

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

Рівень експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові у хворих на меланому хоріоїдеї різних стадій до і після органозберігаючого лікування

Друм Д. А., аспірант; Цуканова І. В., канд. мед. наук; Полякова С. І., д-р мед. наук;
Величко Л. М., д-р мед. наук; Макарова М. Б., канд. мед. наук; Богданова О. В., канд. біол. наук

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

Мета. Вивчення рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові (CD7+, CD54+, CD95+) у хворих на меланому хоріоїдеї (MX) стадій T1-T3 після органозберігаючого лікування.

Матеріал та методи. Вивчався рівень експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів (ММАЛ) периферичної крові CD7+, CD54+, CD95+ у 25 хворих (жінок – 14 (56,0%), чоловіків – 11 (44,0%), середній вік – 51,7(16,6) років) стадій T1-3 з MX середніх і великих розмірів (проміненція – від 3,1 до 9,0 мм і протяжність основи – від 3,1 до 15 мм), які отримували органозберігаюче лікування у вигляді транспупілярної термотерапії (ТТТ) за розробленою методикою з наступною брахітерапією (БТ) стронцієм-90/ітрієм-90 (90Sr/90Y) – основна група. Контрольна група – 16 хворих (жінок – 12 (75,0%), чоловіків – 4 (25%), середній вік – 55,4(11,2) років) стадії T1 малих розмірів (проміненція – до 3 мм, протяжність основи – до 12 мм), які отримували тільки ТТТ.

Результати. Рівень експресії маркерів CD7+, CD54+, CD95+ у хворих на MX стадій T1-3 до початку лікування вище, ніж у хворих на MX стадії T1, але статистично значуще відрізняється тільки абсолютний рівень CD7+ ($p=0,0008$).

У хворих на MX стадії T1 після ТТТ статистично значуще зростає абсолютний та відносний рівні експресії коstimуляторної молекули, що індукує секрецію цитокінів – CD7+ ($p=0,04$ і $p=0,0000$ відповідно), а також абсолютний рівень FAS-ліганду CD95+ ($p=0,05$), який впливає на проапоптотичну активність лімфоцитів. Рівень CD54+, який впливає на міжклітинну адгезію, після лікування зростає, але статистично не значимо. Після курсу поєднаної дії ТТТ із БТ (90Sr/90Y) абсолютний рівень експресії CD7+, CD54+, CD95+ у хворих на MX стадій T1-3 відмічається статистично значуще зниження відносного рівня CD7+ ($p=0,02$) і як тенденція до статистичної значущості FAS-ліганду CD95+ ($p=0,06$). Після проведення органозберігаючого лікування у хворих на MX стадії T1 і стадій T1-3 є статистично значуща різниця між абсолютним та відносним рівнями FAS-ліганду CD95+ ($p=0,003$ і $p=0,000$ відповідно) і CD54+ ($p=0,03$ і $p=0,000$ відповідно), які нижче у хворих на MX стадії T1-3.

Висновки. Рівень експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові CD7+, CD54+, CD95+ у хворих на MX збільшується по мірі росту пухлини.

Під впливом ТТТ на MX стадії T1 рівень експресії маркерів зростає, а при поєднаній дії на MX стадій T1-3 ТТТ і БТ (90Sr/90Y) їх рівень в крові знижується, що може бути пов'язано з дією променевої терапії.

Ключові слова:

хоріоїдея, імунологія,
променева терапія,
транспупілярна термотерапія,
молекулярні маркери,
офтальмоонкологія, меланома
хоріоїдеї

Актуальність. На теперішній час відомо, що імунна система людини активно реагує на розвиток пухлинного процесу і патогенетичні механізми прогресування пухлинного росту, пов'язані із взаємодією імунокомпетентних і пухлинних клітин [1–6].

Важливу роль у протипухлинній дії відіграє функціональна активність імунокомпетентних клітин організму у вигляді активації рецепторів лімфоцитів периферичної крові, що проявляється різним рівнем експресії на них ряду функціональних молекул [7, 8]. Встановлено, що експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові CD7+, CD54+, CD95+ у хворих на меланому хоріоїдеї (MX) стадії T1 малих розмірів (проміненція – до 3 мм, протяжність основи – до 12 мм) статистично значимо пе-

ревищує рівень аналогічних показників у здорових осіб [9]. Також встановлено, що в процесі проведення транспупілярної термотерапії (ТТТ) MX стадії T1 малих розмірів відбувається підвищення рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові, особливо коstimуляторної молекули, що індукує секрецію цитокінів – CD7+, а також проапоптотичної активності лімфоцитів за рахунок збільшення FAS-ліганду CD95+ [10].

