

**УРОВЕНЬ ОТНОСИТЕЛЬНЫХ ЗНАЧЕНИЙ
ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ CD 16, CD 25 И CD
95 НА ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
КРОВИ БОЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ
ОПУХОЛЯМИ СЛЕЗНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

С.И.Полякова

*Институт глазных болезней и тканевой терапии
им. В.П.Филатова АМН Украины (Одесса)*

Вступление

Иммунологическая реактивность организма представляет собой сложный биологический процесс, обусловленный взаимодействием множества различных клеточных и гуморальных факторов, регулирующих динамическое постоянство внутренней среды организма [1-4]. До настоящего времени индивидуальная иммунологическая реактивность больных эпителиальными опухолями слезной железы (ЭОСЖ) остается слабо изученной. Поэтому изучение иммунологических реакций и поиск показателей информативных в дифференциальной диагностике характера опухоли и прогнозировании течения опухолевого процесса у больных ЭОСЖ остается весьма актуальным.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Работа выполнена в соответствии с основным планом научно-исследовательских работ (НИР) Института глазных болезней и тканевой терапии им. В.П.Филатова АМН Украины и является фрагментом темы НИР "Иммунологическая реактивность больных эпителиальными опухолями слезной железы" (№ госрегистрации 0108U002741).

Целью нашего исследования было изучить уровень относительных значений антигенов CD 16, CD 25 и CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных ЭОСЖ и их информативность для дифференциации характера и течения опухоли.

Материал и методы исследования

Исследования CD 16, CD 25 и CD 95 проведены у 28 боль-

ных ЭОСЖ, лечившихся в ГУ "Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П.Филатова АМН Украины". Средний возраст больных был ($47,2 \pm 18,0$) лет. Мужчин было 13 (46,4 %), женщин - 15 (53,6 %). Все больные прооперированы, диагноз опухоли верифицирован гистологически. Срок наблюдения за больными колебался от 3 месяцев до 8 лет.

Для оценки информативности CD в дифференциальной диагностике характера ЭОСЖ больные были разделены на две группы: с доброкачественными (плеоморфная аденома - 5, онкоцитомы - 1, миксома - 1) - 7 больных и злокачественными (рак в плеоморфной аденоме - 3, аденокарцинома 11, аденокистозная карцинома - 7) - 21 больной ЭОСЖ. Для оценки информативности CD в дифференциации течения опухолевого процесса (безрецидивное или рецидивирующее) больные также были разделены на две группы: с рецидивом (16 больных) и без рецидива (12 больных) опухоли. Контрольную группу составили 16 практически здоровых лиц, среди которых было 5 мужчин и 11 женщин, средний возраст - ($47,4 \pm 8,9$) лет.

Для иммунофенотипирования использовали панель специфических одноименных МкАТ [6]: CD16 - низкоаффинный Fc-рецептор IgG (FcγR III), относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов (IgSF) с молекулярной массой 50 - 65 кД. Высокий уровень экспрессии на NK - клетках, гранулоцитах, макрофагах, низкий на субпопуляциях Т-клеток (TCRα/β и TCR γ/δ). Связывается с иммунными комплексами, основной рецептор в реакциях антителозависимой клеточной цитотоксичности, участвует в выработке цитокинов. CD 25 - Tac - антиген-высоко O- и N - гликозирированная молекула типа 1. 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, CD 122 (ИЛ - 2Rβ) и CD 132 (ИЛ - 2Rγ). CD 95 - антиген апоптоза 1 (APT1), или Fas - антиген с молекулярной массой 45 кД. Трансмембранная молекула типа 1, относящаяся к суперсемейству рецепторов ФНО. Высокий уровень экспрессии на активированных Т- и В-клетках. Опос-

редует сигналы, индуцирующие апоптоз [5]. Определялось относительное значение уровня экспрессии антигенов CD 16, CD 25 и CD 95 в периферической крови больных ЭОСЖ до проведения лечения. Забор крови для исследования производился натощак из вены в количестве 5 мл стерильным одноразовым шприцем объемом 10 мл в стерильную пробирку с раствором гепарина активностью 100 ЕД. Исследование проводилось иммуногистохимическим методом в лаборатории иммунологии института [6]. Автор благодарит за помощь в проведении иммунологических исследований научного сотрудника лаборатории иммунологии к.м.н. Л.Н.Величко.

