

**УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ РАННЕЙ
И ПОЗДНЕЙ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ У
БОЛЬНЫХ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМОЙ****Л.Н. Величко***ГУ "Институт глазных болезней и тканевой терапии
им. В.П. Филатова НАМН Украины" (Одесса)***Введение**

Теория иммунного надзора утверждает, что распознавание и отторжение опухолевых клеток является нормальной функцией иммунной системы, а опухоли возникают в результате нарушений механизмов противоопухолевой иммунной защиты. Однако проведенные экспериментальные исследования на мышцах с различными дефектами иммунного ответа показали, что частота возникновения опухолей не зависит от нормального функционирования многих факторов адаптивного иммунитета и, в том числе, от сохранности Т и В-клеток [2].

В то же время, достоверно показано, что иммунная система способна распознавать злокачественные клетки и реагировать на такое распознавание активацией и последующими каскадами иммунных реакций. Более того, хорошо известно, что иммунная система обладает набором функциональных элементов, которые способны оказывать выраженное противоопухолевое действие путем прямого уничтожения опухолевых клеток, либо же разрушения опухолевого микроокружения [1].

Однако индукция и реализация противоопухолевого иммунного ответа в сравнительно редких случаях приводит к регрессии опухолевого процесса, что, вероятно, обусловлено способностью опухолей противодействовать иммунной атаке.

Противоопухолевому действию иммунитета опухоль противопоставляет стратегии ускользания и подавления. Селекция опухолевых клонов со сниженной иммуногенностью приводит к тому, что опухоль не только теряет чувствительность к подавляющему действию иммунной системы, но и, в некоторых слу-

чаях, приобретает способность к использованию факторов иммунной системы для стимуляции роста. Кроме этого, приобретая свойство секретировать ряд иммуносупрессивных факторов, опухоль становится мощнейшим фактором иммунорегуляции, влияющим не только на иммунный ответ в отношении опухолевых клеток, но и на иные проявления функциональной активности иммунной системы. Появление в опухолевых клетках новых молекул обеспечивает возможность разграничения трансформированных и нормальных клеток при помощи факторов адаптивного иммунитета, причем, чем больше атипичных молекул встречается в неопластической клетке, тем большее количество Т и В-клеточных клонов может быть вовлечено в противоопухолевый ответ. Одновременно, пластичность фенотипа позволяет опухоли достаточно легко отбирать варианты клеток, которые не несут антигенных детерминант, либо молекул, необходимых для их презентации, либо тех клеток, которые подавляют эффекторную часть иммунного ответа.

Таким образом, генетическая нестабильность является одновременно причиной возникновения иммуногенности опухолей и причиной, по которой опухоль чрезвычайно сложно контролировать как иммунологическими, так и любыми другими терапевтическими средствами [4, 5, 6, 7, 8].

Для клинической иммунологии наибольший интерес представляет изменение экспрессии мембранных гликопротеидных молекул связанных с антиген зависимой активацией Т-клетки.

Ключевым моментом функционирования адаптивного иммунитета является презентация антигена антигенпрезентирующей клеткой. В норме для адекватного иммунного ответа необходимо контактное и дистантное взаимодействие дендритной клетки и Т-хелпера. Контактное взаимодействие осуществляется группой молекул на мембране клетки. Эффективность процесса праймирования Т-клеток зависит от способности антигенпрезентирующей клетки обеспечивать костимуляцию лимфоцитов. Сочетание экспрессии мембранных костимулирующих молекул и цитокинов, которые активируют Т-клетки, позволяет антигенпрезентирующей клетке активировать нативные Т-клетки, стимулируя их развитие в функциональные CD4 и CD8 лимфоциты.

Для практической офтальмологии важным является изучение биологического значения тех или иных молекулярно-рецепторных изменений лимфоцитов.

Целью настоящего исследования явилось изучение уровня экспрессии маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов у больных увеальной меланомой.

Материалы и методы исследования

Проведено исследование уровня экспрессии маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов периферической крови иммуноцитохимическим методом с использованием МкАТ у 42 больных увеальной меланомой.

Для иммунофенотипирования использовали панель МкАТ, которая включала антитела, реагирующие с антигенами CD7, CD25, CD38, CD45, CD54, CD150, CD95 [3].

В качестве контроля служила группа здоровых лиц 16 человек. Среди которых было 5 мужчин и 11 женщин, средний возраст $47,4 \pm 8,9$ лет. Исследуемая группа состояла из 18 мужчин и 24 женщин, средний возраст $47,2 \pm 17$ лет. Размер опухоли у всех пациентов не превышал 8 мм.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы "Statistics 7". Определялись средние значения со стандартным отклонением ($M \pm SD$). Для оценки полученных результатов применялся непараметрический тест Манна-Уитни.

Полученные результаты и их обсуждение

Изучение особенностей формирования иммунного ответа у больных увеальной меланомой показало, что по сравнению со здоровыми донорами у больных увеальной меланомой уровень экспрессии маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов периферической крови достоверно выше.