Тому вивчення молекулярних механізмів протипухлинного захисту організму хворого на меланому хорі-

оїдеї (MX) є важливим і актуальним питанням офтальмоонкології.

Метою даного дослідження було вивчення рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові (CD7+, CD54+, CD95+) у хворих на меланому хоріоїдеї стадій T1-T3 до та після органозберігаючого лікування.

Матеріал та методи

Вивчався рівень експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові у хворих на MX різних стадій (T1-T3) з використанням панелі моноклональних антитіл (МкАТ) CD7+, CD54+, CD95+ до і після органозберігаючого лікування. Основну групу (I група) досліджених склали 25 пацієнтів (жінок – 14 (56,0%), чоловіків – 11 (44,0%)), середній вік – 51,7(16,6) років (жінки – 51,0(15,3), чоловіки – 52,5(14,5) років), стадій T1-3 з MX середніх і великих розмірів (проміненція пухлини – від 3,1 до 9,0 мм і протяжність основи пухлини – від 3,1 до 15 мм), які отримували органозберігаюче лікування у вигляді транспульварної термотерапії (ТТТ) за розробленою методикою [11] з наступною брахітерапією (БТ) стронцієм-90/ітрієм-90 (90Sr/90Y). Другу групу (II) – контрольну – склали 16 пацієнтів (жінок – 12 (75,0%), чоловіків – 4 (25%), середній вік – 55,4(11,2) років (жінки – 58,0(11,6), чоловіки – 47,8(4,0)), стадії T1 малих розмірів (проміненція пухлини – до 3 мм, протяжність основи пухлини – до 12 мм), у яких органозберігаюче лікування проводилось у вигляді тільки ТТТ.

Рівень активаційних маркерів лімфоцитів периферичної крові визначався імуногістохімічним методом після забору крові натщесерце у пацієнта з вени (5 мл) [12] до і після курсу лікування.

Стадія пухлинного процесу визначалася за класифікацією за системою TNM Американського об'єднаного комітету по раку (American Joint Committee on Cancer) та Міжнародного протіворакового союзу 2009 року [13].

На момент обстеження у хворих не було виявлено метастатичного процесу.

Статистична обробка матеріалу проведена з використанням пакету «G*Power 3.1». Порівнювалися середні показники з розрахунком квадратичного відхилення – М (SD). При оцінці кількісних показників використовувався однофакторний дисперсійний аналіз з подальшим застосуванням критерію Фішера. Рівень показників визначався статистично значущим при $p < 0,05$.

Результати

Рівень (М(SD)) експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові CD7+, CD54+, CD95+ у хворих на MX різних стадій до та після проведення органозберігаючого лікування представлена в таблиці 1.

З даних, представлених у таблиці 1, видно, що рівень експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів у хворих на MX стадій T1-3 до початку лікування вище, ніж у хворих на MX стадії T1 малих розмірів, але значуще відрізняється тільки абсолютний рівень CD7+ ($p=0,0008$).

У хворих на MX стадії T1 малих розмірів (II група) після ТТТ за розробленою методикою статистично значуще зростає абсолютний та відносний рівні експресії коstimуляторної молекули, що індукує секрецію цитокінів – CD7+ ($p=0,04$ і $p=0,0000$ відповідно), а також абсолютний рівень FAS-ліганду CD95+ ($p=0,05$),

Таблиця 1. Рівень (М(SD)) експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові CD7+, CD54+, CD95+ у хворих меланомою хоріоїдеї різних стадій до і після проведення органозберігаючого лікування