При статистической обработке данных определялись средние значения со стандартным отклонением ($M \pm SD$), критерий Фишера - F, уровень значимости - p по критерию множественного сравнения Ньюмана-Кейлса. Для оценки возможности использования значений МкАТ в качестве диагностического теста использовали расчет чувствительности и специфичности, а также проводили статистическую оценку ROC кривой [7] Статистический анализ проводился в программе "MedCalc 9.0".

Полученные результаты и их обсуждение

Сравнительные оценки средних относительных значений уровня экспрессии антигенов CD 16, CD 25 и CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных доброкачественными и злокачественными ЭОСЖ представлены в таблице 1, из которой видно, что при сравнении с контрольной группой у больных ЭОСЖ наблюдаются достоверные различия средних относительных значений уровня экспрессии антигена CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных ЭОСЖ как у больных с доброкачественными ($p = 0,008$), так и злокачественными опухолями ($p = 0,003$) (рис.1).

В виде тенденции отмечается различие относительных значений уровня экспрессии антигена CD 16 на NK - клетках периферической крови больных злокачественными и доброкачественными ЭОСЖ ($p = 0,07$).

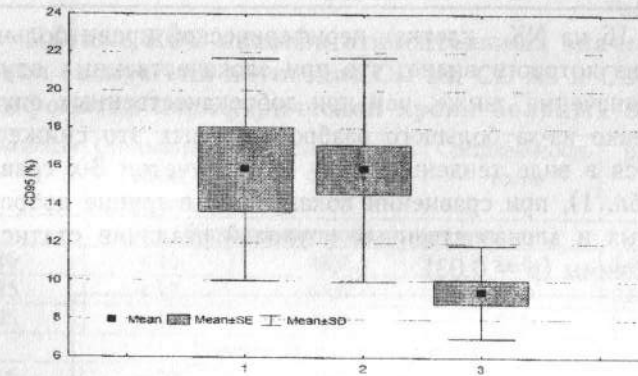


Рис. 1. Средние значения и разброс данных относительных показателей (%) уровня экспрессии антигена CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных доброкачественными (1) и злокачественными (2) ЭОСЖ в сравнении с контролем (3)

Таблица 1

Сравнительные оценки средних относительных значений ($M \pm SD$) уровня экспрессии антигенов CD 16, CD 25 и CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных с доброкачественными и злокачественными ЭОСЖ ($M \pm SD$)

Показатели	Доброкачественная опухоль (n=7)	Злокачественная опухоль (n=21)	Контрольная группа (n = 16)	F	p
CD 16 относит. (%)	12,4±2,82	10,2±2,0	12,4±3,9	2,94	$p_1=0,07$ $p_2=1,0$ $p_3=0,19$
CD 25 относит. (%)	14,1±5,08	12,8±4,5	10,9±2,5	1,91	$p_1=0,40$ $p_2=0,13$ $p_3=0,26$
CD 95 относит. (%)	15,9±5,84	15,9±5,9	9,4±2,4	8,75	$p_1=1,00$ $p_2=0,008$ $p_3=0,003$

Примечание: F - критерий Фишера; уровень значимости по критерию множественного сравнения Ньюмана - Кейлса: p_1 - между доброкачественной и злокачественной опухолью; p_2 - между доброкачественной опухолью и контролем; p_3 - между злокачественной опухолью и контролем.

На рисунке 2 представлены средние значения и разброс данных относительных показателей уровня экспрессии анти-

гена CD 16 на NK - клетках периферической крови больных ЭОСЖ, из которого видно, что при злокачественных опухолях эти значения ниже, чем при доброкачественных опухолях. Однако из-за большого разброса данных это снижение отмечается в виде тенденции ($p = 0,07$ с учетом 3-х сравнений) (табл. 1), при сравнении показателей в группе доброкачественных и злокачественных опухолей различия статистически значимы ($p = 0,03$).

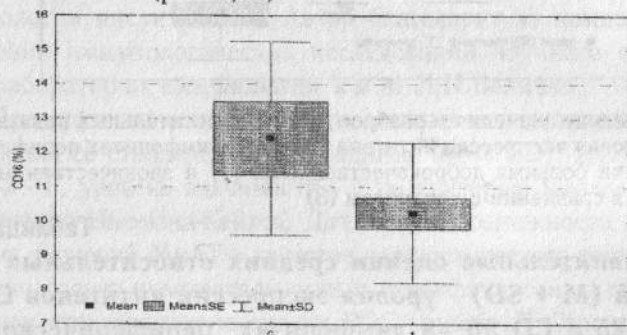


Рис. 2. Средние значения, и разброс данных относительных показателей уровня экспрессии антигена CD 16 (%) на NK - клетках периферической крови больных доброкачественными (0) и злокачественными (1) ЭОСЖ.

