

На правах рукописи

ЧЕРНЯВСКАЯ МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И ПРОГРЕССИРОВАНИЯ
МЕЛАНОМЫ ХОРИОИДЕИ**

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2016

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
заслуженный деятель науки РФ,
член-корреспондент РАН

Ефремов Анатолий Васильевич

Официальные оппоненты:

Шилова Ольга Геннадиевна, доктор медицинских наук, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра офтальмологии, факультет повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов, профессор кафедры, заведующая курсом

Мирошниченко Лариса Аркадьевна, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга», лаборатория патофизиологии и экспериментальной терапии, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский научно-исследовательский институт онкологии»

Защита состоится « ____ » _____ 2015 г. в ____ на заседании диссертационного совета Д 001.031.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (634282, г. Томск, пр. Ленина, 3)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (www.pharmso.ru)

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Амосова Евдокия Наумовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В последние годы отмечено увеличение частоты опухолей органа зрения. По сведениям, опубликованным в мировой литературе, общее количество больных с новообразованиями органа зрения, ежегодно обращающихся к врачам за помощью, составляет 110-120 человек на 1 000 000 населения (Бровкина А.Ф., 2002; Давыдов М.И и др., 2009; Гришина Е.Е., 2010; Coupland S.E., 2013). Утрата зрительных функций при доброкачественных новообразованиях, плохой прогноз продолжительности жизни при злокачественных опухолях определяют медицинскую и социальную значимость своевременного проводимых терапевтических мероприятий, особенно органосохранного характера. При меньшем размере опухоли лечение более эффективно предотвращает дальнейший рост, опасность метастазирования (Бровкина А.Ф., 2002; Petousis V. et al., 2012; Damato V.E. et al., 2014). Внутриглазные опухоли занимают второе место среди новообразований органа зрения, уступая по частоте лишь опухолям век. Увеальные меланомы (УМ) разделяют на меланомы радужки, цилиарного тела и хориоидеи. Наиболее распространённая локализация УМ – хориоидея (до 87,37%) (Бровкина А.Ф., 2002; Biswas J., 2004; Hu D.-N. et al., 2008; Damato V.E. et al., 2012).

Актуальность проблемы меланомы хориоидеи (МХ) определяется высоким удельным весом данной патологии в структуре первичных внутриглазных новообразований органа зрения (80-90%) (Семёнова Л.Е., 2002; Damato V.E. et al., 2012; Vlaskamp M. et al., 2012; Coupland S.E. et al., 2013; Lake S.L. et al., 2013).

Меланома хориоидеи является одной из наиболее распространенных форм увеальной меланомы и наиболее частой первичной злокачественной внутриглазной опухолью. По данным Pane A.R. (2000) ежегодная заболеваемость в США и Европе составляет 4-6 человек на 1 млн населения. Отмечено, что в Квинсленде, Австралия (находящийся под озоновой дырой) самый высокий уровень заболеваемости во всем мире – 10 человек на 1 млн населения в год. Хотя было доказано, что ультрафиолетовое излучение играет определенную роль в патогенезе кожной меланомы, тем не менее, связь с МХ не отмечена. При воздействии ультрафиолетового излучения отмечены локализация онкологического процесса преимущественно в заднем полюсе глазного яблока и увеличение частоты встречаемости МХ у людей с голубыми радужками, частыми занятиями на открытом воздухе (Pane A.R. et al., 2000; Petousis V. et al., 2012).

Опухоль на ранних стадиях диагностируется нечасто, и системные метастазы появляются в 40% случаев в течение 5 лет. Приблизительно 30-50% больных умирают в течение 10 лет с момента диагностики и лечения (Bergan T.M. et al., 2009).

При лечении маленьких меланом хориоидеи 5-летняя смертность составляет 12% (The COMS, 1997; Graell X. et al., 2007). Опухоль может метастазировать до появления глазных симптомов (около 2% случаев) (Robertson D., 2003; Reddy S. et al., 2005; Finger P.T. et al., 2007). К факторам,

ухудшающим витальный прогноз, принято относить возраст пациента, гистологический тип и морфологическую характеристику опухоли, её локализацию и диаметр основания, выход опухоли за пределы зоны первичной анатомической локализации (Стоюхина А.С., 2012; Bakalian S. et al., 2008; Damato V.E. et al., 2014).

При опухолях различного гистогенеза имеют место разнообразные нарушения в иммунной (противоопухолевой) защите. В то же время обнаружены однотипные иммунные нарушения при различных опухолях (Шабашова Н.В., 1998; Liang J. et al., 2011). Это подтверждает тот факт, что иммунные нарушения являются не только следствием, но и причиной опухолевого роста (Малецкий А.П. и др., 1997).

В борьбе с опухолевым ростом компенсаторные возможности иммунной системы постепенно истощаются, вторичный иммунодефицит усугубляется, что характеризуется снижением количества и дифференцировки стволовых клеток костного мозга, увеличением числа цитотоксических Т-лимфоцитов и снижением числа нормальных киллерных клеток (НК-клеток) и их цитолитической активности. Гипопродукция одних цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2) наряду с увеличением синтеза других (ИЛ-6, а на поздних стадиях ФНО- α) свидетельствует о нарастающем дисбалансе в цитокиновой сети (Лихванцева В.Г., 2001; Liang J. et al., 2011; Neurath M.F. et al., 2011). Считается, что противоопухолевая защита ассоциируется с Th1-типом иммунного ответа, в то время как опухолевая прогрессия с Th2-типом (Потапнев М.П., 2002; Юрьев Д.В., 2012; Reiche E.M. et al., 2004; Amedei A. et al., 2009; Byun M.S. et al., 2009). Большое значение в противоопухолевой защите отводится ИЛ-2 - стимулятору активности НК-клеток и макрофагов, ИФН- α , препятствующему васкуляризации опухолей и вызывающему их склерозирование, а также ИФН- γ , усиливающему функциональную активность натуральных киллеров. Сдерживают рост ряда неоплазий ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-9, ИЛ-12 (Тотолян А.А., 2000; Селезнева Т.Д., 2007; Шевелёв С.В. и др., 2007; Барсуков В.Ю., 2008; Chen Y.L. et al., 2013). Между тем, ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-8, ИЛ-10 и другие способствуют росту и васкуляризации злокачественных опухолей различной локализации, подавляют специфические иммунные реакции против неоплазии (Хаитов Р.М. и др., 2001; Артамонова Е.В., 2007; Lai Y. et al., 2011; Kuai W.X. et al., 2012). Обращает на себя внимание тот факт, что и малигнизированные клетки могут сами продуцировать различные цитокины. Так, клетки меланомы, карциномы различной локализации, остеосаркомы секретируют ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-11, ослабляющие цитотоксические эффекты некоторых клеток иммунной системы (Bendelac A. et al., 2007; Levi B. et al., 2011; Kuai W.X. et al., 2012; Shiotani A. et al., 2012).

Установлено, что ключевую роль в процессе роста и метастазирования опухоли играют металлопротеиназы (ММП) – ферменты, разрушающие экстрацеллюлярный матрикс, индуцирующие процессы неоангиогенеза. Изучение этих маркеров является перспективным для определения прогноза

течения злокачественных образований (Кондакова И.В. и др., 2011; Савенкова О.В. и др., 2011).

