Fas-антиген с молекулярной массой 45 кД. Трансмембранная молекула типа I, относящаяся к суперсемейству рецепторов ФНО. Высокий уровень экспрессии на активированных Т- и В-клетках. Опосредует сигналы, индуцирующие апоптоз.

CD150⁺ – одноцепочечная трансмембранная молекула типа I (SLAM, IPO-3) с молекулярной массой 65-85 кД. Экспрессируется на тимоцитах, субпопуляции CD45RO⁺ Т-лимфоцитов, В-лимфоцитах, дендритических клетках, эндотелиальных клетках. Выполняет функции костимулирующей молекулы на В-лимфоцитах и дендритических клетках. Связывание с лигандами (тирозин и серин/треонин- киназой, тирозинфосфатазой CD45⁺) усиливает пролиферацию и выработку иммуноглобулинов активированными В-клетками.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы «Statistica 7.0». Определялись средние значения со стандартным отклонением (M±SD). Для оценки полученных результатов применялся непараметрический тест Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости p<0,05.

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования по изучению динамики уровня экспрессии маркеров активации лимфоцитов у больных увеальной меланомой после проведения фотокоагуляции показали значимое увеличение экспрессии CD38⁺ (рис. 1). До лечения данный показатель составлял 132,0±89,0 кл/мкл, после проведения фотокоагуляции 191,0±92,0 кл/мкл (p<0,05). Данная молекула принимает участие в адгезии и передаче внутриклеточных сигналов. Увеличение уровня экспрессии CD38⁺ повышает эффективность противоопухолевого иммунного ответа.

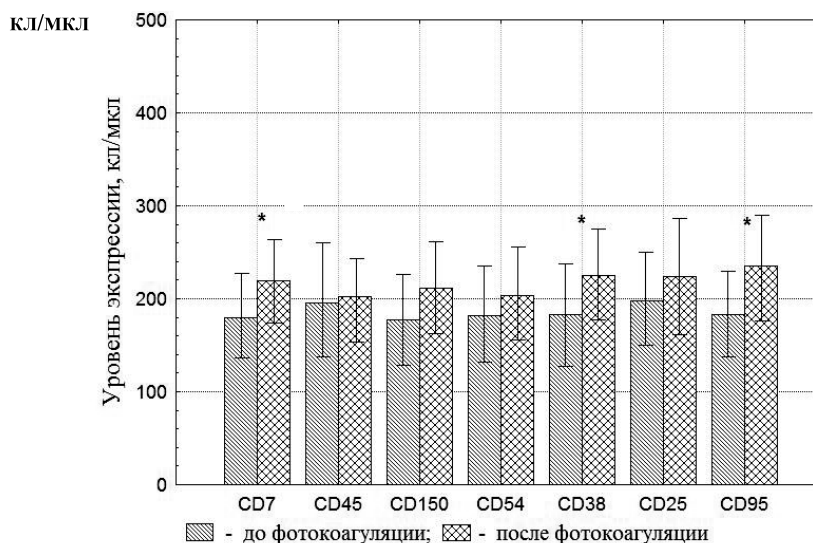


Рис. 1. Динамика экспрессии маркеров активации лимфоцитов у больных увеальной меланомой после проведения фотокоагуляции (* - p < 0,05).

Также после проведения фотокоагуляции отмечено значимое увеличение уровня экспрессии маркера апоптоза CD95⁺ (FAS/APO) с 123,0±42,0 кл/мкл, до 229,0±113,0 кл/мкл (p<0,05).

Гибель лимфоцитов через апоптоз – крайне важный механизм иммунной регуляции и средство поддержания иммунного гомеостаза. Апоптоз обеспечивает деление клеток с высокой активностью к антигену, а также гибель лимфоцитов не способных к иммунному ответу после завершения их функции. Большинство активированных клеток погибает через апоптоз. Рецептор FAS участвует в ликвидации активированных клеток и следовательно, в подавлении избыточного иммунного ответа. После выполнения Т-клетками своей функции их избыток уничтожается во избежание накопления активированных клеток.