МКАТ	I група		p_{1-2}	II група		p_{3-4}	p_{1-3}, p_{2-4}
	до лікування n = 25	після лікування n = 25		до лікування n = 16	після лікування n = 16		
	1	2		3	4		
CD7+ (кл/мкл)	529,9 (128,5)	483,3 (124,5)↓	0,20	347,8 (192,2)	553,5 (189,0)↑	0,04	$p_{1-3}=0,0008$ $p_{2-4}=0,15$
CD7+ (%)	25,9 (2,3)	23,8 (3,8)↓	0,02	25,8 (3,0)	26,0 (5,5)↑	0,0000	$p_{1-3}=0,9$, $p_{2-4}=0,14$
CD54+ (кл/мкл)	527,5 (157,5)	510,1 (150,8)↓	0,69	458,1 (220,2)	643,3 (232,4)↑	0,10	$p_{1-3}=0,25$, $p_{2-4}=0,03$
CD54+ (%)	26,1 (2,5)	25,3 (2,4)↓	0,25	24,9 (8,3)	30,7 (4,2)↑	0,12	$p_{1-3}=0,5$, $p_{2-4}=0,000$
CD95+ (кл/мкл)	527,9 (139,0)	499,6 (136,9)↓	0,47	501,1 (198,9)	705,9 (281,3)↑	0,05	$p_{1-3}=0,61$, $p_{2-4}=0,003$
CD95+ (%)	25,7 (2,6)	24,4 (2,2)↓	0,06	27,9 (8,0)	33,6 (7,1)↑	0,10	$p_{1-3}=0,21$, $p_{2-4}=0,000$

Примітка: p — рівень значущості відмінностей за критерієм Фішера; n — кількість пацієнтів; ↑ — стрілка вказує на підвищення показника після лікування; ↓ — стрілка вказує на зниження показника після лікування.

який впливає на проапоптичну активність лімфоцитів, рівень CD54+ після лікування зростає, але статистично не значимо.

В основній групі досліджених після проведеного курсу органозберігаючого лікування (ТТТ + БТ) абсолютний рівень експресії цих молекулярних маркерів знижується, але статистично не значимо. Відмічається статистично значуще зниження відносного рівня CD7+ ($p=0,02$) і у вигляді тенденції до статистичної значущості FAS-ліганду CD95+ ($p=0,06$).

Порівняння рівня експресії цих молекулярних маркерів на лімфоцитах периферичної крові хворих на МХ стадії Т1 малих розмірів (група І) і стадій Т1-3 середніх та великих розмірів (група ІІ) показало, що після проведення органозберігаючого лікування є статистично значуща різниця між абсолютним та відносним рівнями FAS-ліганду CD95+ ($p=0,003$ і $p=0,000$ відповідно), що показує апоптичну активність лімфоцитів і активацію процесів міжклітинної адгезії CD54+ ($p=0,03$ і $p=0,000$ відповідно), які нижче у хворих на МХ стадій Т1-3 після проведення поєднаної дії ТТТ і БТ.

Обговорення

Підвищений рівень експресії молекулярних маркерів CD7+, CD54+, CD95+ у хворих на МХ стадій Т1-3 порівняно з хворими на МХ стадії Т1 малих розмірів до початку лікування свідчить про те, що по мірі розвитку пухлини відбувається активація лімфоцитів, які важливі для регуляції імунної відповіді. За рахунок маркеру CD7+ може відбуватись активація росту субпопуляції Т-лімфоцитів, які продукують цитокіни – низькомолекулярні білкові речовини, що виконують ендогенну регуляцію міжклітинних взаємодій усіх ланок імунної системи, гемопоезу запалення і міжсистемних взаємодій. Ці субпопуляції Т-лімфоцитів також впливають на диференціювання, функціональну активність, стимуляцію росту і виживаність клітин, їх підвищення на 40,0% при розвитку пухлинного процесу може сприяти його прогресуванню і зниженню протипухлинної імунної відповіді аж до її повного блокування [1,2,8].

Зростання рівня експресії FAS-ліганду CD95+ у хворих на МХ стадій Т1-3 свідчить про проапоптичну активність лімфоцитів, що призводить до стримання надлишкової імунної відповіді і сприяє підтримці імунного гомеостазу [1,2].

Важливою є активація процесів міжклітинної адгезії, в якій приймає участь CD54+. Міжклітинна адгезія відбувається за рахунок молекули ICAM-1, яка є трансмембранним білком з суперсімейства імуноглобулінів, що експресується на поверхні багатьох клітин і впливає на їх міжклітинну адгезивну взаємодію. Активність процесів міжклітинної адгезії відіграє важливу роль в імунній системі, особливо в адгезії лейкоцитів до ендотелію та трансендотеліальної міграції. Також молекула ICAM-1 приймає участь в імунологічному синапсі, який утворюється між лімфоцитами та антигенпрезентуючими клітинами. Підвищену експресію

CD54+ пов'язують з розвитком патологічного запального процесу при багатьох захворюваннях, у тому числі і раку [14–17]. Враховуючи те, що ICAM-1 експресується ендотеліальними клітинами сітківки та судинної оболонки у пацієнтів з неінфікованим увеїтом переднього та заднього відділів ока [18–20], можливо припустити, що підвищення експресії CD54+ при розвитку пухлини, зокрема меланоми, в судинній оболонці ока відбувається за рахунок вторинного запального процесу, який супроводжує розвиток пухлини і зростає по мірі її росту, а також у відповідь на проведене лікування, що ми і відмічаємо у наших хворих.