По мнению ученых, универсальными маркерами деструкции тканей, вне зависимости от локализации в организме, являются межорганные аутоантигены, такие как антигены нативной и денатурированной ДНК, которые появляются в циркуляции при разрушении клеточных мембран и освобождении ядерного вещества (Аутеншлюс А.И., 1998). В настоящее время определение аутоантител к антигенам нативной ДНК (ААТ к Аг нДНК), в качестве оценки выраженности деструктивных процессов и аутоиммунных реакций используется исследователями при различных патологических процессах, в том числе в слезной жидкости глаза при таких заболеваниях как глаукома, катаракта, регматогенная отслойка сетчатки (Кудрявцева И.В., 2000; Божин Е.Ю., 2001; Илларионова А.Р. и др., 2002; Черных В.В., 2001, 2014). Установлены достоверно высокие уровни ААТ к Аг нДНК при онкологических процессах (опухолевые заболевания матки, молочной железы) (Рыкова Е.Ю. и др., 2008; Ефремов А.В. и др., 2011).

Однако отсутствует достоверная связь нарушений локальной продукции цитокинов с ключевыми стадиями развития меланомы хориоидеи, что затрудняет понимание механизмов участия цитокинов в патогенезе меланомы хориоидеи. При различных стадиях опухолевого процесса изучение локальных иммунных реакций может использоваться как при назначении системной и местной иммунокоррекции, так и для прогнозирования течения меланомы хориоидеи.

Степень разработанности. Известно, что рост злокачественной опухоли ассоциируется с прогрессирующим иммунодефицитом. При увеальной меланоме наблюдаются количественные и качественные изменения в системе естественной цитотоксичности, включая снижение цитолитической активности нормальных киллерных клеток и фагоцитарной активности макрофагов, индекса бласттрансформации лимфоцитов, миграции лейкоцитов, трансформации моноцитов в макрофаги, нарушение нормального соотношения субпопуляций (Малецкий А.П. и др., 1997; Landreville S. et al., 2012; Radosavljevic G.D. et al., 2012; Bol K.F. et al., 2014). Установлена прямая коррелятивная взаимосвязь между степенью угнетения иммунитета и прогнозом заболевания (Гусев Г.А., 1992; Jensen T.O. et al., 2012; Cintolo J.A. et al., 2013). У больных УМ выявлен дисбаланс в цитокиновой сети, как на уровне всего организма, так и глаза (Лихванцева В.Г., 2002; Lee C.S. et al., 2012; Nagarkatti-Gude N. et al., 2012). Тем не менее, нет сведений о взаимосвязи стадий развития меланомы хориоидеи с локальной продукцией цитокинов, что может установить их роль в механизмах патогенеза меланомы хориоидеи. Изучение локальных иммунных реакций при различных стадиях опухолевого процесса может использоваться не только для прогнозирования течения меланомы хориоидеи, но и при назначении системной и местной иммунокоррекции.

Цель исследования - изучить участие локальных иммунных механизмов в развитии и прогрессирования меланомы хориоидеи.

Задачи исследования:

1. Изучить участие цитокинов в патогенезе меланомы хориоидеи на различных этапах ее развития.

2. Исследовать роль металлопротеиназы-9 как маркера опухолевого ангиогенеза в механизмах прогрессирования меланомы хориоидеи.

3. Оценить выраженность клеточной деструкции на локальном уровне (исследования уровня аутоантител к антигенам нативной ДНК) в патогенетических механизмах развития меланомы хориоидеи.

4. Изучить влияние прогрессирования меланомы хориоидеи на показатели цитокинового статуса не поражённого опухолью глаза.

Научная новизна. На основании полученных результатов исследований слёзной и внутриглазной жидкостей установлены особенности иммунных и метаболических нарушений, которые способствуют расширению патогенетических представлений о развитии опухолевого процесса у пациентов с меланомой хориоидеи.

Впервые показано, что в слёзной и внутриглазной жидкостях у больных концентрация ИЛ-6 и ИЛ-8 повышена, причем продукция ИЛ-6 на ранних стадиях развития меланомы хориоидеи (Т1-Т2) была выше, чем на поздних (Т3-Т4), а выработка ИЛ-8 была высокой на всех стадиях опухолевого процесса. Это свидетельствует о высокой активности локального воспалительного процесса, доминировании провоспалительных цитокинов, которые одновременно являются проонкогенными и способствуют опухолевой прогрессии в глазном яблоке. В то же время концентрация противовоспалительного цитокина ИЛ-4 была снижена вне зависимости от стадии развития меланомы хориоидеи, что может играть роль в снижении местной противоопухолевой активности. Впервые было выявлено увеличение продукции иммуносупрессивного цитокина – ИЛ-10 в слёзной и внутриглазной жидкостях у пациентов с меланомой хориоидеи, при чем гиперпродукция ИЛ-10 в слёзной жидкости поражённого глаза ассоциировалась или с самой начальной стадией опухолевого процесса (Т1), или с самой поздней развитой стадией процесса и готовностью к метастазированию (Т4).

Впервые обнаружена сопряженная связь между концентрацией ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ММР-9, ААТ к Аг нДНК в слёзной жидкости глаза с МХ и парного глаза, не поражённого опухолью, что свидетельствует об однотипных иммунных реакциях, разворачивающихся первоначально в глазу с меланомой хориоидеи, а затем уже и в парном глазу. Выявлена также достоверная корреляционная связь между концентрацией ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ММР-9, ААТ к Аг нДНК в слёзной и внутриглазной жидкостях глазного яблока с МХ, что дает возможность изучения процессов прогрессирования опухолевого процесса на локальном уровне.

Установлено, что при меланоме хориоидеи повышается активность ангиогенеза, о чем свидетельствует увеличение концентрации

металлопротеиназы-9 в слёзной и внутриглазной жидкостях вне зависимости от стадии развития патологического процесса.

В глазном яблоке с МХ определяется высокий уровень ААТ к Аг нДНК в слёзной и внутриглазной жидкостях вне зависимости от размера и агрессивности роста, а так же локализации меланомы хориоидеи, что можно связать с активацией процессов клеточной деструкции при развитии опухолевого процесса.

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании проведенных исследований доказана взаимосвязь стадии опухолевого процесса МХ с концентрацией отдельных цитокинов в слёзной жидкости поражённого опухоли глаза, что даёт возможность судить о прогрессировании опухолевого процесса и расширяет наши представления о патогенезе меланомы хориоидеи.

Для ранних этапов развития меланомы хориоидеи (Т1-Т2) характерна гиперпродукция ИЛ-6 в слёзной жидкости поражённого глаза, относительно более поздних стадий (Т3-Т4). При стадиях Т1 и Т4 меланомы хориоидеи отмечается достоверное повышение концентрации ИЛ-10 в слёзной жидкости поражённого органа. Проведение иммуноферментного исследования слёзной жидкости с определением концентрации ИЛ-10 позволило с высокой точностью диагностировать стадии развития процесса меланомы хориоидеи. Гиперпродукция ИЛ-10 в слёзной жидкости поражённого глаза при развитой стадии меланомы хориоидеи свидетельствует об агрессивности опухоли и готовности к метастазированию меланомы собственной сосудистой оболочки.

