

УДК 617.723–006.81.04:616–006.441–07+57.083.3

## Сравнительная оценка уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови у больных меланомой хориоидеи стадии T1 малых размеров и у здоровых лиц

С. И. Полякова, д-р мед. наук, Л. Н. Величко, канд. мед. наук, А. В. Богданова, канд. биол. наук, И. В. Цуканова, мл. научн. сотр.

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

E-mail: inna.sister@mail.ru

**Актуальность.** Меланома хориоидеи (МХ) стадии T1 малых размеров (проминенция до 3 мм, диаметр до 12 мм), которая является начальной стадией заболевания, показана для проведения органосохраняющего лечения. В последние десятилетия показана связь между уровнем активации иммунной системы и прогрессированием МХ. Исследование экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов является важным и необходимым для прогнозирования ответа опухоли на проводимое лечение и выбора оптимального его варианта. **Цель** — изучение уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови у больных меланомой хориоидеи стадии T1 малых размеров (проминенция до 3 мм, диаметр до 12 мм) до начала лечения и сравнение их с аналогичными показателями у здоровых лиц.

**Материал и методы.** Изучен уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови у больных МХ стадии T1 малых размеров (16 пациентов) до начала лечения и в группе здоровых лиц (44 донора) и проведен их сравнительный анализ. **Результаты.** Установлен высокий уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови (CD7 +, CD25 +, CD38 +, CD45 +, CD150 +) у больных МХ стадии T1 малых размеров до начала лечения по сравнению со здоровыми лицами ( $p < 0,0002$ ). **Вывод.** У больных меланомой хориоидеи на начальной стадии заболевания (при малых размерах опухоли — проминенция до 3 мм, диаметр до 12 мм) в ответ на развитие опухоли выявлена функциональная активность иммунокомпетентных клеток организма в виде активации рецепторов лимфоцитов к ИЛ-2 (CD25 +), усиление активации и пролиферации лимфоцитов (CD38 +, CD45 +, CD150 +), выработка иммуноглобулинов (CD150 +), активация процессов межклеточной адгезии (CD54 +) и апоптоза (CD95 +), индуцирование секреции цитокинов (CD7 +), что статистически значимо превышает уровень аналогичных показателей у здоровых лиц.

**Ключевые слова:** меланома хориоидеи стадии T1 малых размеров, молекулярные маркеры активации лимфоцитов периферической крови.

**Актуальность.** Меланомы хориоидеи (МХ) стадии T1 малых размеров (проминенция до 3 мм, протяженность основания до 12 мм), являясь начальной стадией заболевания, показаны для проведения органосохраняющего лечения. Вместе с тем, не всегда реакция опухоли на лечение бывает адекватна ожидаемой. Нередко МХ малых размеров трудно поддаются органосохраняющему лечению, склонны к прогрессированию и метастазированию, тогда как опухоли больших размеров подвергаются регрессии [4]. В последние десятилетия показана связь между уровнем активации иммунной системы и прогрессированием МХ [5–7]. Для проведения наиболее эффективного лечения важно понимание характера взаимодействия опухолевых и иммунокомпетентных клеток. Поэтому исследование экспрессии молекулярных маркеров

активации лимфоцитов является важным и необходимым для прогнозирования ответа опухоли на проводимое лечение и выбора оптимального его варианта [2].

**Целью** данного исследования явилось изучение уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови у больных меланомой хориоидеи стадии T1 малых размеров (проминенция до 3 мм, протяженность основания до 12 мм) до начала лечения и сравнение их с аналогичными у здоровых лиц.

