

Національний інститут раку, Київ

ОСОБЛИВОСТІ ІМУННОГО СТАТУСУ У ХВОРИХ НА МЕЛАНОМУ ШКІРИ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ ПУХЛИННОГО ПРОЦЕСУ



Ф.В. Фільчаков, С.М. Кукушкіна, К.С. Шуміліна, Г.Д. Льон, С.І. Коровін, М.М. Кукушкіна

Адреса:
Фільчаков Феодосій Вікторович
03022, Київ, вул. Ломоносова, 33/43
Національний інститут раку
Тел.: (044) 259-01-84
E-mail: labklimmum@i.ua

Ключові слова: меланома шкіри, імунний статус, імундепресія, активаційна дисфункція імунної системи.

Проведено оцінку імунного статусу 87 хворих на меланому шкіри I–IV стадії. Встановлено, що з появою регіонарних та віддалених метастазів розвивається системна імундепресія, морфологічним еквівалентом якої є прогресивне зменшення загальної кількості циркулюючих лімфоцитів з одночасним зменшенням кількості найбільш функціонально значимих субпопуляцій — Т-лімфоцитів і природних клітин-кілерів, що асоціюється із суттєвим збільшенням кількості регуляторних Т-клітин. Вже на перших стадіях захворювання виявляються ознаки активаційної дисфункції імунної системи: збільшена частка клітин, що експресують HLA-DR та CD25-антиген, з прогресуванням хвороби збільшується частка CD69⁺- та CD95⁺-лімфоцитів. Наявність імунологічних порушень необхідно враховувати при проведенні біотерапії у хворих на меланому шкіри.

ВСТУП

Меланома шкіри за рівнем захворюваності посідає 2-ге місце після раку шкіри серед новоутворень цієї локалізації, зумовлює найвищу летальність порівняно з іншими новоутвореннями шкіри та має більш високу швидкість росту, ніж інші солідні пухлини. За даними Національного канцер-реєстру Національного інституту раку МОЗ України [8] у 2008 р. загальна кількість випадків меланоми шкіри становила 2731, що спричинило 1113 летальних випадків. Смертність до 1 року в 2007 р. в Україні становила 16,2 випадка на 100 тис. населення, 5-річна виживаність — від 90% при I стадії до 1–4% при IV стадії захворювання. За даними American Joint Committee on Cancer (AJCC) у пацієнтів з меланомою високого ризику рецидиви виявляють в 20–60% випадків, а 5-річна загальна виживаність становить 45–70% [10].

Непрогнозованість клінічного перебігу меланоми (аж до спонтанної регресії), виникнення вітилігоподібної депігментації шкіри, об'єктивна відповідь на біотерапію дозволяють вважати, що імунна система відіграє важливу роль у наслідках цього захворювання [2]. Проте клінічно значущі зрушення в імунній системі хворих на меланому шкіри досі не визначені. Зокрема, дані щодо вмісту основних популяцій лімфоцитів периферичної

крові у хворих на меланому шкіри мають доволі суперечливий характер [1, 3–7, 11, 12, 16,], втім, більшість результатів вказує на поглиблення порушень з боку як відносної, так і абсолютної кількості лімфоцитів при генералізації пухлинного процесу. Крім того, немає однозначної думки щодо експресії активаційних маркерів на лімфоцитах периферичної крові у хворих на меланому шкіри. Так, за даними одних авторів [7, 11, 14, 17], частка лімфоцитів, що експресують активаційні антигени, збільшується, в іншому випадку — автори не відмічають таких змін або відзначають лише для деяких маркерів [1, 3, 6]. Результати досліджень щодо вмісту природних регуляторних Т-клітин (Трег) у хворих на меланому шкіри також носять суперечливий характер. Вірогідне збільшення відносної та абсолютної кількості Трег у периферичній крові хворих на меланому шкіри виявлено G.C. Cesana та співавторами [13], в той час як M. Viguier та співавторами [19], вивчаючи вміст Трег у пацієнтів із метастазами меланоми в лімфатичних вузлах, не виявили розбіжностей за величиною цього показника у практично здорових людей (ПЗЛ).