Заключення. Рівень експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові CD7+, CD54+, CD95+ у хворих МХ збільшується по мірі росту пухлини. Під впливом ТТТ на МХ стадії Т1 (група ІІ) абсолютний та відносний рівні експресії коstimуляторної молекули, що індукуює секрецію цитокінів – CD7+ зростає в 1,6 разів ($p=0,04$ і $p=0,0000$ відповідно), а також абсолютний рівень FAS-ліганду CD95+, який впливає на проапоптичну активність лімфоцитів зростає в 1,4 рази. При поєднаної дії на МХ стадій Т1-3 ТТТ і БТ (90Sr/90Y) (група І) абсолютний рівень експресії цих молекулярних маркерів знижується, але статистично не значимо. Відмічається статистично значуще зниження відносного рівня CD7+ ($p=0,02$) і у вигляді тенденції до статистичної значущості FAS-ліганду CD95+ ($p=0,06$). Зниження імунологічних показників у хворих, яким проводилося комбіноване лікування, на нашу думку, може бути пов'язане з дією променевої терапії.

Вивчення механізмів взаємодії рівня експресії молекулярних маркерів, а саме маркерів лімфоцитів, які індукують секрецію цитокінів та апоптичну активність, допомагає побачити відповідь імунної системи на прогресування росту пухлини, а також реакцію пухлини на проведене лікування. Це дозволить виділити серед них молекули, які можливо буде використовувати в якості маркерів оцінки і контролю прогресування пухлинного процесу, можливого його метастазування та ефективності лікування.

Література

1. **Бережна НМ.** Роль клітин системи імунітета в мікрооточенні пухлини. Взаємодія клітин системи імунітета з іншими компонентами мікрооточення. Онкологія. 2009. (11) 2:86-93.
2. **Singh AD, Shields CL, Shields JA.** Prognostic factors in uveal melanoma. *Melanoma Res.* 2001 Jun;11(3):255-63. doi: 10.1097/00008390-200106000-00007
3. **Blank C, Kuball J, Voelkl S, Wiendl H, Becker B, Walter B, et al.** Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int J Cancer.* 2006 Jul 15;119(2):317-27. doi: 10.1002/ijc.21775.
4. **Fidler IJ, Poste G.** The «seed and soil» hypothesis revisited. *Lancet Oncol.* 2008 Aug;9(8):808. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70201-8.
5. **Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM.** Tumour immunity: effector response to tumour and role of the