## Материал и методы

Изучен уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови у больных МХ стадии Т1 малых размеров (16 пациентов) до начала лечения и у группы здоровых лиц (44 донора) и проведен их сравнительный анализ. В основной группе больных МХ стадии Т1 малых размеров среднее выстояние опухоли в стекловидное тело было 2,09(0,83); при минимальном выстоянии — 0,4 мм и максимальном — 3,0 мм; средняя протяженность основания опухоли составила 5,86(4,24) мм, при минимальном значении — 1,0 мм и максимальном — 12,0 мм. Средний возраст исследуемых пациентов равнялся 55,4 (11,2) лет. Женщин было 12 (75,0 %), мужчин — 4 (25 %). В группе здоровых лиц женщин было 26 (59,1 %), мужчин — 18 (40,9 %). Средний возраст здоровых лиц составил 55,4(11,5) лет. На момент проведения исследования у пациентов основной группы не выявлено хронических заболеваний и метастатических процессов. В контрольной группе здоровых лиц также не выявлено острых либо хронических заболеваний.

Уровень активационных маркеров лимфоцитов периферической крови определялся гистоиммуноцитохимическим методом [3]. Забор крови из вены (5 мл) проводился натощак до начала лечения. Для иммунофенотипирования использовали панель моноклональных антител (МкАТ), которая включала антитела, реагирующие с антигенами CD7<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD 95<sup>+</sup>, CD150<sup>+</sup> [2].

Статистическая обработка материала проведена с использованием статистической программы «Statistic 9». Сравнивались средние значения, приведенные в виде M(SD). При оценке количественных показателей использовался однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением критерия Фишера и критерия множественного сравнения Ньюмана-Кейлса. Рассчитывались процентные соотношения показателей уровня активационных маркеров лимфоцитов и определялась их разница — Δ %.

## Результаты и их обсуждение

Сравнительный анализ уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови у больных МХ стадии Т1 малых размеров до начала лечения и у здоровых лиц основан на данных, представленных в таблице 1.

Как видно из данных таблицы 1, уровень экспрессии активационных маркеров CD25<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>, CD150<sup>+</sup> и разница процентных соотношений как абсолютных, так и относительных его значений у больных МХ стадии Т1 малых размеров значительно выше, чем у здоровых лиц (p<0,0002). Уровень экспрессии маркера CD7<sup>+</sup> — костимуляторной молекулы, индуцирующей секрецию цитокинов, у больных МХ стадии Т1 малых размеров по абсолютным показателям также превышает таковые у здоровых лиц, хотя относительные ее значения снижены (p<0,0001).

Повышение уровня экспрессии маркеров CD25<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD 95<sup>+</sup>, CD150<sup>+</sup> на лимфоцитах периферической крови у больных МХ стадии Т1 малых размеров свидетельствует об активации иммунокомпетентных клеток организма больного МХ в ответ на развитие опухоли. Происходит активация рецепторов к ИЛ-2 (CD25<sup>+</sup>), индуцируется секреция цитокинов (CD7<sup>+</sup>), усиливается активация и пролиферация лимфоцитов (CD38<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD150<sup>+</sup>) и выработка иммуноглобулинов (CD150<sup>+</sup>), усилена также активация процессов межклеточной адгезии (CD54<sup>+</sup>) и апоптоза (CD 95<sup>+</sup>).

Несмотря на то что маркер CD7<sup>+</sup> является одним из активационных (пусковых маркеров), его экспрессия может снижаться при высоком уровне активации регуляторных клеток (Treg) CD4<sup>+</sup> и

**Таблица 1.** Уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови (M(SD)) у больных МХ стадии Т1 малых размеров до начала лечения и у здоровых лиц