Мета нашого дослідження — вивчення стану імунної системи у хворих на меланому шкіри залежно від стадії захворювання.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідження включено 87 хворих з гістологічно підтвердженим діагнозом меланомою шкіри на різних стадіях захворювання (за класифікацією AJCC 2003 р.) та локалізацією первинної пухлини на шкірі тулуба та кінцівок. З них 36 пацієнтам (22 жінки та 14 чоловіків віком від 31 до 72 років) встановлено IA–IIC стадію, 15 (8 жінок та 7 чоловіків віком від 26 до 71 року) — III стадію та 36 (24 жінки та 12 чоловіків віком від 25 до 72 років) — IV стадію захворювання. Також було обстежено 35 ПЗЛ у тій же віковій групі.

Імунологічне дослідження периферичної крові хворих на меланому шкіри виконували до початку спеціального лікування. Визначали відносну та абсолютну кількість: лімфоцитів основних популяцій, Трег, V₁- та V₂-лімфоцитів, активованих лімфоцитів (CD69⁺, CD95⁺, HLA-DR⁺, CD25⁺), вміст у сироватці крові імуноглобулінів (Ig) основних класів А, М, G та циркулюючих імунних комплексів (ЦК).

Кількість лейкоцитів у периферичній крові та лейкоцитарну формулу визначали загальноприйнятим методом. Імунофенотип лімфоцитів визначали методом проточної цитофлуориметрії за допомогою FACScan («Becton Dickinson», США) із використанням моноклональних антитіл до: CD3, CD19, CD4, CD8, CD16, HLA-DR, CD95, мічених флуоресцеїнізотіоціанатом («Сорбент», Росія); CD25, мічених фікоеритринціаніном-5 та CD127, CD69, CD5, мічених фікоеритрином («Beckman Coulter», США). Трег (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low-neg}) визначали серед CD4⁺-лімфоцитів за наявністю високої експресії CD25 в поєднанні з низькою чи негативною експресією CD127 [9, 15, 18]. Для визначення субпопуляцій V₁- та V₂-лімфоцитів застосовували двопараметричний аналіз із використанням лінійноспецифічного маркера V-лімфоцитів CD19 у поєднанні з CD5 [9].

Вміст імуноглобулінів основних класів А, М, G у сироватці крові досліджували методом радіальної імунодифузії за Манчіні, вміст ЦК — методом селективної преципітації поліетиленгліколом 6000.

Статистична обробка отриманих даних проведена із використанням Excel (MS Office 2003, XP) та програми STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., США). Результати дослідження представляли у вигляді медіани та значень 10 та 90% квантилів (останні наведено у дужках). Для визначення вірогідності відмінностей (р) показників незалежних груп

застосовували критерій Манна — Уїтні. Відмінності оцінювали як вірогідні при р<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У пацієнтів із меланомою шкіри незалежно від стадії захворювання не виникає суттєвих змін з боку загальної кількості лейкоцитів у периферичній крові. Проте поява регіонарних або віддалених метастазів супроводжується перерозподілом вмісту формених елементів у лейкоцитарній формулі. Так, у хворих із генералізованою формою меланомою відносна кількість лімфоцитів менша при порівнянні з такою у групі ПЗЛ та хворими на первинно-локалізовану меланому (ПЛМ) (відповідно 23 (15; 34)% проти 33,5 (19,5; 49)% та 27 (17; 49,5)%; р<0,05), а відносний вміст нейтрофілів гранулоцитів — більший порівняно з цим показником у групі ПЗЛ (відповідно 55,5 (40; 69,5)% проти 61 (50,5; 70,5)%; р<0,05). При цьому суттєво зростає абсолютна та відносна кількість паличкоядерних нейтрофілів порівняно з показниками у ПЗЛ та у пацієнтів із меланомою I–III стадії. До того ж, у хворих із III та IV стадіями знижується абсолютний вміст лімфоцитів щодо цього показника у ПЗЛ (відповідно 1,37 (0,61; 2,02)·10⁹/л та 1,30 (0,75; 1,83)·10⁹/л проти 1,77 (1,13; 2,54)·10⁹/л; р<0,05). На стадії генералізації процесу зменшення кількості лімфоцитів стає статистично вагомим при порівнянні з такою у хворих на ПЛМ (1,30 (0,75; 1,83)·10⁹/л проти 1,44 (0,91; 2,35)·10⁹/л; р<0,05).