Определена связь концентрации ИЛ-10 с локализацией процесса на глазном дне. При преэкваatorialном расположении злокачественного процесса концентрация ИЛ-10 в слёзной жидкости глаза с меланомой хориоидеи достоверно выше, чем при расположении опухоли в постэкваatorialной зоне.

Методология и методы исследования. Согласно поставленным задачам выбраны современные высокоинформативные методические подходы, имеющиеся в Новосибирском филиале ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России. В качестве объекта исследования использовались пациенты с меланомой хориоидеи на различных стадиях развития опухолевого процесса. Основные методы исследования: методы офтальмологического обследования (визометрия, пневмотонометрия, биомикроскопия переднего отрезка глаза, прямая и обратная офтальмоскопия при помощи высокодиоптрийной линзы, А-В-сканирование, по показаниям – гониоскопия, оптическая когерентная томография и флюоресцентная ангиография глазного дна); иммуноферментный метод (определение уровня концентрации ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, металлопротеиназы-9 и аутоантител к антигенам нативной ДНК в слёзной и внутриглазной жидкостях).

Положения, выносимые на защиту:

1. Развитие и рост меланомы хориоидеи сопровождается высокой активностью локального воспаления, проявляющееся высокими концентрациями ИЛ-6, ИЛ-8 и низкими концентрациями ИЛ-4 в слёзной и внутриглазной жидкостях.

2. Меланома хориоидеи на всех этапах развития характеризуется высоким уровнем пролиферативных процессов, вызывающих высокие концентрации ММР-9 как в слёзной, так и во внутриглазной жидкостях.

3. Развитие и рост меланомы хориоидеи сопровождается выраженной активностью клеточной деструкции на локальном уровне, что подтверждается высоким уровнем ААТ к Аг нДНК в слёзной и внутриглазной жидкостях на всех стадиях опухолевого роста.

4. Выявленные однотипные изменения иммунобиохимических показателей в слёзной, внутриглазной жидкостях глаза с меланомой хориоидеи и слёзной жидкости не поражённого опухолью глаза свидетельствуют о нарушении гематофтальмического барьера.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом клинического материала с использованием современных методов и методических подходов, соответствующих поставленным задачам. Выводы, сформулированные в диссертации, подтверждены клинико-лабораторными данными, анализом литературы, точностью статистической обработки полученных результатов.

Основные положения диссертационной работы докладывались, обсуждались и представлялись на юбилейной научно-практической конференции, посвященной 20-летию курса офтальмологии ФПК и ППС СибГМУ «Современные технологии диагностики и лечения заболеваний органа зрения» (Томск, 2014), на IX Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы офтальмологии» в рамках научно-практической конференции «Федоровские чтения» (Москва, 2014), на научно-практической конференции №7 ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России (Москва, 2015), на 47-ой Европейской конференции по офтальмоонкологии (Ophthalmic Oncology Group Meeting, Москва, 2015), на международной конференции «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения» («Cellular and molecular mechanisms of tumor-microenvironment crosstalk», Томск, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 6 – в журналах, рекомендованных перечнем ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов, списка используемой литературы. Работа иллюстрирована 15 рисунками и 10 таблицами. Библиографический указатель включает 238 источников, из них 97 отечественных, 141 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В первой главе проведен анализ отечественной и зарубежной научной литературы по теме исследования. В первом разделе представлены сведения об особенностях локальных воспалительных реакций при внутриглазных опухолях. Далее изложены данные о протекании пролиферативных процессов при развитии внутриглазных опухолей, в частности, приведены сведения о роли ангиогенеза в росте опухолей. Последний раздел главы «Обзор литературы» посвящен иммунным нарушениям при опухолевом поражении глазного яблока, подчеркнута важность изучения состояния, как местного, так и системного иммунитета.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материала и методов исследования. Клиническое исследование было выполнено с участием 36 больных в возрасте от 34 до 83 лет (средний возраст – $60,45 \pm 12,56$) с МХ, находившихся под наблюдением в НФ ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России в 2010-2013 гг. Исследование было одобрено Этическим комитетом при НГМУ (протокол № 29 от 16.12.2010). Из больных меланомой хориоидеи женщины составили 21 пациент (58,33%), мужчины - 15 (41,67%). Высота МХ составляла от 1,68 до 15 мм, в среднем – $6,6 \pm 4,01$, максимальный диаметр от 4,73 до 20 мм, в среднем – $12,83 \pm 4,14$ мм. Правый глаз в данной группе поражен у 20 пациентов (55,56%), а левый – в 16 случаях (44,44%). Энуклеация была проведена у 11 больных (30,56%) с одновременным забором внутриглазной жидкости (ВГЖ) и дальнейшим гистологическим исследованием. 25 пациентов (69,44%) были направлены на консультацию и решение вопроса о возможности органосохранного лечения в головную организацию ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова г. Москва.

По локализации меланомы хориоидеи выделяли преэквадриальное расположение опухоли – 12 пациентов (33,33%), постэквадриальное – 13 больных (36,11%) и обширная опухоль отмечена у 11 пациентов, что соответствовало 30,56%.

Учитывая международную классификацию TNM (2011 г.), распределение МХ было следующим: стадии T1aN0M0 соответствовало 8 опухолей (22,22%), для стадии T2aN0M0 – 9 опухолей (25%), 10 опухолей (27,78%) соответствовали стадии T3aN0M0 и 9 опухолей (25%) стадии T4aN0M0.

Диагностика пациентов с МХ основывалась на жалобах, данных анамнеза, комплексного клиничко-инструментального обследования (В-сканирование, УЗИ орбит с доплерографическим исследованием, по показаниям – компьютерная или магнитно-резонансная томография орбит).

Всем пациентам с меланомой хориоидеи осуществлялся забор слёзной жидкости до хирургического вмешательства. Слёзную жидкость для исследования набирали микроканюлей из нижнего конъюнктивального свода

глаза в сухую герметичную пробирку в количестве 0,5 мл. Стимуляцию продукции СЖ осуществляли посредством механического раздражения окончания рецепторов тройничного нерва в слизистой оболочке глаза.

В качестве контрольных значений после взятия информированного согласия на проведение исследования были использованы данные обследования 20 «практически здоровых» доноров СЖ – добровольцев (сотрудники НФ ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова») аналогичного возраста, у которых не было выявлено офтальмологической патологии и которые за 3 месяца до обследования не переносили острых воспалительных заболеваний бактериальной и вирусной этиологии.

В случае необходимости энуклеации забор внутриглазной жидкости осуществлялся после операции из передней камеры глазного яблока методом парацентеза иглой и шприцом.

В качестве методов лабораторной диагностики было выбрано определение следующих показателей: ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, матриксная металлопротеиназа-9, аутоантитела к антигенам нативной ДНК (ААТ к Аг нДНК) методом иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA). Определение ИЛ-4 и ИЛ-6 в СЖ и ВГЖ выполнялось на тест-системах CUSABIO Biotech Co., LTD, Китай по инструкциям производителя. Определение ИЛ-8 и ИЛ-10 в СЖ и ВГЖ выполнялось на тест-системах «Вектор-Бест», Россия согласно инструкциям производителя. Определение MMP-9 в СЖ и ВГЖ выполнялось на тест-системах R&D Systems кат. № DMP900 по инструкции производителя. Определение ААТ к Аг нДНК в СЖ и ВГЖ выполнялось на тест-системах MyBioSource, Inc. кат. № MBS009155 по инструкции производителя.