Данный факт свидетельствует о том, что у больных увеальной меланомой имеет место активный иммунный ответ на опухолевые антигены, что приводит к созреванию клона специфически активированных лимфоцитов.

Выявлено, что средний относительный уровень экспрессии CD7 у больных увеальной меланомой достоверно выше, чем в группе практически здоровых лиц и составляет $15,4 \pm 7,2\%$ и $8,4 \pm 1,6\%$ соответственно $p < 0,0005$. Клетки с активационным маркером CD7

осуществляют контроль ранних стадий активации лимфоцитов. У больных увеальной меланомой также отмечен достоверный рост клеток с активационным фенотипом CD 45 их уровень составил $16,6 \pm 7,9\%$ в группе здоровых лиц $9,0 \pm 2,0$, $p < 0,0001$. У больных увеальной меланомой отмечен достоверный рост субпопуляций несущих основные костимуляторные молекулы, так уровень экспрессии CD150 у больных увеальной меланомой составил $15,9 \pm 7,5\%$ у здоровых лиц $10,4 \pm 2,6\%$, $p < 0,0005$.

Высокий уровень экспрессии костимуляторных молекул является необходимым для активации цитотоксических механизмов иммунитета. Для формирования эффекторных реакций клеточного иммунитета важную роль играют молекулы участвующие в кооперативных взаимодействиях. К таким молекулам относится молекула клеточной адгезии и кооперации ICAM-1, CD54. Относительный уровень активации субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих антиген CD54 у больных увеальной меланомой составил $15,2 \pm 7,1\%$ у здоровых лиц $8,5 \pm 1,8\%$, $p < 0,00001$. Субпопуляции лимфоцитов с фенотипом CD 38 обеспечивают возможность активации Т-клеточного иммунитета. У больных увеальной меланомой данная субпопуляция со стимулирующим фенотипом достоверно выше, чем в группе здоровых лиц и составляет $16,0 \pm 7,9\%$ и $10,4 \pm 1,6\%$ соответственно, $p < 0,001$.

Экспериментальными исследованиями было показано, что элиминация субпопуляций CD25 из организма мышей с опухолью (с помощью антител анти-CD25) вызывает сильный Т-клеточный ответ и ведет к развитию противоопухолевого иммунитета даже в случае агрессивных опухолей, таких как меланома В 16. И наоборот, если таким мышам вновь ввести клетки CD25, они супрессируют иммунный ответ.

У больных увеальной меланомой содержание CD25 было достоверно выше, чем в группе здоровых лиц составило $17,2 \pm 7,6\%$ и $10,9 \pm 2,5\%$ соответственно $p < 0,001$.

Регуляторные субпопуляции лимфоцитов могут ингибировать противоопухолевую активность цитотоксических клеток. Однако, воздействие на эти регуляторные механизмы с целью иммунокоррекции и повышения иммунитета к опухоли, может нарушить хрупкий баланс между толерантностью и ауто-

имунитетом. Опухолевая ткань может распознаваться и уничтожаться еще одной субпопуляцией Т-лимфоцитов - цитотоксическими CD8 клетками, которые проникая через гематофтальмический барьер, вступают в контакт с опухолью.

Обращает на себя внимание снижение абсолютного содержания CD8 у больных увеальной меланомой по сравнению со здоровыми лицами их уровень составляет $179 \pm 87\%$, тогда как в контроле $223 \pm 86\%$, $p < 0,05$. Апоптоз обеспечивает делецию клеток с высокой avidностью к антигену, а также гибель лимфоцитов, не способных к иммунному ответу после завершения их функции. При длительной антигенной стимуляции клетки подвергаются гибели через так называемый "рецептор гибели". Наиболее важный - рецептор Fas, который при перекрестном связывании со своим лигандом (Fas L) приводит к активации каспазного каскада через каспазу - 8 и в итоге к гибели клетки через апоптоз. Этот процесс существует при клеточном взаимодействии (cell-to-cell); к тому же есть данные, что Т-лимфоциты могут уничтожать подобные себе клетки через "суицид" за счет секреции растворимого Fas L. У больных увеальной меланомой отмечено увеличение проапоптотической активности лимфоцитов за счет увеличения клеток с фенотипом CD95, их содержание в периферической крови больных составило $17,2 \pm 8,4\%$ в контрольной группе $9,4 \pm 2,4\%$, $p < 0,0005$.

Выводы

1. Таким образом на основании представленных данных можно сделать вывод, что иммунная система больных увеальной меланомой находится в активном состоянии и характеризуется сложными взаимоотношениями между клеточными субпопуляциями.

2. Отмечен достоверный рост субпопуляций несущих основные костимуляторные молекулы, вспомогательные молекулы для межклеточной адгезии и кооперации.

3. Выявлено достоверное увеличение уровня проапоптотической готовности лимфоцитов. Параллельно с этим отмечен устойчивый рост регуляторных субпопуляций лимфоцитов, способных блокировать иммунный ответ.

4. Кроме того, у больных увеальной меланомой имеет место достоверное снижение эффекторов цитотоксической активности CD8 лимфоцитов.