Дослідження вмісту основних популяцій лімфоцитів (табл. 1) у хворих із різними стадіями меланомою показало, що суттєві зміни абсолютних показників виникають уже на IA–IIC стадії захворювання: зменшується кількість V-лімфоцитів (CD19⁺) (0,10 (0,05; 0,22)·10⁹/л проти 0,13 (0,08; 0,20)·10⁹/л у ПЗЛ; р<0,05) та Т-клітин (CD3⁺) (1,04 (0,56; 1,63)·10⁹/л проти 1,24 (0,81; 1,93)·10⁹/л у ПЗЛ; р<0,05). Проте з прогресуванням пухлинного процесу суттєвого зниження абсолютної кількості V- та Т-лімфоцитів не відбувається, і при III та IV стадії захворювання ці показники знаходяться майже на рівні значень у пацієнтів із ПЛМ. На IA–IIC стадії меланомою зміни абсолютної кількості Т-клітин відбуваються, перш за все, за рахунок зменшення кількості CD8⁺-лімфоцитів (0,44 (0,19; 0,65)·10⁹/л проти 0,53 (0,27; 0,79)·10⁹/л у ПЗЛ; р<0,05), дефіцит цієї субпопуляції Т-лімфоцитів наростає з генералізацією пухлинного процесу, на IV стадії захворювання

їх чисельність стає вірогідно нижчою, ніж у хворих на ПЛМ (відповідно 0,34 (0,18; 0,55)·10⁹/л проти 0,44 (0,19; 0,65)·10⁹/л; р<0,05). У хворих з регіонарними та віддаленими метастазами вірогідно зменшується і абсолютна кількість CD4⁺-лімфоцитів, але лише щодо цього показника у групі ПЗЛ.

Відносна кількість CD3⁺- та CD19⁺-лімфоцитів у хворих на меланому шкіри не відрізняється від норми і залишається на однаковому рівні на всіх стадіях захворювання. Проте виникають зміни у субпопуляційному складі Т-клітин у осіб із IV стадією захворювання. У цій групі хворих збільшується частка CD4⁺-лімфоцитів порівняно з такою у групі ПЗЛ (відповідно 45 (36; 57)% проти 42 (34; 48)%; р<0,05), внаслідок чого на фоні фізіологічних значень відносної кількості CD8⁺-лімфоцитів з'являється тенденція до підвищення імунорегуляторного індексу. Дослідження субпопуляційного складу V-лімфоцитів не виявило суттєвої різниці у відсотковому вмісті V₁- та V₂-клітин у периферичній крові пацієнтів на різних стадіях захворювання. Аналогічні дані щодо збереження відносної кількості Т-лімфоцитів у хворих на меланому шкіри отримали Є.К. Олейник та співавторами [7]. Проте наші дані протирічать результатам цих досліджень про сталі значення субпопуляцій CD4⁺ та CD8⁺ Т-лімфоцитів та збільшення CD19⁺-лімфоцитів на всіх стадіях пухлинного процесу.

У хворих на ПЛМ та з метастазами у регіонарних лімфатичних вузлах абсолютна кількість природних клітин-кілерів (ПКК) (CD16⁺) знаходиться на рівні цього показника у ПЗЛ. Проте поява віддалених метастазів супроводжується зменшенням загальної кількості CD16⁺-лімфоцитів щодо значень цього показника у хворих на ПЛМ та у ПЗЛ (відповідно 0,19 (0,08; 0,33)·10⁹/л проти 0,35 (0,14; 0,58)·10⁹/л та 0,34 (0,24; 0,62)·10⁹/л; р<0,05).