Маркеры активации лимфоцитов периферической крови CD7⁺, CD25⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD150⁺ после проведения фотокоагуляции имели тенденцию к увеличению, однако значимо не отличались от уровня до проведения фотокоагуляции.

Изучение динамики молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови у больных увеальной меланомой после проведения комбинированной терапии (фотокоагуляция + β-аппликационная терапия) показало значимое увеличение всех изучаемых маркеров (рис. 2).

Уровень экспрессии CD7⁺ до начала лечения составлял 207,0±94,0 кл/мкл, после лечения – 386,0±114,0 кл/мкл (p<0,05). Активация субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD7⁺, свидетельствует о индукции секреции цитокинов, а также о повышении общей напряженности иммунитета.

После проведения комбинированной терапии значимо увеличился уровень экспрессии CD45⁺. До лечения он составлял 202,0±89,0 кл/мкл, после лечения 350,0±139,0 кл/мкл (p<0,05).

Экспрессия CD45⁺ необходима для передачи сигнала через Т-клеточный рецептор. Данный белок является членом семейства тирозинных протеинфосфатаз. Тирозинные протеинфосфатазы регулируют рост, дифференцировку, митотический цикл иммунокомпетентных клеток. Снижение экспрессии CD45⁺ приводит к дефектам селекции лимфоцитов, ослаблению сопряжения TCR/CD3⁺ - сигнального пути с кальциевыми сигналами в клетке. Увеличение экспрессии CD45⁺ позволяет восстановить способность лимфоцита получать информацию от антигенпрезентирующих клеток путем прямого взаимодействия CD45⁺ с рецептором C-type lectin MGL макрофага.

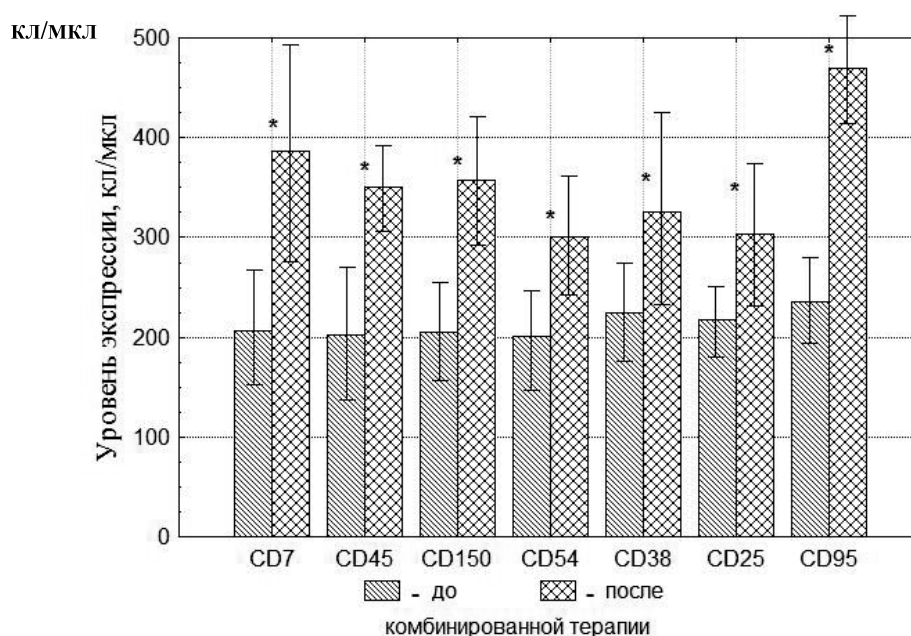


Рис. 2. Динамика экспрессии маркеров активации лимфоцитов у больных увеальной меланомой после проведения комбинированной терапии (фотокоагуляция + β-аппликационная терапия) (* - p < 0,05).