Для статистической обработки данных были использованы методы описательной статистики и методики межгруппового сравнения. Количественные характеристики представлены как медиана и (в скобках) 25-й и 75-й перцентили либо среднее \pm стандартное отклонение. Качественные признаки представлены как доля и (в скобках) проценты. Количественные признаки сравнивались с применением теста Стьюдента для независимых выборок или теста Манна-Уитни, в зависимости от характера распределения данных.

Рисунки, выполненные в виде графика «ящик с усами» следует трактовать следующим образом: границами ящика служат первый и третий квартили (25-й и 75- перцентили соответственно), величина разброса между этими границами - интерквартильный размах, линия в середине ящика – медиана (50-й перцентиль). Концы усов – края статистически значимой выборки (без выбросов), границы их определяются минимальным и максимальным значением. Верхний «ус» простирается от верхней границы «ящика» до наибольшего выборочного значения, находящегося в пределах расстояния 1.5 х интерквартильный размах от этой границы. Аналогично, нижний «ус» простирается от нижней границы «ящика» до наименьшего выборочного

значения, находящегося в пределах расстояния 1.5 x интерквартильный размах от этой границы.

Межгрупповые сравнения количественных признаков в более чем двух группах выполнялись с применением дисперсионного анализа или теста Краскела-Уоллеса, в зависимости от характера распределения данных.

Межгрупповые сравнения качественных признаков выполнялись с применением Хи-квадрат критерия Пирсона. Для сравнения качественных признаков с малыми частотами применялся точный тест Фишера. Зависимость между двумя количественными признаками оценивалась с применением линейной регрессии и/или критерия корреляции Пирсона, результаты представлены как коэффициент регрессии и/или коэффициент корреляции и (в скобках) соответствующий 95%-й доверительный интервал. Двусторонняя нулевая гипотеза отвергалась при вероятности ошибки первого типа менее 5%. Статистический анализ был выполнен с применением программного обеспечения R (Team R.C., 2013).

Третья глава диссертации посвящена описанию результатов исследования слезной и внутриглазной жидкостей больного и не пораженного опухолью глаза при развитии меланомы хориоидеи. Полученные данные представлены в виде таблиц и рисунков.

Четвертая глава диссертационной работы посвящена обсуждению полученных результатов исследования с привлечением данных литературы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По литературным данным, при офтальмопатологии важное значение приобретает исследование местных иммунных реакций – на уровне глаза. Длительный период времени глаз рассматривали как «забарьерный» орган, отделённый от общей иммунной системы организма гематоофтальмическим барьером и вследствие этого не обладающий иммуногенным потенциалом. Современные представления трактуют об «иммунной привилегии» глаза. В условиях нарушения гематоофтальмического барьера (причины могут быть различные) развитие локальных иммунопатологических реакций обеспечивается с помощью «иммунокомпетентных» зон собственного глаза. К таким зонам глаза потенциально относят периферию и центр роговицы, её эндотелий, радужную оболочку, цилиарное тело, трабекулу, а также пигментный эпителий сетчатки. Изучение иммунологических реакций на уровне глаза является особенно важным, так как это даёт представление об особенностях иммунного ответа на локальном уровне, которые не всегда совпадают с системными сдвигами (Копаева В.Г., 2002).

По одной из версий большинства исследователей развитие спорадического рака имеет последовательный характер, основанием которого является хроническое воспаление, на фоне которого происходит снижение дифференцировки эпителиальных клеток, усиление их пролиферации, результатом чего является возникновение клеточного атипизма и, как следствие, развитие злокачественного новообразования (Рахимова О.Ю., 2008;

O'Connor P.M. et al., 2010; Verbeke H. et al., 2012). Медиаторы воспаления, продуцируемые инфильтрирующими опухоль лейкоцитами, такие как ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 и т.д., взаимодействуя с рецепторами на клетках-мишенях, в частности на опухолевых клетках микроокружения, также вовлекаются в процессы, обеспечивающие жизнедеятельность злокачественного образования (Millar H.J. et al., 2008; Studebaker A.W et al., 2008). Таким образом, по мнению многих авторов, воспалительный процесс может быть не только следствием, но и первопричиной возникновения злокачественных новообразований, поэтому исследование воспалительно-деструктивного процесса на локальном уровне является важным направлением в патофизиологии и офтальмоонкологии, которое в данном исследовании проводится, путём анализа концентраций следующих цитокинов: ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10.

Наиболее доступным объектом исследования в офтальмологии является слёзная жидкость (без инвазивных вмешательств). При хирургическом лечении возможен забор внутриглазной жидкости.

В соответствии с целью и задачами данного исследования было проведён анализ концентрации исследуемых показателей (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ААТ к Аг нДНК, ММР-9), в слёзной жидкости (n=72) обоих глаз (больного, n=36 и парного «здорового» n=36) и ВГЖ (n=11) поражённого опухолью глаза у пациентов с МХ. Для сравнения был выполнен анализ слёзной жидкости группы контроля офтальмологически здоровых лиц (n=20).

Концентрация ИЛ-4, как в глазу с МХ (12,4 [11,3;13,6] пг/мл), так и в «здоровом» парном глазу (13,1 [11,2; 13,8] пг/мл) была достоверно ниже контрольных показателей (14,3 [12,7; 17,0] пг/мл), $p < 0,05$ (рис. 1). Была выявлена прямая положительная связь между содержанием ИЛ-4 в слёзной жидкости поражённого и парного «здорового» глаз (коэффициент регрессии (95% ДИ) 0,92 (0,52; 1,31), $p < 0,05$; коэффициент корреляции (95% ДИ) 0,63 (0,37; 0,79), $p < 0,05$. Также отмечалось снижение концентрации ИЛ-4 во внутриглазной жидкости (13,3 [11,7; 14,4] пг/мл) поражённого опухолью глаза по сравнению с уровнем исследуемого цитокина в слёзной жидкости контрольной группы (14,3 [12,7; 17,0] пг/мл), $p < 0,05$. При этом была выявлена достоверная прямая линейная положительная связь между содержанием ИЛ-4 в слёзной и внутриглазной жидкостях поражённого опухолью глаза.

Достоверной зависимости концентрации ИЛ-4 от локализации процесса обнаружено не было. Уровень концентрации ИЛ-4 в слёзной жидкости при всех локализациях опухолевого процесса был достоверно ниже значений контрольной группы.

Имеются сведения о гиперпродукции ИЛ-4 на различных стадиях увеальной меланомы. По данным исследования Лихванцевой В.Г. (2001 г.) повышение уровня ИЛ-4 в сыворотке крови при увеальной меланоме ассоциируется с отягощенным клиническим состоянием. В нашем исследовании содержание ИЛ-4 в слёзной жидкости на всех стадиях опухолевого процесса было достоверно ниже значений контрольной группы.