МкАТ	Группы исследования				Δ %	F	p
	Контрольная		Основная				
	M(SD)	n	M(SD)	n			
CD95 <sup>+</sup> (кл/мкл)	124,34(60,53)	44	501,13(198,99)	16	303,03	128,56	0,000000
CD95 <sup>+</sup> (%)	9,23(2,35)	44	27,88(8,01)	16	202,06	196,96	0,000000
CD25 <sup>+</sup> (кл/мкл)	141,52(61,72)	44	350,00(176,42)	16	147,41	46,89	0,000000
CD25 <sup>+</sup> (%)	10,75(2,26)	44	18,75(4,64)	16	74,42	80,17	0,000000
CD38 <sup>+</sup> (кл/мкл)	141,56(54,51)	16	487,33(337,18)	15	244,26	16,41	0,0004
CD38 <sup>+</sup> (%)	10,38(1,63)	16	25,27(9,96)	15	143,45	34,85	0,000002
CD54 <sup>+</sup> (кл/мкл)	115,94(54,51)	16	458,13(220,15)	15	295,14	37,17	0,000001
CD54 <sup>+</sup> (%)	8,50(1,79)	16	24,87(8,32)	15	192,59	59,09	0,000000
CD150 <sup>+</sup> (кл/мкл)	145,75(68,58)	16	365,27(167,65)	15	150,61	23,32	0,000004
CD150 <sup>+</sup> (%)	10,44(2,61)	16	20,13(5,76)	15	92,82	37,31	0,000001
CD45 <sup>+</sup> (кл/мкл)	105,09(34,86)	11	434,87(275,47)	15	313,81	15,41	0,0006
CD45 <sup>+</sup> (%)	9,00(1,95)	11	22,13(9,11)	15	145,89	21,89	0,00009
CD7 <sup>+</sup> (кл/мкл)	95,73(22,41)	11	347,80(192,23)	15	263,31	18,53	0,0002
CD7 <sup>+</sup> (%)	11,73(3,72)	11	5,67(3,02)	15	51,66	21,07	0,0001

Примечание; p — уровень значимости различий по критерию множественного сравнения Ньюмана-Кейлса; F — коэффициент Фишера, n — количество пациентов, Δ — разница процентных соотношений.

CD25<sup>+</sup>, которые важны для регуляции иммунного ответа и могут играть ведущую роль в индукции Т-клеточной толерантности к опухоли, подавляя Т-клеточный ответ. При прогрессивном росте опухоли данная регуляторная субпопуляция лимфоцитов возрастает на 40,0 %, что приводит к блокированию иммунного ответа [7].

Таким образом, у больных МХ на начальной стадии заболевания лимфоидные клетки обладают высокой функциональной активностью. Это позволяет предположить, что ответ МХ на лечебное воздействие в начальной стадии заболевания должен быть хорошо выраженным. Однако реализация лечебного эффекта у больных МХ различна и некоторыми исследователями доказано, что иммунная система не только не отторгает развивающуюся опухоль, но и в ряде случаев активно способствует опухолевой прогрессии [1].

В связи с этим важно знать, как у больных МХ на начальной стадии заболевания протекают противо-

опухолевые иммунные реакции в ответ на то или иное терапевтическое воздействие и как они влияют на реализацию его лечебного эффекта, в частности — транспупиллярной термотерапии. Изучению этих вопросов будут посвящены наши дальнейшие исследования.

### Вывод

У больных меланомой хориоидеи на начальной стадии заболевания (при малых размерах опухоли — проминенция до 3 мм, протяженность основания до 12 мм) выявлена функциональная активность иммунокомпетентных клеток организма в ответ на развитие опухоли в виде активации рецепторов лимфоцитов к ИЛ-2 (CD25<sup>+</sup>), усиления активации и пролиферации лимфоцитов (CD38<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD150<sup>+</sup>) и выработки иммуноглобулинов (CD150<sup>+</sup>), активации процессов межклеточной адгезии (CD54<sup>+</sup>) и апоптоза (CD95<sup>+</sup>), а также индуцирования секреции цитокинов (CD7<sup>+</sup>).

