

ДИНАМИКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМОЙ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ ЭНУКЛЕАЦИИ

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

Ключевые слова: увеальная меланома, энуклеация, молекулярные маркеры активации лимфоцитов

Увеальная меланома (УМ) – первичная злокачественная внутриглазная опухоль, которая составляет 15% от меланом всех локализаций и 85% от всех внутриглазных новообразований [1, 2, 3]. Главная цель в лечении УМ – сохранение жизни пациента. В настоящее время наиболее распространенным методом органосохраняющего лечения УМ является брахитерапия, которая является альтернативой энуклеации у большинства больных УМ, позволяет пережить 5-летний период более 90% пациентов, сохранить глаз косметически, а зачастую и функционально [4].

Рядом исследователей проведен анализ выживаемости по Каплан-Майеру больных увеальной меланомой. Доля выживших за 10 лет и более после энуклеации составила 42%, после брахитерапии 90%. Показано, что брахитерапия является методом лечения, который позволяет увеличить выживаемость больных увеальной меланомой [5].

Продолжительность жизни больных зависит от метода проведенного лечения УМ. Срок появления метастазов после энуклеации в 1,2 раза короче, чем после проведения органосохраняющего лечения [6]. По данным отделения офтальмоонкологии ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины» количество больных, которым показано органосохраняющее лечение, составляет около 54,7%. У 45,3% больных лечение заканчивается энуклеацией [7]. Это, с одной стороны, обусловлено терапевтическими возможностями органосохраняющих методов лечения (световая коагуляция, транспупиллярная термотерапия, фотодинамическая терапия, брахитерапия и резекция опухоли) и большими размерами опухоли в связи с поздней диагностикой. С другой стороны, комплексный подход к лечению больных увеальной меланомой, учитывающий клинические параметры опухоли и состояние противоопухолевой резистентности, позволяет получить положительные результаты лечения опухолей больших размеров [7].

Выживаемость пациентов с УМ с выстоянием более 5 мм не зависит от метода проведенного лечения. Органосохраняющее лечение «больших» УМ не ухудшает витальный прогноз [8].

Продолжительность жизни больных с метастазами, получающих лечение у онкологов, включающее полихимиотерапию и иммунотерапию дольше (в среднем на $23,4 \pm 5,4$ месяца), чем у больных, не получающих лечения [9].

Как правило, прогноз результата лечения для конкретного больного однозначно не определен и поэтому должен быть выражен через вероятность. Эта вероятность может быть оценена на основе предыдущего опыта, накопленного в отношении подобных больных. Особенно ценным является возможность качественного прогноза различных клинических состояний при анализе альтернативных подходов к ведению больных, когда в результате таких прогнозов принимается решение об адекватной тактике лечения (хирургическое, консервативное, комбинированное с использованием иммуноотропных препаратов).

В 1978 году Zimmerman L.E., McLean J., Foster W. подняли вопрос относительно того, не может ли энуклеация быть причиной ускорения метастазирования УМ, которая увеличивает риск смертности [10].

Однако, как указывается в отчете Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS) за 2001 год, гипотеза Zimmerman все еще не имеет ответа, так как не проведено исследование, сравнивающее последствия энуклеации с последствиями естественного развития УМ [11]. Знание результатов таких исследований может явиться основой для более мотивированного принятия решения о характере лечения. Однако, проведение подобного рода проспективных исследований пока не обсуждается, хотя есть сообщения COMS от 2003 года о наблюдаемых 45 больных, отказавшихся от какого-либо лечения УМ [11].

Следует также обратить внимание на работы в которых обнаружена высокая степень корреляции выживаемости больных со статусом хромосомы 3. Известно, что метастатическая болезнь развивается при опухолях, утративших одну копию хромосомы 3 [12].

Ряд авторов [13] показал, что показатели выживаемости больных с отложенной энуклеацией не имели достоверных различий как с показателями выживаемости больных после первичной энуклеации, так и с показателями выживаемости больных после органосохраняющего лечения (период наблюдения до 10 лет).