Роль ИЛ-4 в опухолевых клетках до сих пор дискутируется. С одной стороны, ИЛ-4 обладает противоопухолевыми свойствами, что приводит к

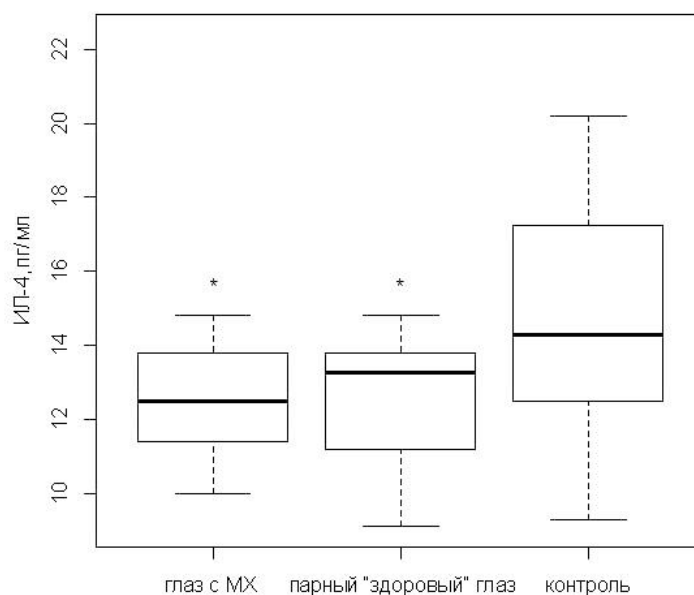


Рисунок 1 - Концентрация ИЛ-4 в слёзной жидкости обследованных групп; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

регрессии опухоли. С другой стороны, ИЛ-4 может подавлять продукцию цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8), обладающих антипролиферативными и цитотоксическими свойствами. Однако, по мнению Kawakami K. и соавт. (2001), на поверхности клеток многих злокачественных новообразований экспрессируется повышенное количество рецепторов к ИЛ-4 по сравнению с нормальными тканями. Не исключено, что это является одним из способов выживания атипичных опухолевых клеток, так как через антиапоптотные молекулы ингибируется апоптоз клеток неоплазмы, потенцируя её прогрессию. В данном исследовании, учитывая достоверно сниженные концентрации ИЛ-4 в слёзной жидкости как в глазу с МХ, так и в парном «здоровом» глазу, эта теория не совсем применима. Но существует мнение, что некоторые новообразования сами способны к продукции данного цитокина, причем ИЛ-4 может, как стимулировать рост одних опухолей, так и подавлять рост других (Prokorchuk O. et al., 2005). Возможно, что развитие меланомы хориоидеи, учитывая агрессивность роста опухоли и её злокачественность, приводит к подавлению выработки ИЛ-4, что и обуславливает его достоверно низкие концентрации в биологических жидкостях глаза.

При исследовании уровня провоспалительного цитокина - ИЛ-6 - в слёзной жидкости было выявлено повышение концентрации исследуемого цитокина, как в глазу с МХ (13,4 [12,4; 14,8] пг/мл), так и в «здоровом» парном глазу (13,9 [12,4; 14,8] пг/мл) относительно показателей группы контроля (9,9 [8,2; 10,9] пг/мл), $p < 0,05$ (рис. 2).

Концентрация ИЛ-6 в слёзной жидкости поражённого глаза при стадиях процесса Т1-Т2 составила 14,2 (12,4; 14,8) пг/мл, что было достоверно выше таковой при более поздних стадиях Т3-Т4 – 12,9 [11,2; 14,1] пг/мл, $p < 0,05$ (рис.

3). При этом была выявлена прямая положительная связь между содержанием ИЛ-6 в слёзной жидкости поражённого и парного «здорового» глаз

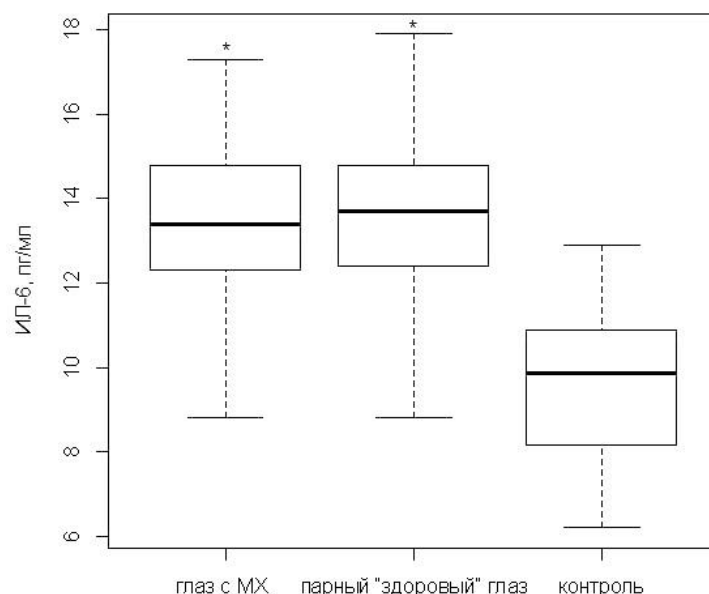


Рисунок 2 - Концентрация ИЛ-6 в слёзной жидкости обследованных групп; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

(коэффициент регрессии (95% ДИ) 0,83 (0,64; 1,03), $p < 0,05$; коэффициент корреляции (95% ДИ) 0,83 (0,67; 0,91), $p < 0,05$). Концентрация ИЛ-6 во внутриглазной жидкости глаза с МХ (13,6 [11,7; 14,4] пг/мл) была достоверно выше содержания исследуемого цитокина в слёзной жидкости контрольной группы (9,9 [8,2; 10,9] пг/мл), $p < 0,05$. При этом была выявлена достоверная прямая линейная положительная связь между содержанием ИЛ-6 в слёзной и внутриглазной жидкостях поражённого опухолью глаза.

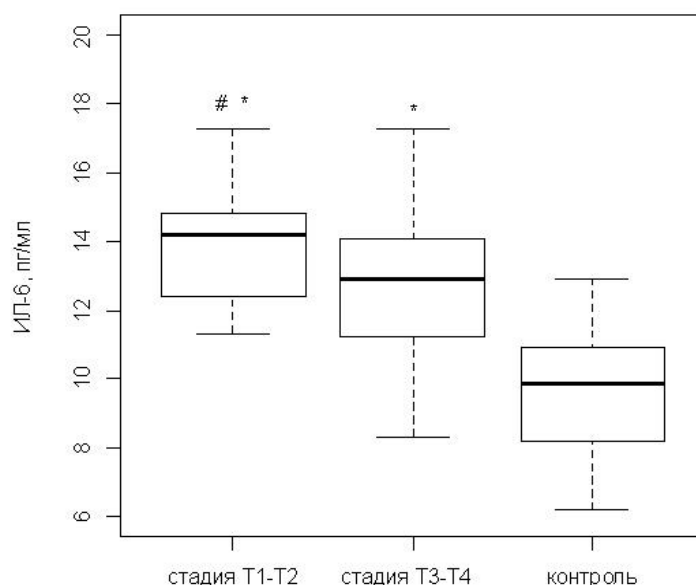


Рисунок 3 - Концентрация ИЛ-6 (пг/мл) в слёзной жидкости поражённого глаза в зависимости от стадии процесса; # $p < 0,05$ по сравнению с 3-4 стадией процесса; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Данные показатели говорят о высокой активности местного воспалительного процесса у пациентов с МХ.