1. Бережная Н. М. Иммунология злокачественного роста / Н. М. Бережная, В. Ф. Чехун. - Киев : Наукова думка, 2005. - 790 с.
2. Бережной А. Е. Молекулярные механизмы взаимодействия опухоли и иммунной системы / А. Е. Бережной, Н. В. Гнучев, Г. П. Георгиев [и др.] // Вопросы онкологии. - 2008. - Т. 54, № 6. - С. 669-682.
3. Глузман Д. Ф. Диагностика лейкозов. Атлас и практическое руководство / Д. Ф. Глузман. - Киев : Морион, 2000. - 224 с.
4. Голвизин М. В. Вмешательство раковых клеток в процессы созревания и селекции Т-лимфоцитов как фактор опухолевой прогрессии / М. В. Голвизин // Иммунология. - 2001. - № 6. - С. 4-10.
5. Гранов А. М. Канцерогенез и иммунобиология опухоли. Фундаментальные и клинические аспекты / А. М. Гранов, О. Е. Молчанов // Вопросы онкологии. - 2008. - Т. 54, № 4. - С. 401-407.
6. Andersen M. H. The melanoma inhibitor of apoptosis protein: a target for spontaneous cytotoxic T-cell responses / M. H. Andersen, I. S. Reker [et al.] // J. Invest. Dermatol. - 2004. - V. 122, № 2. - P. 392-399.
7. Ben-Hur H. The role lymphocytes and macrophages in human breast tumor genesis: an immunohistochemical and morphometric study / H. Ben-Hur, O. Cohen, D. Schneider // Anticancer Res. - 2002. - V. 22, № 2. - P. 1231-1238.
8. Hahne M. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape / M. Hahne, D. Rimoldi, M. Schroter [et al.] // Sciens. - 1996. - V. 274, № 5291. - P. 2363-1366.

Резюме

Величко Л. Н. Уровень экспрессии маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов у больных увеальной меланомой.

Проведено исследование уровня экспрессии маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов периферической крови иммуноцитохимическим методом с использованием моноклональных антител (CD7, CD25, CD38, CD45, CD54, CD150) у 42 больных увеальной меланомой. У больных увеальной меланомой по сравнению с группой здоровых лиц отмечен

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

достоверный рост субпопуляций несущих основные костимуляторные молекулы, вспомогательные молекулы для межклеточной -адгезии и кооперации. Выявлено достоверное увеличение CD 25 регуляторных субпопуляций ($p < 0,001$). Регуляторные субпопуляции лимфоцитов могут ингибировать противоопухолевую активность цитотоксических клеток. У больных увеальной меланомой отмечено достоверное увеличение проапоптической активности лимфоцитов за счет увеличения клеток с фенотипом CD95. У данных пациентов отмечено достоверное снижение эффекторов цитотоксической активности CD8 лимфоцитов.

Ключевые слова: увеальная меланома, маркеры активации лимфоцитов.

Резюме

Величко Л. М. Рівень експресії маркерів ранньої та пізньої активації лімфоцитів у хворих увеальною меланомою.

Проведено дослідження рівня експресії маркерів ранньої та пізньої активації лімфоцитів периферичної крові імуноцитохімічним методом за допомогою моноклональних антитіл (CD7, CD25, CD38, CD45, CD54, CD150) у 42 хворих увеальною меланомою. У хворих увеальною меланомою при порівнянні з групою здорових осіб відмічається достовірне зростання субпопуляцій які несуть основні костимуляторні молекули, допоміжні молекули для міжклітинної адгезії та кооперації. Виявлено достовірне підвищення CD25 регуляторних субпопуляцій ($p < 0,001$). Регуляторні субпопуляції лімфоцитів здатні блокувати протипухлинну активність цитотоксичних клітин. У хворих увеальною меланомою відмічено достовірне підвищення проапоптичної активності лімфоцитів за рахунок збільшення кількості клітин з фенотипом CD95. У даних пацієнтів відмічено достовірне зниження ефекторів цитотоксичної активності CD8 лімфоцитів.

Ключові слова: увеальна меланома, маркери активації лімфоцитів.

Summary

Velichko L.N. The level of expression of early and late markers activation.

The research of the level of expression of early and late markers activation of the lymphocytes peripheral blood was by immunocytochemical methods with use the monoclonal antibodies (CD7, CD25, CD38, CD45, CD54, CD150) at 42 patients with uveal melanoma. At patients with uveal melanoma in comparison with control group of healthy people notes authentic growth of subpopulation bearing. The basic costimulative molecules and molecules for intercellular adhesion and cooperation. The authentic increase CD 25 regulative subpopulation is revealed ($p < 0,001$). Regulative subpopulation of lymphocytes can suppress antineoplastic activity of cytotoxic cells. At patients with uveal melanoma notes authentic increase preapoptosis activity of lymphocytes at the expense of increase of cells with a phenotype CD95. At these patients authentic decrease cytotoxic activity CD8 of lymphocytes.

Key words: uveal melanoma, markers of lymphocytes activation.

Рецензент: д.мед.н., проф. П.А. Бездітко