### Литература

1. Бережная Н. М. Иммунология злокачественного роста / Н. М. Бережная, В. Ф. Чехун. — Киев; Наукова думка, 2005. — 790 с.
2. Величко Л. Н. Уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови у больных увеальной меланомой с различной эффективностью органосохраняющего лечения / Л. Н. Величко // Офтальмол. журн. — 2013. — № 5. — С. 9–13.
3. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей / [Д. Ф. Глузман, Л. М. Скляренко, В. А. Надгорная, И. А. Крячок]. — Киев: «Морион», 2003. — С. 6–15.
4. Терентьева Л. С. Зависимость радиочувствительности меланомы от параметров опухоли и условий облучения / Л. С. Терентьева, В. А. Котова, В. В. Шамбра // Офтальмол. журн. — 1993. — № 1. — С. 5–7.
5. Human leukocyte antigen class 1 expression. Marker of poor prognosis in uveal melanoma / D. J. Blom, G. P. Luyten, C. Mooy [et al] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 1997. — 38(9). — P. 1865–1872.
6. Loss of non classical MHC molecules MIC-A/B expression during progression of uveal melanoma / C. S. Vetter, W. Lieb, E. B. Brocker, J. C. Becker // Br. J. Cancer. — 2004. — V. 91 (8). — P. 1495–1499.
7. Sakaguchi S. Naturally arising Fox P3-expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T-cells in immunological tolerance to self and non-self / S. Sakaguchi // Nature immunology. — 2005. — V. 6, № 4. — P. 345–352.
8. Tumor-infiltrating macrophages (CD68<sup>+</sup>) cells and prognosis in malignant uveal melanoma / T. Makitie, P. Summanen, A. Tarkkanen, T. Kivela // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2001. — V. 42 (7). — P. 1414–1421.

## Порівняльна оцінка рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові у хворих на меланому хоріоїдеї стадії T1 малих розмірів і у здорових осіб

С. І. Полякова, Л. Н. Величко, А. В. Богданова, І. В. Цуканова

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України»; Одеса (Україна)

**Актуальність.** Меланома хоріоїдеї (МХ) стадії T1 малих розмірів (проміненція до 3 мм, діаметр до 12 мм), що є початковою стадією захворювання, показана для проведення органозберігаючого лікування. В останні десятиліття встановлено зв'язок між рівнем активації імунної системи і прогресуванням МХ. Дослідження експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів є важливим і необхідним для прогнозуван-

ня відповіді пухлини на проведенне лікування і вибору оптимального його варіанта.

**Мета** — вивчення рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові у хворих меланомою хоріоїдеї стадії T1 малих розмірів (проміненція до 3 мм, діаметр до 12 мм) до початку лікування і порівняння їх з аналогічними показниками у здорових осіб.

**Матеріал і методи.** Вивчено рівень експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові у хворих МХ стадії Т1 малих розмірів (16 пацієнтів) до початку лікування і в групі здорових осіб (44 донора) і проведено їх порівняльний аналіз.

**Результати.** Встановлено високий рівень експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові (CD7<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD150<sup>+</sup>) у хворих МХ стадії Т1 малих розмірів до початку лікування в порівнянні зі здоровими особами ( $p < 0,0002$ ).

**Висновок.** У хворих меланою хоріоїдеї на початковій стадії захворювання (при малих розмірах пухлини — промінення до 3 мм, діаметр до 12 мм) у відповідь на розвиток пухлини виявлена функціональна активність імунокомпетентних клітин організму у вигляді активації рецепторів лімфоцитів до ІЛ-2 (CD25<sup>+</sup>), посилення активації і проліферації лімфоцитів (CD38<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD150<sup>+</sup>), вироблення імуноглобулінів (CD150<sup>+</sup>), активації процесів міжклітинної адгезії (CD54<sup>+</sup>) та апоптозу (CD95<sup>+</sup>), індукування секреції цитокінів (CD7<sup>+</sup>), що статистично значимо перевищує рівень аналогічних показників у здорових осіб.

**Ключові слова:** меланома хоріоїдеї стадії Т1 малих розмірів, молекулярні маркери активації лімфоцитів периферичної крові.

Поступила 17.01.2017