Достоверной зависимости концентрации ИЛ-6 от локализации процесса обнаружено не было. Содержание ИЛ-6 в слёзной жидкости при всех локализациях опухолевого процесса было статистически значимо выше значений контрольной группы.

В отношении злокачественных образований роль ИЛ-6 также неоднозначна. По мнению автора, ИЛ-6 способен повышать экспрессию раково-эмбрионального антигена и главного комплекса гистосовместимости I класса на поверхности опухолевых клеток при злокачественных образованиях, в частности колоректальном раке, что увеличивает вероятность их распознавания иммунокомпетентными клетками (Ullmann C.D. et al., 1992). Другие авторы считают, что опухоль также может продуцировать ИЛ-6 самостоятельно, в то время как ИЛ-6 стимулирует её пролиферативную активность и предотвращает апоптоз (Becker C. et al., 2005). Кроме того, помимо активации воспалительного процесса, ИЛ-6 стимулирует неоангиогенез, происходящий в очаге опухолевого роста (Hess S. et. al., 2000). В нашем исследовании это подтверждается высокими концентрациями ИЛ-6 в биологических жидкостях глаза на всех стадиях развития МХ, и достоверно повышенным уровнем изучаемого цитокина на начальных стадиях развития опухолевого процесса (T1-T2), когда воспалительный процесс и неоангиогенез играют ведущую роль в канцерогенезе.

Имеются данные о кинетике системной и местной продукции ИЛ-6 у пациентов с увеальной меланомой – усиление продукции по мере прогрессирования опухолевого процесса с достижением пика на стадии выхода опухоли за пределы глаза и развитием дефицита при метастазировании. Это, по мнению Лихванцевой В.Г., свидетельствует о том, что цитокины не играют ведущей роли в этиопатогенезе УМ. При меланоме сосудистого тракта продукция цитокинов активизируется компенсаторно в ответ на рост опухоли и призвана удержать позиции местных и системных противоопухолевых механизмов в борьбе с УМ, компенсировать дефекты в цитокиновой сети (Лихванцева В.Г., 2001). В случае же с МХ мы видим последовательное снижение концентрации ИЛ-6 по мере прогрессивного роста опухоли, тем самым мы можем предположить, что активная продукция ИЛ-6 связана с активацией роста и активного деления клеток, как пролиферативное звено, а также с усилением воспалительной реакции на начальных стадиях МХ. При этом развитые стадии меланомы хориоидеи (T3-T4) характеризуются сниженной концентрацией ИЛ-6 в слёзной жидкости по сравнению с начальными стадиями, что связано с истощением клеток-продуцентов и возможной хронизацией воспалительного процесса.

В результате проведённого исследования концентрации провоспалительного цитокина – ИЛ-8 – было обнаружено, что содержание ИЛ-8 в слёзной жидкости, как в глазу с МХ (19,4 [18,8; 20,7] пг/мл), так и в

«здоровом» парном глазу (19,4 [18,8; 23,5] пг/мл) было достоверно выше контрольных показателей (10,9 [9,1; 13,7] пг/мл), $p < 0,05$ (рис. 4).

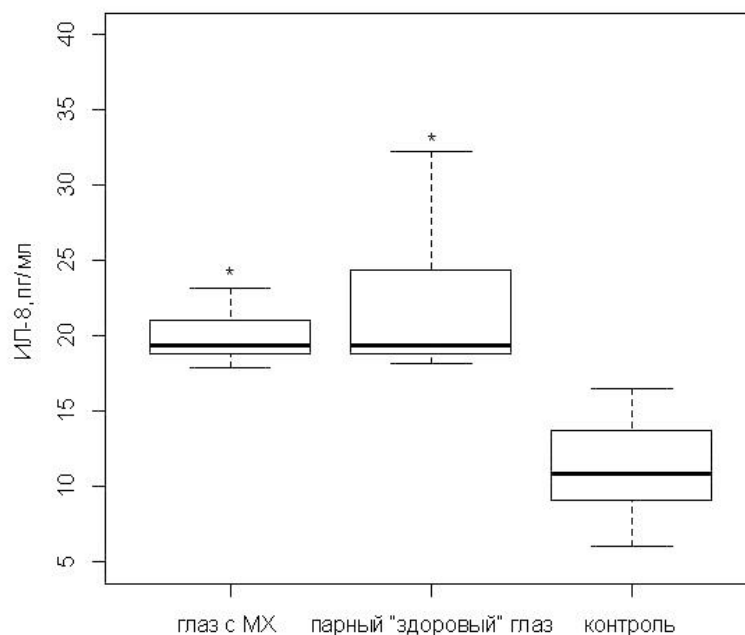


Рисунок 4 - Концентрация ИЛ-8 (пг/мл) в слёзной жидкости обследованных групп; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Была обнаружена зависимость концентрации ИЛ-8 в слёзной жидкости поражённого органа от пола пациента. Продукция провоспалительного цитокина - ИЛ-8 - в глазу с МХ была более выражена у мужчин, чем у женщин.

ИЛ-8 – цитокин, выступающий в качестве хемоаттрактанта для нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов, он способен также усиливать адгезивные свойства нейтрофилов, изменяя экспрессию интегринов, вызывать миграцию клеток, что определяет его роль в развитии воспалительного процесса. Помимо этого, ИЛ-8 активирует эндотелиальные клетки, усиливая их пролиферацию, супрессируя апоптоз и продукцию ими матриксных металлопротеиназ (Li A. et al., 2003), что стимулирует ангиогенез опухоли и тем самым стимулирует онкогенез и метастазирование. В нашем исследовании ИЛ-8 был достоверно повышен на всех стадиях опухолевого процесса МХ вне зависимости от локализации, что подтверждает активность воспалительного процесса и пролиферации, но отсутствие случаев метастазирования у пациентов с МХ не дает основание подтвердить взаимосвязь повышения данного цитокина и распространенность процесса.

При исследовании продукции противовоспалительного цитокина - ИЛ-10 – было установлено, что концентрация ИЛ-10, как в глазу с МХ (15,3 [13,6; 17,] пг/мл), так и в «здоровом» парном глазу (15,4 [12,9; 17,4] пг/мл) была достоверно выше контрольных показателей (13,4 [11,3; 14,9] пг/мл), $p < 0,05$ (рис. 5). Была выявлена прямая положительная связь между уровнем ИЛ-10 в слёзной жидкости поражённого и здорового глаз, коэффициент регрессии (95%

ДИ) 0,88 (0,58; 1,17), $p < 0,05$, коэффициент корреляции (95% ДИ) 0,72 (0,51; 0,85), $p < 0,05$.