- microenvironment. *Lancet*. 2008 Mar 1;371(9614):771-83. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60241-X.
6. **Fridman WH, Galon J, Pagès F, Tartour E, Sautès-Fridman C, et al.** Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res*. 2011 Sep 1;71(17):5601-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1316.
 7. **Рабсон А, Ройт А, Делвз А.** Основи медичної імунології. М. : Бином. 2006:319 с.
 8. **Величко Л.М.** Рівень експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові у хворих увеальною меланою з різною ефективністю органозберігаючого лікування. *Офтальмол. журн.* 2013;5:9-13.
 9. **Полякова С.І, Величко Л.М, Богданова А.В, Цуканова І.В.** Порівняльна оцінка рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові у хворих на меланому хоріоїдеї стадії Т1 малих розмірів та здорових осіб. *Офтальмол. журн.* 2017;1:25-28.
 10. **Цуканова І.В, Полякова С.І, Величко Л.М, Богданова А.В.** Динаміка рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові у хворих на меланому хоріоїдеї стадії Т1 малих розмірів після транспупілярної термотерапії. *Офтальмол. журн.* 2019;5:27-29.
 11. **Пасечнікова НВ, Науменко ВО, Полякова С.І, Цуканова І.В.** Патент України на корисну модель № 102890 «Спосіб лікування хворих на меланому хоріоїдеї стадії Т1», заявник і патентовласник ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П.Філатова НАМН України». № у 2015 04836; заяв. 18.05.2015; опубл. 25.11.2015; Бюл. 22:1-3.
 12. **Глузман ДФ, Складенко ЛМ, Надгорна ВА, Крячок ІА.** Діагностична імуноцитохімія пухлин. Київ: «Моріон». 2003:6-15.
 13. **Буйко ОС.** Класифікація меланом судинної оболонки (переклад) *Офтальмол. журнал.* 2010;6:20-30.
 14. **Morsing SKH, Rademakers T, Brouns SLN, Stalborch ADV, Donners MMPC, van Buul JD.** ADAM10-Mediated Cleavage of ICAM-1 Is Involved in Neutrophil Transendothelial Migration. *Cells*. 2021 Jan 25;10(2):232. doi: 10.3390/cells10020232.
 15. **Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A.** Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*. 2011 Dec 22;118(26):6743-51. doi: 10.1182/blood-2011-07-343566.
 16. **Abadier M, Haghayegh Jahromi N, Cardoso Alves L, Boscacci R, Vestweber D, et al.** Cell surface levels of endothelial ICAM-1 influence the transcellular or paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier. *Eur J Immunol*. 2015 Apr;45(4):1043-58. doi: 10.1002/eji.201445125.
 17. **Smith JR, David LL, Appukuttan B, Wilmarth PA.** Angiogenic and Immunologic Proteins Identified by Deep Proteomic Profiling of Human Retinal and Choroidal Vascular Endothelial Cells: Potential Targets for New Biologic Drugs. *Am J Ophthalmol*. 2018 Sep;193:197-229. doi: 10.1016/j.ajo.2018.03.020.
 18. **Khramenko NI, Konovalova NV, Usov VY, Velychko LM, Bogdanova OV.** Immunity status and expression of molecular markers (ICAM-1, CD5, CD25, CD95) on lymphocytes of patients with recurrent anterior uveitis complicated by macular edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2023 May;261(5):1423-1431. doi: 10.1007/s00417-022-05938-6.
 19. **Khramenko NI, Konovalova NV, Usov VY, Velychko LM, Bogdanova OV.** Immunity status and expression of molecular markers (ICAM-1, CD5, CD25, CD95) on lymphocytes of patients with recurrent anterior uveitis complicated by macular edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2023 May;261(5):1423-1431. doi: 10.1007/s00417-022-05938-6.
 20. **Khramenko NI, Velychko LM, Konovalova NV, Bogdanova OV, Gheorghe LD, Bobescu DV.** Features of hemodynamic and immunological parameters in patients with recurrent uveitis complicated by hypertension, Fuchs heterochromic uveitis and Posner-Schlossman syndrome. *Rom J Ophthalmol*. 2023 Jan-Mar;67(1):20-32. doi: 10.22336/rjo.2023.5.

Відомості про авторів та розкриття інформації

Автор листування: Друммі Д.А. — drumi9669@gmail.com

Авторський внесок Друмі Д. А. — збір та аналіз даних, написання рукопису; Цуканова І. В. — збір та аналіз даних, створення електронної бази; Полякова С. І. — проектування та розробка концепції дослідження, інтерпретація даних, редагування рукопису; Величко Л. М. — аналіз результатів дослідження, редагування рукопису; Макарова М. Б. — проведення досліджень, аналіз даних; Богданова О. В. — проведення досліджень, аналіз даних. Усі автори узгодили результати та схвалили остаточний варіант рукопису.

Відмови від відповідальності: погляди, висловлені в поданій статті, є власними, та не є офіційною позицією установи.

Джерела підтримки. Відсутні.

Конфлікт інтересів. Автор засвідчує про відсутність конфлікту інтересів, які б могли вплинути на думку стосовно предмету чи матеріалів, описаних та обговорених в даному рукопису.

Суб'єкт дослідження. Дослідження проводилося з участю людей з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964 р.) та відповідали чинному законодавству України. Усі пацієнти дали інформативну згоду на участь у дослідженні, яке було схвалено місцевим комітетом з біоетики (протокол № 4 від 12. 04. 2021 р.).

Стаття є частиною науково-дослідної роботи за темою «Вивчити патогенетичні механізми реакції клінічного ефекту комбінованого лікування меланом увеального тракту середніх і великих розмірів і злоякісних новоутворень кон'юнктиви повік, півмісячної складки і слізного м'яся» (держреєстрація № 1224U00149).

Заява про доступність даних. Всі дані, отримані або проаналізовані під час цього дослідження, включені в цю опубліковану статтю.

Список скорочень. МХ — меланома хоріоїдеї; ТТТ — транспупілярна термотерапія; МКАТ — моноклональні антитіла; БТ — брахітерапія.

Надійшла 20.03.2025