Единой системы комплексной оценки имеющихся признаков увеальной меланомы для описания существующих биологических особенностей, обуславливающих степень ее злокачественности, на сегодняшний день не существует.

Для клинической онкоиммунологии большой интерес представляет изучение изменения мембранных гликопротеидных молекул связанных с антиген зависимой активацией Т-клеток. Важным является понимание биологического значения тех или иных молекулярно-рецепторных изменений лимфоцитов при проведении ликвидационного лечения больных увеальной меланомой.

Снижение уровня экспрессии ряда рецепторов может способствовать уменьшению силы взаимодействия клеток между собой. Низкий уровень кооперативных взаимодействий, является одним из путей истощения пула Т-цитотоксических лимфоцитов, что может приводить к снижению ресурсов антиметастатического иммунитета.

Цель - изучить характер иммунного ответа у больных увеальной меланомой после проведения энуклеации.

Материал и методы

В данном исследовании проводилось сравнение уровня экспрессии маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов периферической крови до и после проведения энуклеации у 19 больных увеальной меланомой.

У всех пациентов энуклеация проводилась при прогрессивном росте опухоли.

Уровень экспрессии маркеров ранней и поздней активации определяли гистоиммуноцитохимическим методом [14] с использованием МкАТ. Для иммунофенотипирования использовали панель МкАТ, которая включала антитела, реагирующие с антигенами CD7+, CD25+, CD38+, CD45+, CD54+, CD95+, CD150+.

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

CD25+ – Тас-антиген-высоко О- N-гликозирванная 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-2Rb) и CD132+ (ИЛ-2Rg).

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». Анализ представленных данных показал, что исследуемые группы были сопоставимы по полу, возрасту, причинам, приведшим к энуклеации, размерам и диаметру опухоли, что позволяет провести сравнение результатов органосохраняющего лечения и уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов. Определялись средние значения со стандартным отклонением ($M \pm SD$). Для оценки полученных результатов применялся непараметрический тест Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Проведенный анализ динамики экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов у больных увеальной меланомой до и после проведения энуклеации показал достоверное увеличение экспрессии CD7+ с $180,0 \pm 89,0$ кл/мкл до $220,0 \pm 90,0$ кл/мкл, $p < 0,05$ (рис. 1).

CD7+ костимуляторная молекула, которая функционирует как индуктор секреции цитокинов и модификатор адгезии клеток.

На рисунке 1 видим достоверное увеличение уровня экспрессии CD38+ с $183,0 \pm 110,0$ кл/мкл до $225,0 \pm 100,0$ кл/мкл ($p < 0,05$).

CD38+ функционирует как регулятор активации и пролиферации, зависящий от клеточного микроокружения.

Также отмечено значимое увеличение экспрессии маркера апоптоза CD95+ с $183,0 \pm 94,0$ кл/мкл до $235,0 \pm 115,0$ кл/мкл ($p < 0,05$).

Маркеры активации лимфоцитов CD45+, CD150+, CD54+, CD25+ увеличивались после проведения энуклеации, однако различия средних значений не были статистически значимыми.

Опухолевые клетки синтезируют белки способные блокировать иммунные реакции. Иммунодепрессия при онкопатологии имеет многофакторное происхождение и обычно сочетается со способностью клеток опухолевого клона активно противостоять направленному на них воздействию эффекторов иммунной системы [15, 16].

После удаления опухоли происходит восстановление функциональной активности клеток иммунной системы. Для запуска противоопухолевых иммунных реакций необходима активация иммунокомпетентных клеток, которая играет ключевую роль в формировании всех защитных механизмов иммунной системы.

Высокий уровень экспрессии костимуляторных молекул и молекул межклеточной адгезии способствует увеличению силы взаимодействия клеток между собой. Высокий уровень кооперативных взаимодействий является одним из путей повышения эффективности цитотоксических механизмов иммунитета [17, 18, 19].