На IA–IIC стадії захворювання відносна кількість CD16⁺-лімфоцитів вірогідно вища за норму (22 (15; 34)% проти 20 (14; 26)% у ПЗЛ; р<0,05), на III стадії цей показник знижується, досягаючи рівня у ПЗЛ, і на IV стадії (14 (9; 25)%) — значно нижчий, ніж у групі хворих на ПЛМ та ПЗЛ (р<0,05). Така динаміка змін кількості ПКК відповідає результатам, отриманим у пацієнтів із ПЛМ та генералізованою меланомою шкіри в Російському онкологічному центрі РАМН ім. М.М. Блохіна [3, 5].

Нами також досліджено вміст Трег у периферичній крові хворих на меланому шкіри (див. табл. 1).

14. Liu W., Putman A.L., Xu-Yu Z. et al. (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺Treg cells. *J. Exp. Med.*, 203(7): 1700–1711.

15. Menard C., Ghiringhelli F., Roux S. et al. (2008) CTLA-4 blockade confers lymphocyte resistance to regulatory T-cells in advanced melanoma: surrogate

marker of efficacy of tremelimumab? *Clin. Cancer Res.*, 14(16): 5242–5249.

16. Saito T., Dworacki G., Gooding W. et al. (2000) Spontaneous apoptosis of CD8⁺ T-lymphocytes in peripheral blood of patients with advanced melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 6: 1351–1364.

17. Seddiki N., Santner-Nanan B., Martison J. et al. (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors

discriminates between human regulatory and activated T-cells. *J. Exp. Med.*, 203(7): 1693–1700.

18. Viguier M., Lemaître F., Verola O. et al. (2004) Foxp3 expressing CD4⁺CD25^{high} Regulatory T-cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T-cells. *J. Immunol.*, 173: 1444–1453.

Особенности иммунного статуса больных меланомой кожи на разных стадиях опухолевого процесса

Ф.В. Фильчаков, С.Н. Кукушкина, Е.С. Шумилина, А.Д. Лен, С.И. Коровин, М.Н. Кукушкина

Национальный институт рака, Киев

Резюме. Проведена оценка иммунного статуса 87 больных меланомой кожи I–IV стадии. Установлено, что с появлением регионарных и отдаленных метастазов развивается системная иммунодепрессия, морфологическим эквивалентом которой является прогрессивное уменьшение общего количества циркулирующих лимфоцитов с одновременным уменьшением количества наиболее функционально значимых субпопуляций — Т-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров, которая ассоциируется с существенным увеличением количества регуляторных Т-клеток. Уже на начальных стадиях заболевания выявляются признаки активационной дисфункции иммунной системы: увеличена доля клеток, экспрессирующих HLA-DR и CD25-антиген, с прогрессированием болезни увеличивается доля CD69⁺- и CD95⁺-лимфоцитов. Наличие иммунологических нарушений необходимо учитывать при проведении биотерапии у больных меланомой кожи.

Ключевые слова: меланома кожи, иммунный статус, иммунодепрессия, активационная дисфункция иммунной системы.

The immune system status in skin melanoma patients depending on the disease stage

F.V. Fil'chakov, S.M. Kukushkina, K.S. Shumilina, A.D. Lon, S.I. Korovin, M.M. Kukushkina

National Cancer Institute, Kyiv

Summary. The evaluation of the immune system status of 87 skin melanoma patients I–IV stages of disease is carried out. It is established, that system immunodepression develops with occurrence regional and remote metastasises. The morphological equivalent of this is progressive reduction of total quantity of circulating lymphocytes with simultaneous reduction of quantity of most functionally significant subpopulations — T-lymphocytes and natural killer cells, which associates with essential increase of regulatory T-cells quantity. Attributes of activation dysfunctions of immune system were revealed at the first stages of disease: quantity of HLA-DR⁺- and CD25⁺-cells was increased, the progress of disease is accompanied by increasing of the relative maintenance CD69⁺- and CD95⁺-lymphocytes. Account must be taken of immunological disorders at carrying out of biotherapy for skin melanoma patients.

Key words: skin melanoma, the immune system status, immunodepression, activation dysfunction of immune system.