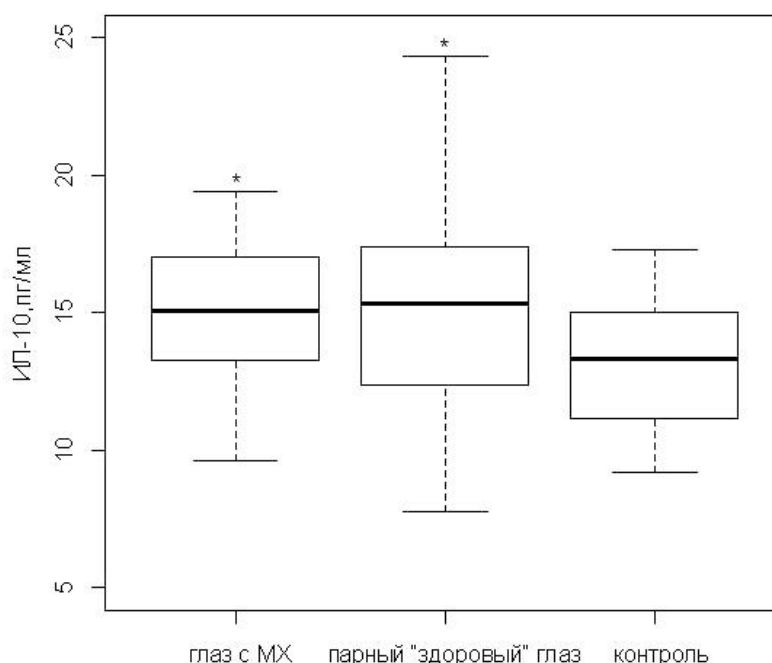


Рисунок 5 - Концентрация ИЛ-10 в слёзной жидкости обследованных групп; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Концентрация ИЛ-10 во внутриглазной жидкости (16,3 [12,9;18,7] пг/мл) была достоверно выше содержания исследуемого цитокина в слёзной жидкости контрольной группы (13,4 [11,3; 14,9] пг/мл, $p < 0,05$). При этом была установлена статистически значимая положительная взаимосвязь между уровнем ИЛ-10 в слёзной и внутриглазной жидкостях поражённого опухолью глаза.

Достоверное повышение концентрации ИЛ-10 в биологических жидкостях глаза поражённого МХ вероятно свидетельствует о развитии иммуносупрессии в ответ на развитие опухолевого процесса. Увеличение содержания ИЛ-10 в «здоровом» парном глазу можно рассматривать как проявления нарушений целостности гематофтальмического барьера и выхода опухолевого процесса на системный уровень.

ИЛ-10 - противовоспалительный цитокин, который в свою очередь нарушает дифференцировку, созревание и антигенпрезентирующую функцию дендридных клеток за счет снижения экспрессии главного комплекса гистосовместимости класса II и молекул костимуляции - CD80 и CD86. ИЛ-10 также может ингибировать продукцию многих цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-12) (Mosser D.M., 2008). В связи с этим, усиление продукции ИЛ-10 в слёзной и внутриглазной жидкостях поражённого опухолью глаза может компенсаторно подавлять выработку ИЛ-4 в биологических средах глаза с МХ, что подтверждается результатами нашего исследования. При различных опухолях отмечено повышение уровня ИЛ-10, приводящее к снижению активности Т-киллеров, экспрессии антигенов главного комплекса

гистосовместимости, снижению продукции интерферона-гамма, что приводит к ослаблению процесса презентации опухоль-ассоциированных антигенов. Высокая концентрация ИЛ-10 является плохим прогностическим признаком и сочетается с прогрессией опухолевого роста.

Значения ИЛ-10 в слёзной жидкости поражённого глаза при T1 (15,8 [14,4; 17,6] пг/мл) и T4 стадиях развития процесса (15,9 [14,8;17,1] пг/мл) были достоверно выше показателей контрольных значений (13,4 [11,3; 14,9] пг/мл, $p<0,05$), что может являться дополнительным критерием диагностики стадии меланомы хориоидеи.

Гиперпродукция ИЛ-10 ассоциировалась или с самой начальной стадией опухолевого процесса, или с самой поздней развитой стадией процесса и готовностью к метастазированию. Возможно, учитывая данные Gerlini G. и соавт. (2004), в экспериментальных исследованиях, моделирующих развитие неоплазм на фоне хронического воспаления, высокие концентрации ИЛ-10 в нашем исследовании при стадии T1 меланомы хориоидеи обусловлены тем, что ИЛ-10 препятствуют развитию злокачественных новообразований в силу своей противовоспалительной активности, ингибирует экспрессию главного комплекса гистосовместимости I класса опухолевыми клетками, за счет чего повышает их чувствительность к цитотоксическому влиянию натуральных киллеров. А повышенные концентрации ИЛ-10 при стадии T4 развития меланомы хориоидеи, возможно, обусловлены тем, что клетки МХ способны синтезировать ИЛ-6, который связываясь с рецепторами ИЛ-6R и индуцирует выработку ИЛ-10 клетками МХ, который благодаря своим иммуносупрессивным свойствам помогает опухоли избежать иммунного надзора, как в случае с колоректальным раком (Herbeuval J.P. et al., 2004). Роль ИЛ-10 при злокачественных новообразованиях неоднозначна. ИЛ-10 на стадии T4 развития меланомы хориоидеи может способствовать росту путем стимуляции пролиферации клеток и ингибирования апоптоза (Sredni B. et al., 2004), в то время как на T1 стадии развития опухоли ИЛ-10 может выступать в качестве ингибитора индуцированного опухолью ангиогенеза и повышать производство в опухоли токсичных молекул (например, оксид азота (NO), что приводит к регрессии новообразования (Lech-Maranda E. et al., 2004).

Концентрация ИЛ-10 в слёзной жидкости при преэкваatorialной локализации меланомы хориоидеи (16,5 [15,0; 17,6] пг/мл) была достоверно выше аналогичного показателя в группе с расположением опухоли в постэкваatorialной зоне (13,9 [13,0; 14,8] пг/мл, $p<0,05$). Содержание ИЛ-10 в слёзной жидкости у пациентов с преэкваatorialной и обширной локализацией опухолевого процесса (15,9 [14,2;17,2] пг/мл) превышало контрольные значения (13,4 [11,3; 14,9] пг/мл, $p<0,05$). При постэкваatorialном расположении меланомы хориоидеи концентрация ИЛ-10 в слёзной жидкости достоверно не отличалась от контрольного показателя. Можно сделать предположение, что продукция данного цитокина зависит от локализации опухолевого процесса. Одна из версий, объясняющая этот факт, позволяет высказать предположение о том, что при развитии меланомы хориоидеи

различной локализации неоднозначно стимулируются клетки, вырабатывающие ИЛ-10. Так, для преэквиаториальной локализации МХ более характерны опухоли, диагностируемые в терминальной стадии (Т4), так как расположение меланомы на крайней периферии собственной сосудистой оболочки затрудняет своевременную диагностику и чаще всего опухолевый процесс протекает бессимптомно, а жалобы появляются лишь тогда, когда высота опухоли начинает перекрывать зрачковую зону, при помощи которой свет равномерно попадает на сетчатку. И соответственно, при даже частичном перекрывании этой зоны у пациентов появляются жалобы на «завесу» перед глазом или появление «шторки», что и является причиной обращения к врачу. При постэквиаториальном расположении МХ, опухоль находится в зоне видимости офтальмолога, даже не расширяя зрачок медикаментозным способом, таким образом возможна диагностика на профилактических медицинских осмотрах с выявлением на ранних стадиях развития, кроме того опухоль часто располагается около макулярной зоны или с вовлечением её, что и является причиной снижения зрения и появлением жалоб на метаморфопсии. Для обширных локализаций так же более характерны опухоли стадий Т3-Т4, так как вовлечено несколько зон учитывая размеры опухоли. Таким образом, учитывая достоверно высокие концентрации ИЛ-10 на стадии Т4 в слёзной жидкости у пациентов с МХ, можно предположить связь повышения содержания ИЛ-10 у пациентов с меланомой хориоидеи преэквиаториальной и обширной локализациями. Менее выраженное повышение концентраций ИЛ-10 при постэквиаториальном расположении, так как для данной локализации более характерны стадии Т1, Т2, Т3, а при стадии Т2-Т3 достоверного повышения содержания ИЛ-10 в слёзной жидкости выявлено не было.