Отмечено также, значимое увеличение уровня экспрессии CD150⁺, после проведения комбинированной терапии, до начала лечения его уровень составлял 205,0±98,0 кл/мкл, после лечения – 358,0±196,0 кл/мкл (p<0,05). Увеличение уровня экспрессии данной молекулы свидетельствует об активации гуморального звена иммунной защиты, при которой происходит нормализация выработки иммуноглобулинов всех классов. Уровень экспрессии молекулы межклеточной адгезии (ICAM-1) CD54⁺ также значимо увеличивался после проведения комбинированной терапии с 201,0±98,0 кл/мкл до 300,0±122,0 кл/мкл (p<0,05).

Данная молекула участвует в распознавании, межклеточной кооперации и адгезии. Повышение уровня экспрессии CD54⁺ на лимфоцитах периферической крови у больных увеальной меланомой после комбинированной терапии свидетельствует о повышении уровня функционального взаимодействия лимфоцитов с другими клетками, что обеспечивает адекватные иммунологические противоопухолевые реакции.

Отмечено также достоверное увеличение уровня экспрессии CD38⁺ с 225,0±100,0 кл/мкл до 325,0±131,0 кл/мкл (p<0,05). Данная молекула принимает участие в передаче внутриклеточных сигналов, увеличивает эффективность противоопухолевого ответа.

После проведения комбинированного лечения отмечено значимое увеличение уровня экспрессии CD25⁺ - рецептора к ИЛ-2 с 218,0±130,0 кл/мкл до 304,0±87,0 кл/мкл (p<0,05).

Высокий уровень экспрессии CD25⁺ свидетельствует об активировании перфорин-гранзимового механизма цитотоксичности. Данный рецептор является молекулярным маркером повышения продукции ИЛ-2 иммунными клетками.

Маркер апоптоза CD95⁺ (FAS-лиганд) значимо увеличился после проведения комбинированной терапии с 235,0±115,0 кл/мкл до 470,0±223,0 кл/мкл (p<0,05).

Рецептор FAS участвует в инициации гибели клеток мишеней. Белок Fas L, который имеет молекулярную массу 40 кД и оказывает выраженное цитотоксическое действие на клетки, экспрессирующие рецептор FAS.

Таким образом, проведение комбинированной терапии обеспечивает повышение активности рецепторного аппарата иммунокомпетентных клеток, усиление специализированных функций всех популяций лимфоцитов, участвующих в специфическом иммунном ответе.

Проведение фотокоагуляции увеличивает распознавание поверхностных структур опухолевых клеток. Опухолевые клетки являются слабоиммуногенными или неиммуногенными и поэтому не способны вызывать эффективный иммунный ответ. Это способствует прогрессированию опухолевого процесса [4]. После проведения фотокоагуляции происходит денатурация опухолевых белков. Конформационные изменения, которые образуются в результате разрыва внутримолекулярных и межмолекулярных связей, приводят к перераспределению пептидов наружной поверхности клеток в иммуногенные кластеры, что обеспечивает эффективность противоопухолевых реакций организма путем воссоздания «индивидуального портрета» опухоли и дает возможность прицельного иммунного ответа против ее антигенов [6].

Проведенное нами исследование показало, что комбинированная терапия максимально усиливает противоопухолевые эффекты иммунной системы в отношении злокачественного новообразования.

В большинстве исследований проведенных ранее, основное внимание уделяли повреждению ДНК и репарационной способности облученных клеток, без учета данных, что большое влияние на радиочувствительность опухоли *in vivo* оказывает степень иммунокомпетентности организма.

Комбинированная терапия является триггером многих проиммуногенных механизмов. Так, увеличивается миграция иммунных клеток посредством индукции хемокинов, которые привлекают в облученный опухолевый очаг эффекторные Т-клетки [4]. Вероятно, эти изменения оказывают влияние на степень выраженности клинически определяемого противоопухолевого эффекта. Лучевое воздействие на опухолевые клетки приводит к улучшению процессов распознавания и уничтожения опухолевых клеток Т-лимфоцитами. Уничтожение злокачественных клеток посредством апоптоза, индуцированного активацией сигнального пути FAS, или посредством цитотоксических гранул приводит к высвобождению новых опухолевых антигенов, что вызывает усиление иммунного ответа. Если эффекторные Т-клетки генерируются в достаточном количестве, они могут распознавать опухолевые клетки и инфильтрировать метастазы [7].