Относительные значения уровня экспрессии антигена CD 25 на лимфоцитах периферической крови больных доброкачественными и злокачественными ЭОСЖ выше в сравнении с контрольной группой, однако различия статистически не значимы.

Для определения возможности использования полученных данных в качестве дифференциально-диагностических тестов проведен ROC анализ, который показал, что относительные значения уровня экспрессии антигенов CD 16, CD 25 и CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных доброкачественными и злокачественными ЭОСЖ обладают различной чувствительностью и специфичностью. Тест с CD 16 обладает более высокой специфичностью (86%), но низкой чувствительностью. Тест с CD 95 обладает более высокой чувствительностью (71%), но не достаточной специфичностью. Менее информативен в отношении дифференциации характера процесса тест с CD25 (табл. 2).

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

Таблица 2

Данные ROC анализа относительных значений уровня экспрессии антигенов CD 16, CD 25 и CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных ЭОСЖ

Показатели	Оптимальная точка разделения	Чувствительность теста	Специфичность теста	p	AUC
Характер опухолевого процесса					
CD 16	< 10	48,0	86,0	0,09	0,70
CD 25	< 12	67,0	57,0	0,69	0,55
CD 95	> 13	71,0	57,0	0,73	0,54
Течение опухолевого процесса					
CD 16	< 10	36,0	75,0	0,05	0,56
CD 25	< 12	38,0	76,0	0,06	0,58
CD 95	> 13	33,0	71,0	0,06	0,52

Из данных таблицы 2 видно, что найдены пороговые относительные величины уровня экспрессии антигенов, которые для CD 16 ≤ 10 %, CD 25 ≤ 12 %, CD 95 ≤ 13 %. Однако низкая чувствительность или специфичность тестов изученных CD не достаточна для применения их как самостоятельных диагностических тестов дифференциации характера опухоли слезной железы. Вместе с тем, определенные относительные значения уровня экспрессии антигенов CD 16, CD 25 и CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных ЭОСЖ, могут быть использованы как дополнительный метод диагностики характера опухоли в совокупности с другими методами.

Сравнительные оценки средних относительных значений уровня экспрессии антигенов CD 16, CD 25 и CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных ЭОСЖ с рецидивом опухоли и без него представлены в таблице 3, из данных которой следует, что статистически достоверных различий между относительными значениями уровня экспрессии антигенов CD 16, CD 25 и CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных ЭОСЖ с развившимся рецидивом опухоли и без него не выявлено. Вместе с тем, в сравнении с контрольной группой отмечается достоверно выше относительное значение уровня экспрессии антигена CD 25 ($p < 0,05$) и CD 95 ($p < 0,001$) на лимфоцитах периферической крови больных без рецидива, а

Екологічна і клінічна імунологія та імунореабілітація

также относительного значения уровня экспрессии антигена CD 95 ($p < 0,004$) на лимфоцитах периферической крови больных с рецидивом ЭОСЖ, что наглядно демонстрируется на рис.3 и 4.

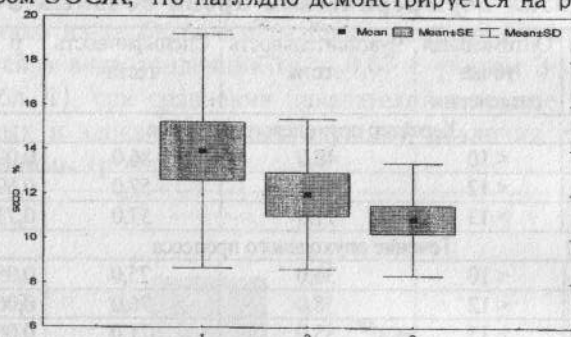


Рис. 3. Средние значения и разброс данных относительных показателей (%) уровня экспрессии антигена CD 25 на лимфоцитах периферической крови больных ЭОСЖ без рецидива (1) и с рецидивом опухоли (2) в сравнении с контролем (3).