Существуют какие-то специфические механизмы, факторы, благодаря которым злокачественные клетки, взаимодействуя с определенными субпопуляциями иммунокомпетентных клеток и отдельными медиаторами иммунной системы, в частности фактором некроза опухолей, интерлейкином 4, могут стимулировать развитие метастатического процесса [16].

В этой связи все большую актуальность приобретают вопросы совершенствования средств и методов коррекции иммунологических реакций способных предотвратить метастазирование опухоли.

Наличие опухолевых клеток в крови в большинстве случаев определяет неблагоприятный прогноз [20]. Однако подобное мнение не является окончательным, так как большинство одиночных метастатических клеток – эмболов не дают начало развитию истинных метастазов.

Остается неясной природа взаимоотношений этих изолированных опухолевых клеток с другими факторами, определяющими процессы метастазирования.

Заключение

У больных увеальной меланомой после проведения энуклеации отмечено значимое увеличение уровня экспрессии на лимфоцитах периферической крови CD7+ - костимуляторной молекулы, CD38+ - регулятора активации и пролиферации, зависящего от клеточного микроокружения и маркера апоптоза CD95+.

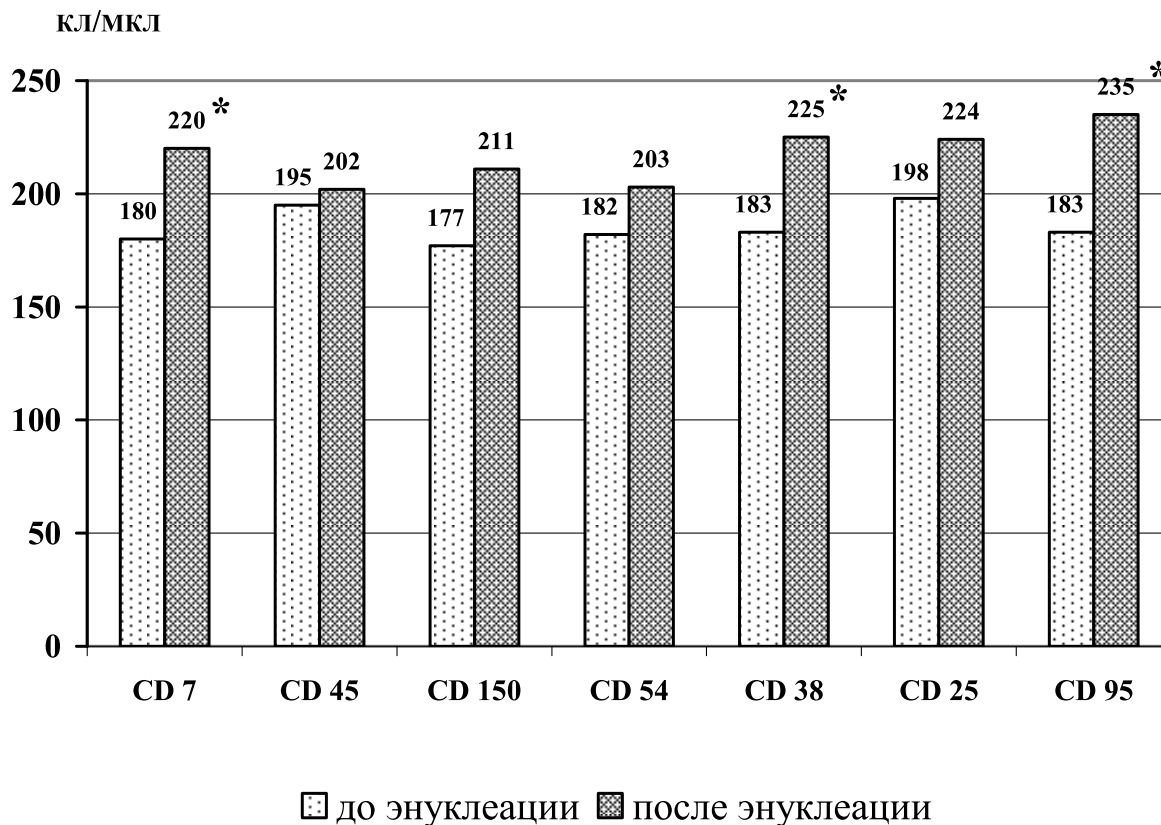


Рис. 1. Динамика экспрессии маркеров активации лимфоцитов у больных увеальной меланомой после проведения энуклеации (* - $p < 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Вит В. В. Опухолевая патология органа зрения. Одесса: Астропринт, 2009, т. 1, 610 с.
2. Бровкина А.Ф. Современные аспекты лечения меланом хориоидеи, проблемы, дискуссионные вопросы // Вестн. офтальмол., 2006, № 1, с. 33-15.
3. Зиангирова Г.Г., Лихванцева В.Г. Опухоли сосудистого тракта глаза. Москва: Последнее слово, 2003, 456 с.
4. Augsburger J.J., Correa Z.M., Freire J. et al. Long-term survival in choroidal and ciliary body melanoma after enucleation versus plaque radiation therapy // Ophthalmology., 1998, v.105, p.1670-1678.
5. Саакян С.В., Пантелева О.Г., Ширина Т.В. Оценка выживаемости больных увеальной меланомой после органосохранного лечения и энуклеации // Российский офтальмол. журн., 2011, №1, с.67-70.
6. Saakyan S.V., Shirina T.V. Analysis of metastases and survival rates in patients with uveal melanoma // Abstract book of 43rd Spring Meeting of the European Ophthalmic Oncology Group. Ivalo., 2013, p.26.
7. Малецкий А.П. Сучасні методи мікування внутрішньо очних меланом (Методичні рекомендації). К., 2013, 19 с.