Таким образом, индукция стойкого противоопухолевого иммунного ответа в месте облучения опухолевого очага, может также вызывать эффекты в опухолевых клетках, находящихся в местах, расположенных вне поля облучения.

Этот процесс может привести к развитию опухолеспецифического иммунитета, когда и первичная опухоль, и метастазы в различных органах и тканях подвергаются воздействию со стороны иммунной системы, что способствует повышению отдаленной выживаемости.

Заключение

Полученные результаты указывают на различный уровень активации лимфоцитов при проведении фотокоагуляции и при комбинированном воздействии (фотокоагуляция +β-аппликационная терапия).

После проведения фотокоагуляции отмечено значимое увеличение уровня экспрессии CD38⁺ и CD95⁺ на лимфоцитах периферической крови больных увеальной меланомой.

Проведение комбинированной терапии (фотокоагуляция +β-аппликационная терапия) значимо увеличивает экспрессию маркеров активации лимфоцитов CD7⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD95⁺, CD150⁺.

LİTERATURA

1. Prise K.M., Schettino G., Folkard M., Held K.D. New insights on cell death from radiation exposure // *Lancet Oncol.*, 2005, v.6(7), p.520-528.
2. Lorimore S.A., Coates P.J., Scobie G.E. et al. Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? // *Oncogene.*, 2001, v.20(48), p.7085-7095.
3. Wright E.G., Coates P.J. Untargeted effects of ionizing radiation: implications for radiation pathology // *Mutat. Res.*, 2006, v.597, №1-2, p.119-132.
4. Вит В.В. Опухолевая патология органа зрения. Одесса: Астропринт, 2009, т.1, 610 с.
5. Глузман Д.Ф., Скляренко Л.М., Надгорная В.А. и др. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей. Киев: Морион, 2003, с. 6-15.
6. Малецкий А.П., Вит В.В., Ваничкин А.А. Особенности иммунного статуса больных увеальными меланомами в процессе проведения органосохранного лечения // *Офтальмол. журн.*, 1989, №6, с.341-346.
7. Demaria S., Kawashima N., Yang A.M. et al. Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer // *Clin. Cancer Res.*, 2005, v.11(2), p.728-734.

Veliçko L.N., Vit V.V., Maletskiy A.P., Boqdanova A.V.

UVEAL MELANOMA İLƏ XƏSTƏLƏRDƏ FOTOKOAQULYASIYA VƏ KOMBİNƏOLUNMUŞ TERAPIYANIN (FOTOKOAQULYASIYA + B-APPLİKASİON TERAPIYA) KEÇİRİLMƏSİNDƏN SONRA LİMFOSİTLƏRİN MOLEKULYAR MARKERLƏRİNİN AKTİVASİYASININ EKSPRESSİYASI SƏVIYYƏSİNİN DİNAMİKASI

“Ukrayna TEA V.P.Filatov ad. Göz xəstəlikləri və toxuma terapiyası institutu” Dövlət Müəssisəsi, Odessa şəh.

Açar sözlər: *uveal melanoma, fotokoaqulyasiya, β-applikasion terapiya, limfositlərin molekulyar markerlərinin aktivasiyası*

XÜLASƏ

Məqsəd – uveal melanoma ilə xəstələrdə fotokoaqulyasiya və kombinəolunmuş terapiyanın (fotokoaqulyasiya + β-applikasion terapiya) keçirilməsindən sonra immun cavabın xarakterini öyrənmək.

Material və metodlar

Hazırkı tədqiqat işində uveal melanoma ilə xəstələrdə fotokoaqulyasiya və kombinəolunmuş terapiyanın (fotokoaqulyasiya + β-applikasion terapiya) keçirilməsindən əvvəl və sonra periferik qanın limfositlərinin molekulyar markerlərinin aktivasiyasının ekspressiyası səviyyəsinin müqayisəsi aparılmışdır.