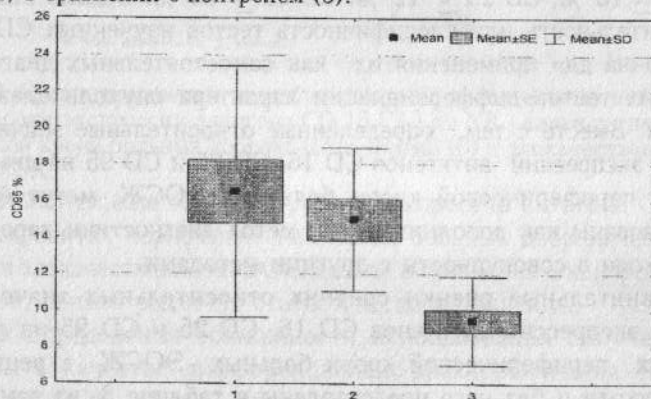


Рис. 4. Средние значения и разброс данных относительных показателей (%) уровня экспрессии антигена CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных ЭОСЖ без рецидива (1) и с рецидивом опухоли (2) в сравнении с контролем (3).

Определены пороговые относительные величины уровня экспрессии антигенов CD 16 $< 10\%$, CD 25 $< 12\%$, CD 95 $< 13\%$ для дифференциации течения опухоли (с рецидивом или без) и проведен ROC анализ для определения возможности использования полученных данных в качестве диагностических тестов (табл. 3).

Таблица 3

Сравнительные оценки средних относительных значений (M + SD) уровня экспрессии антигенов CD 16, CD 25 и CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных ЭОСЖ с рецидивом опухоли и без него

Показатели	Опухоль без рецидива (n = 16) M + SD	Опухоль с рецидивом (n = 12) M + SD	Контрольная Группа (n = 16) M + SD	F	p
CD 16 относит. (%)	11,0 ± 2,3	10,5 ± 2,6	12,4 ± 3,9	1,5	p ₁ =0,61 p ₂ =0,25 p ₃ =0,16
CD 25 относит. (%)	13,9 ± 5,3	12,0 ± 3,4	10,9 ± 2,5	2,5	p ₁ =0,27 p₂=0,05 p ₃ =0,33
CD 95 относит. (%)	16,5 ± 6,9	15,0 ± 3,9	9,4 ± 2,4	9,2	p ₁ =0,51 p₂=0,001 p₃=0,004

Примечание: F - критерий Фишера; уровень значимости по критерию множественного сравнения Ньюмана - Кейлса: p₁ - между доброкачественной и злокачественной опухолью; p₂ - между доброкачественной опухолью и контролем; p₃ - между злокачественной опухолью и контролем.

Низкая чувствительность и специфичность тестов позволяет использовать их только как дополнительный метод диагностики в комплексе с другими методами.

Таким образом, анализ относительных значений уровня экспрессии антигенов CD 16, CD 25 и CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных как доброкачественными, так и злокачественными ЭОСЖ показал, что уровень экспрессии рецепторов лимфоцитов к ИЛ-2 (CD 25) и Fas-лиганду апоптоза (CD 95) выше, а активность NK - клеток (CD 16) - ниже, чем у здоровых лиц, что свидетельствует о нарушении противоопухолевой резистентности организма больных ЭОСЖ и срыве адаптивных иммунологических реакций.

Снижение содержания основных эффекторов противоопухолевого иммунитета - NK-клеток (CD16) в периферической крови больных ЭОСЖ происходит, с одной стороны, за счет возрастание проапоптотической активности иммуноцитов, опосредуемой через рецептор апоптоза CD95, с другой стороны, за счет возрастания активности рецепторов лимфоцитов к интерлейкину -2 (CD25). Такие сдвиги говорят об иммунологическом ответе организма на опухолевый антиген по негативному типу, что

Екологічна і клінічна імунологія та імунореабілітація

может свидетельствовать о тяжести течения опухолевого процесса, в частности, процесса рецидивирования. Центральная роль в поддержании постоянства и цитотоксической активности циркулирующих НК-клеток в периферической крови принадлежит ИЛ-2, обладающему мощным стимулирующим действием на пролиферацию и киллерную активность НК-клеток [8,9,10]. Повышенное содержание антигенов CD 25 у больных ЭОСЖ, свидетельствует об активации уровня экспрессии интерлейкина-2 (ИЛ-2), который продуцируется, в основном, антигенактивированными Т-хелперами и НК-клетками. Учитывая то, что уровень НК-клеток у больных ЭОСЖ снижен, можно предположить, что продукция ИЛ-2 происходит антигенактивированными Т-хелперами [4]. Запуск апоптической программы клеточной смерти осуществляется через рецептор фактор некроза опухоли (ФНО р55), который сходен с известным антигеном FAS-CD95 (или APO-1) и входит в семейство клеточных рецепторов, ассоциированных с индукцией апоптоза. В настоящее время известно, что ФНО модулирует экспрессию ряда клеточных генов, среди которых есть и ассоциированные с апоптозом (CD95-FAS антиген) [3,4].