8. Ширина Т.В. Витальный прогноз при увеальной меланоме в отдаленные сроки после лечения: Автореф. дис. ... канд. мед. наук, М., 2013, 16 с.
9. Саакян С.В., Ширина Т.В. Анализ метастазирования и выживаемости больных увеальной меланомой // Опухоли головы и шеи. 2012, № 2, с.53-56.
10. Zimmerman L.E., McLean J., Foster W. Does enucleation of the eye containing a malignant melanoma prevent or accelerate the dissemination of tumor cell? // Br. J. Ophthalmol., 1978, v.62, № 6, p. 420-425.
11. Straatsma B.R., Diener-West M., Caldwell R., et al. Mortality after deferral of treatment or no treatment for choroidal melanoma // Am. J. Ophthalmol., 2003, v.136, p.47-54.

12. Anastassiou G., Tschentscher F., Hosing J. et al. New insights in uveal melanoma biology and their potential on clinical practice // Abstr. XI International Congress of Ocular Oncology, January, 2004, Hyderabad, India, p.45.
13. Буйко А.С., Вит В.В., Драгомирецкая Е.И. Ретроспективный сравнительный анализ выживаемости больных увеальной меланомой при отложенном лечении // Офтальмол. журн., 2004, №6, с.13-17.
14. Глузман Д.Ф., Склярченко Л.М., Надгорная В.А. и др. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей. Киев: Морион, 2003, с. 6-15.
15. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. II. Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения // Онкология., 2009, т.11, №2, с.86-93.
16. Бережной А.Е., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П. и др. Молекулярные механизмы взаимодействия опухоли и иммунной системы // Вопросы онкологии, 2008, т.54, №6, с.669-682.
17. Хатов Р.М. Физиология иммунной системы. М.: ВИНТИ РАН, 2005, 375 с.
18. Velichko L.N., Maletskiy A.P., Vit V.V. The dynamics of molecular markers expression of blood lymphocytes activating at patients with an uveal melanoma at the different types of treatment // Congress The European Association for Vision and Eye Research (EVER) Science for Sight. Nice, 2012, p 83.
19. Velichko L.N., Maletskiy A.P., Vit V.V. Chebotaryov Ye.P. The dynamics of molecular markers expression of blood lymphocytes activating at patients with an uveal melanoma at the different types of treatment // Challenges in Ophthalmology 109. Dog-Congress 29.9-2.10.2011 Estrel, Berlin. (PS 23-219).
20. Осинский С.П., Глузман Д.Ф., Клифф Й. и др. Молекулярная диагностика опухолей. К.: ДИА, 2007, 246 с.