I qrupda (n=42) – fotokoaqulyasiya aparılmışdır.

II qrupda (n=6) – kombinəolunmuş terapiya (fotokoaqulyasiya + β-applikasion terapiya) keçirilmişdir.

CD7⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD95⁺, CD150⁺ periferik qanın limfositlərinin molekulyar markerlərinin aktivasiyası ekspressiyasının səviyyəsinin müəyyən edilməsi histoimmunositokimyəvi metodla aparılmışdır.

Nəticə

Uveal melanoma ilə xəstələrdə fotokoaqulyasiyadan sonra limfositlərinin molekulyar markerlərinin aktivasiyası ekspressiyasının səviyyəsinin öyrənilməsinə yönəlmiş tədqiqatlar CD38⁺ və CD95⁺ ekspressiyasının əhəmiyyətli artmasını göstərmişdir. Kombinəolunmuş terapiyanın (fotokoaqulyasiya + β-applikasion terapiya) keçirilməsi əhəmiyyətli dərəcədə limfositlərinin molekulyar markerlərinin aktivasiyası ekspressiyasını artırır.

Yekun

Alınan nəticələr fotokoagulyasiya və kombinə olunmuş terapiya (fotokoagulyasiya + β -applikasiya terapiya) zamanı limfositlərinin molekulyar markerlərinin aktivasiyası ekspressiyası səviyyəsinin müxtəlif olduğunu göstərir.

Limfositlərin daha yüksək aktivasiyası səviyyəsi fotokoagulyasiya və β -applikasiya terapiyanın birgə tətbiqi zamanı qeyd olunmuşdur.

Velichko L.N., Vit V.V., Maletsky A.P., Bogdanova A.V.

DYNAMICS OF MOLECULAR MARKERS EXPRESSION OF BLOOD LYMPHOCYTES ACTIVATION AT PATIENTS WITH AN UVEAL MELANOMA AFTER PHOTOCOAGULATION AND COMBINED THERAPY (PHOTOCOAGULATION + BRACHYTHERAPY)

SI "The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy NAMS of Ukraine", Odessa, Ukraine

Keywords: uveal melanoma, photocoagulation, brachytherapy, molecular markers lymphocyte activation

SUMMARY

Aim - to study the dynamics of molecular markers expression of blood lymphocytes activating at patients with the uveal melanoma at the different types of treatment.

Material and methods

Research was conducted in the dynamics at patients (n=67) in age 63,4 \pm 5,7 years old with the uveal melanoma at the different types of treatment. The photocoagulation was conducted in the first group (n=42), the combined therapy (photocoagulation + brachytherapy) was in the second group (n=6). The level of molecular markers expression of lymphocytes activating was determined by the histoimmunocytochemical method through the monoclonal antibodies (CD7, CD25, CD38, CD45, CD54, CD150 and CD95). The estimation of statistical meaningfulness of distinctions was executed by Mann-Whitney tests.

Results

After the photocoagulation at patients with uveal melanoma was noted the reliable increase of molecular markers of lymphocytes activating (CD38 and CD95) as compared to the indices at the beginning of treatment. The combine therapy (photocoagulation + brachytherapy) was accompanied by the reliable increase of activation markers (CD7, CD25, CD38, CD45, CD54, CD150 and CD95).

Conclusions

The highest level of the immune system activation is marked at the combine treatment. Less expressed activating at the photocoagulation. The obtained results specify on distinction of mechanisms of the immune system activating, and at the different types of treatment their biological efficiency can be different. The highest level of lymphocytes activating is noted at the combined treatment of patients with the uveal melanoma (photocoagulation + brachytherapy).

Для корреспонденции:

Величко Людмила Николаевна – канд. мед. наук, заведующая лабораторией иммунологии ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины»

Адрес: ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины», Французский бульвар, 49/51, г. Одесса, 65061, Украина

Тел.: (+38 048) 729-84-58, (+38) 098-441-79-28

E-mail: aleximmun@mail.ru