Вместе с тем, повышение уровня экспрессии антигена CD 25 на лимфоцитах больных ЭОСЖ, по-видимому, приводит к активации других цитокинов, в частности ФНО, что определяется уровнем экспрессии антигена CD 95, опосредовано индуцирующего апоптоз. Однако, по нашему мнению, процесс апоптоза у больных ЭОСЖ носит незавершенный характер, при котором в части клеток не происходит полной деградации ДНК и гибели опухолевой клетки. Нарушения в работе генов, контролирующих процесс апоптоза, приводит к развитию и прогрессированию опухоли, в результате чего раковая клетка становится иммортализованной или бессмертной, что также объясняет высокую способность ЭОСЖ к рецидивированию, продолженному росту в полость черепа и метастазированию.

Выявленные нарушения противоопухолевого иммунитета у больных ЭОСЖ, на наш взгляд, являются одним из механизмов их канцерогенеза. Механизм взаимодействия изученных CD сложен и еще не до конца изучен не только при ЭОСЖ, но и при других онкологических заболеваниях, поэтому является весьма перспективным направлением иммунологических исследований.

Выводы

1. Определены относительные значения уровня экспрессии антигенов CD 16, CD 25, CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных ЭОСЖ.

2. Установлены достоверные различия средних относительных значений уровня экспрессии антигена CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных ЭОСЖ как у больных доброкачественными, так и злокачественными опухолями при сравнении с контрольной группой здоровых лиц.

3. В виде тенденции отмечается различие относительных значений уровня экспрессии антигена CD 16 на НК - клетках периферической крови больных злокачественными и доброкачественными ЭОСЖ.

4. Относительные значения уровня экспрессии антигена CD 25 на лимфоцитах периферической крови больных доброкачественными и злокачественными ЭОСЖ выше в сравнении с контрольной группой, однако различия статистически не значимы.

5. Определены пороговые относительные значения уровня экспрессии антигенов CD 16 (10 %), CD 25 (12 %) и CD 95 (13 %) на лимфоцитах периферической крови больных ЭОСЖ. Проведенный ROC анализ для определения возможности использования полученных данных в качестве диагностических тестов показал их низкую чувствительность и специфичность, что не позволяет использовать их самостоятельно, а только как дополнительный метод диагностики при дифференциации характера или прогнозировании течения (рецидивы) опухолевого процесса.

6. Выявленные различия относительных значений уровня экспрессии антигенов CD 16, CD 25, CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных ЭОСЖ и относительно здоровых лиц свидетельствуют о нарушениях противоопухолевой резистентности организма больных ЭОСЖ и могут являться одним из механизмов их канцерогенеза.

Литература

1. Бережная Н.М. Интерлейкин - 2 и злокачественные новообразования / Н.М.Бережная, Б.А.Горецкий. - Киев: Наукова думка, 1992. - 172 с.

2. Воробьева А.А. Иммунология и аллергология / А.А.Во-

робьева, А.С.Быкова, А.В. Караулова.- М.: Практическая медицина, 2006. - 287 с.

3. Возианов А.Ф. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства / А.Ф.Возианов, А.К.Бутенко, К.П.Зак. - Киев: Наукова думка, 1998. - 320 с.

4. Жданов А.В. Особенности корреляционных связей в системе цитокинов / А.В.Жданов, Г.Т.Сухих, М.П.Давыдова // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 2003. - № 9. - С.309-311.

5. Классификация антигенов лейкоцитов человека (система СД). Семинары по гематопатологии / [Глузман Д.Ф., Склярченко Л.М., Надгорная В.А. и др.]. - Выпуск 10. - Киев, 2003. - 40 с.

6. Моноклональні антитіла для медико-біологічних досліджень. Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України. - Київ, 2003 - 16 с.

7. Are interleukin-2 and interleukin-15 tumor promoting factors for human non-hematopoietic cells / B.Azzarone [e.a.] // Eur. Cytokine Netw. - 1996. - Vol. 7, № 1. - P. 27 - 36.