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

UVEAL MELANOMA İLƏ XƏSTƏLƏRDƏ ENUKLEASİYADAN SONRA LİMFOSİTLƏRİN AKTİVASİYASI MOLEKULYAR MARKERLƏRİNİN EKSPRESSİYASI SƏVİYYƏSİNİN DİNAMİKASI

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

Açar sözlər: uveal melonoma, enukleasiya, limfositlərin aktivasiyası molekulyar markerləri

XÜLASƏ

Məqsəd – uveal melanoma ilə xəstələrdə enukleasiyadan sonra immun cavabın xarakterini öyrənmək.

Material və metodlar

Hazırkı tədqiqat işində 19 uveal melanoma ilə xəstələrdə enukleasiyadan əvvəl və sonra periferik qanın limfositlərinin erkən və gec aktivasiyası ekspressiya markerlərinin səviyyəsinin müqayisəsi aparılmışdır. Bütün pasiyentlərdə enukleasiya şişin proqressiv inkişafı zamanı aparılmışdır. Ekspressiya markerlərinin erkən və gec dövrdə aktivasiyasını MkAT tətbiq olunmaqla histoimmunositokimyəvi üsulla təyin edilmişdir. İmmunofenotipləşmə üçün CD7+, CD25+, CD38+, CD45+, CD54+, CD95+, CD150+ antigenləri ilə reaksiya edən MkAT panelindən istifadə olunmuşdur.

Nəticə

Uveal melanoma ilə xəstələrdə enukleasiyadan sonra periferik qanın limfositlərində ekspressiya səviyyəsinin əhəmiyyətli dərəcədə yüksəlməsi qeyd olunmuşdur: CD7+ - kostimulyator molekulun (180,0±89,0 kl/mkl-dan 220,0±90,0 kl/mkl-ya qədər, p<0,05), CD38+ - aktivasiyanın və proliferasiyanın requlyatoru (183,0±110,0 kl/mkl-dan 225,0±100,0 kl/mkl-ya qədər, p<0,05), hüceyrə mikrodövrəlmə və apoptozun markerindən asılı olan CD95+ (183,0±94,0 kl/mkl-dan 235,0±115,0 kl/mkl-yə qədər, p<0,05).

DYNAMICS OF LEVELS EXPRESSION MOLECULAR MARKERS LYMPHOCYTE ACTIVATION IN PATIENTS WITH UVEAL MELANOMA SINCE THE ENUCLEATION

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

Keywords: uveal melanoma, enucleation, molecular markers lymphocyte activation

SUMMARY

Aim – to investigate the nature of the immune response in patients with uveal melanoma after enucleation.

Material and methods

In this study, we compared the level of expression of markers of early and late activation of peripheral blood lymphocytes before and after enucleation in 19 patients with uveal melanoma. In all patients enucleation was performed in progressive tumor growth. The level of expression of markers of early and late activation was determined by histoimmunochemical method using the monoclonal antibodies. Panel of monoclonal antibody includes antibodies that react with antigens CD7+, CD25+, CD38+, CD45+, CD54+, CD95+, CD150+.

Results

In patients with uveal melanoma after enucleation there was a significant increase in the level of expression molecular markers lymphocytes activation in the peripheral blood CD7+ - costimulatory molecules (to 180,0±89,0 cells/mcL after 220,0±90,0 cells/mcL, $p<0,05$), CD38+ - control activation and proliferation-dependent (to 183,0±110,0 cells/mcL after 225,0±100,0 cells/mcL, $p<0,05$), cellular microenvironment and apoptosis marker CD95+ (to 183,0±94,0 cells/mcL after 235,0±115,0 cells/mcL, $p<0,05$).

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