8. Broudy V.C. Stem cell factor and hematopoiesis / V.C. Broudy // Ibid. - 1997. - Vol. 90, № 4. - P. 1345 - 1364.

9. Effect of low dose interleukin-2 on disease relapse after T-cell-depleted bone marrow transplantation / R.J.Soiffer, C.Murray, R.Goniny, J.Ritz // Ibid. - 1994. - Vol. 84, № 3. - P. 964 - 970.

10. Soiffer R.J., Murray C., Ritz J. et al. Recombinant interleukin-2 infusions and decreased IgG2 subclass concentration / R.J.Soiffer, C.Murray, J.Ritz [e.a.] // Blood. - 1995. - Vol. 85, № 4. - P. 925 - 928.

Резюме

Полякова С.И. Уровень относительных значений антигенов CD 16, CD 25 и CD 95 на лимфоцитах человека в периферической крови больных эпителиальными опухолями слезной железы.

Изучены относительные значения уровня экспрессии антигенов CD 16, CD 25 и CD 95 на лимфоцитах периферической крови 28 больных ЭОСЖ при различном характере и течении опухолевого процесса. Определены пороговые относительные значения уровня экспрессии антигенов CD 16 (10 %), CD 25 (12 %) и CD 95 (13 %) на лимфоцитах перифери-

ческой крови больных ЭОСЖ. Проведенный ROC анализ показал их низкую чувствительность и специфичность, что позволяет использовать их только как дополнительный метод диагностики при дифференциации характера или прогнозирования течения (рецидивы) опухолевого процесса. Выявленные различия относительных значений уровня экспрессии антигенов CD 16, CD 25, CD 95 на лимфоцитах периферической крови больных ЭОСЖ и относительно здоровых лиц свидетельствуют о нарушениях противоопухолевой резистентности организма больных ЭОСЖ и могут являться одним из механизмов их канцерогенеза.

Ключевые слова: эпителиальные опухоли слезной железы, антигены лимфоцитов CD 16, CD 25, CD 95.

Резюме

Полякова С.И. Рівень відносних значень антигенів CD 16, CD 25 і CD 95 на лімфоцитах периферичної крові хворих епітеліальними пухлинами слізозової залози.

Вивчені відносні значення рівня експресії антигенів CD 16, CD 25 і CD 95 на лімфоцитах периферичної крові 28 хворих ЕПСЗ при різному характері і перебігу пухлинного процесу. Визначені порогові відносні значення рівня експресії антигенів на лімфоцитах периферичної крові хворих ЕПСЗ для CD16 - 10 %, CD25 - 12 % і CD95 - 10 %. Проведений ROC аналіз показав їх низьку чутливість і специфічність, що дозволяє використовувати їх лише як додатковий метод діагностики при диференціації характеру чи прогнозуванні перебігу (рецидиви) пухлинного процесу. Виявлена різниця відносних значень рівня експресії антигенів CD16, CD25, CD95 на лімфоцитах периферичної крові хворих ЕПСЗ і у відносно здорових осіб, що свідчить про порушення протипухлинної резистентності організму у хворих ЕПСЗ і може бути одним з механізмів їх канцерогенезу.

Ключові слова: епітеліальні пухлини слізозової залози, антигени лімфоцитів CD 16, CD 25, CD 95.

Summary

Polyakova S.I. The relative level of expression of antigens CD 16, CD 25, CD 95 on the lymphocytes of peripheral blood of patients with epithelial tumors of the lacrimal gland.

The relative level of expression of antigens CD16, CD25 and CD95 on the lymphocytes of peripheral blood in 28 patients with epithelial tumors of the lacrimal gland (ETLG) at different character of disease (benign and malignant tumor) and course of tumoral process (non recurrent and recurrent) was investigated. The analysis of average relative significances of expression of these CD showed that they can't be used as a test for differential diagnosis and as a prognostic test. The differences between relative significances of expression of antigens CD 16, CD 25, CD 95 on the lymphocytes of peripheral blood in patients with ETLG and in healthy persons were found. These differences point at disorder of tumor resistant in patient with ETLG and can be one of mechanism of it's cancerogenesis.

Key words: epithelial tumors of the lacrimal gland, lymphocytes' antigens CD 16, CD 25, CD 95.

Рецензент: д. мед. н., проф. А. М. Петруня