Установлена прямая положительная связь между концентрацией ИЛ-10 в слёзной жидкости поражённого глаза и возрастом пациентов, коэффициент регрессии (95% ДИ) 0,08 (0,01; 0,16), $p < 0,05$, коэффициент корреляции (95% ДИ) 0,37 (0,05; 0,62), $p < 0,05$. Это свидетельствует о том, что концентрация ИЛ-10 в СЖ глаза с МХ увеличивается с возрастом пациента, что возможно объясняется повышением иммуносупрессивных свойств ИЛ-10 с возрастом пациента и может служить признаком неблагоприятного прогноза течения заболевания.

Значимое место в развитии опухоли и её распространении занимают металлопротеиназы – ферменты, разрушающие экстрацеллюлярный матрикс, индуцирующие процессы неоангиогенеза (Кондакова И.В. и др., 2011; Савенкова О.В. и др., 2011). Изучение этих маркеров является перспективным для определения прогноза течения злокачественных образований, в том числе при МХ. В последние годы доказано, что пролиферативная активность опухоли является одной из наиболее важных характеристик ее фенотипа, в значительной степени определяющей скорость роста опухоли, способность его к метастазированию, к ответу на лечебные мероприятия и, в конечном итоге, исход онкологического заболевания (Чернышова А.С. и др., 2010; Bergers et al., 1999; Matrisian L.M. et al., 1999). Существуют данные об

исследованиях содержания ММР-9 при различных онкологических процессах, таких как плоскоклеточные карциномы головы и шеи, рак гортани, рак мочевого пузыря, рак толстой кишки, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак легкого и т.д. (Клишо Е.В. и др., 2005; Андреева Ю.Ю., 2009; Зенюков А.С. и др., 2010; Шилова О.Ю. и др., 2010; Старостина М.А. и др., 2011; Колбанов К.И. и др., 2013; Кушлинский Н.Е. и др., 2014). Однако, до сих пор остаются не изучены особенности концентрации и клинко-патогенетическая значимость ММР-9 при меланоме хориоидеи. Исследования в этой области необходимы как для возможности определения готовности к метастазированию, так и для определения агрессивности злокачественного процесса.

По данным литературы известно, что рост всех солидных опухолей зависит от неоангиогенеза. Экспериментально доказано, что новообразование при прекращении кровоснабжения останавливается в росте и может даже редуцироваться. Так же есть данные о том, что вертикальный рост опухоли зависит от ангиогенеза и что последний индуцируется самими опухолевыми клетками. Учитывая эти данные, несомненный интерес представляло изучение процессов пролиферации злокачественной опухоли собственно сосудистой оболочки глаза. Для определения активности пролиферативных процессов внутриглазной опухоли исследовано содержание ММР-9 в слёзной и внутриглазной жидкостях у пациентов с меланомой хориоидеи.

Известно, что матриксная металлопротеиназа-9 - представитель семейства внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать белки внеклеточного матрикса и участвующих в процессах пролиферации, апоптозе и регуляции синтеза цитокинов. Учитывая возможные воздействия ММР-9, проведённое исследование показало, что немаловажную роль в патогенезе развития и роста меланомы хориоидеи играют выраженные пролиферативные процессы. Это подтверждается достоверным повышенным содержанием, более чем в 3 раза, ММР-9 в слёзной жидкости, как глаза с МХ (1,62 [1,42; 1,77] нг/мл), так и парного «здорового» глаза (1,64 [1,41; 1,78] нг/мл) в сравнении с соответствующими значениями СЖ контрольной группы (0,5 [0,45; 0,54] нг/мл), $p < 0,01$ (рис.6). При этом была обнаружена прямая положительная связь между концентрацией ММР-9 в слёзной жидкости поражённого и здорового глаз у пациентов с МХ (коэффициент регрессии (95% ДИ) 0,96 (0,88; 1,05), $p < 0,05$, коэффициент корреляции (95% ДИ) 0,97 (0,94; 0,98), $p < 0,05$).

Также достоверно было повышено содержание ММР-9 во внутриглазной жидкости глаза поражённого опухолью (1,65 [1,62; 1,8] нг/мл), в сравнении с соответствующими показателями СЖ контрольной группы (0,5 [0,45; 0,54] нг/мл), $p < 0,01$. При этом была установлена статистически значимая прямая линейная положительная связь между содержанием ММР-9 в слёзной и внутриглазной жидкостях поражённого опухолью глаза.

Зависимости концентрации ММР-9 в слёзной жидкости от локализации и стадии меланомы хориоидеи, а так же от пола и возраста пациентов обнаружено не было.

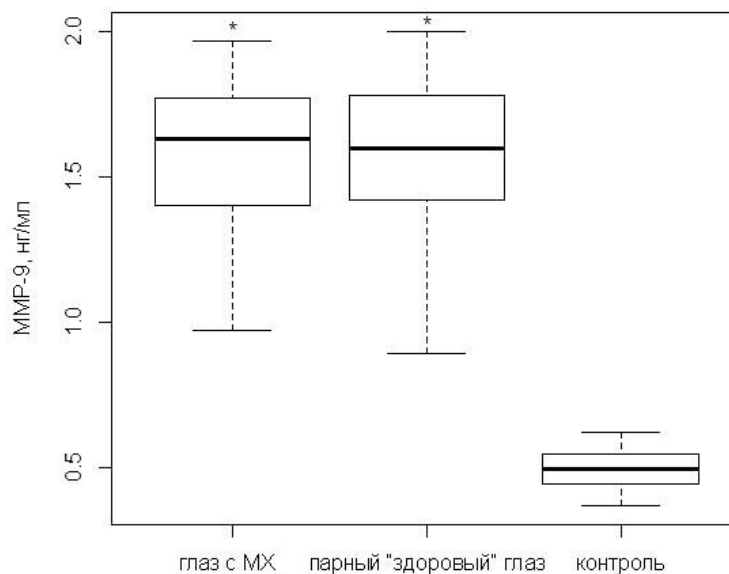


Рисунок 6 - Содержание MMP-9 (нг/мл) в слёзной жидкости обследованных групп; * $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

В результате проведённого исследования было установлено, что в патогенезе меланомы хориоидеи играет важную роль выраженные процессы клеточной деструкции, что подтверждалось достоверным повышением уровня ААТ к Аг нДНК в слёзной жидкости, как глаза с меланомой хориоидеи (1,56 [1,54; 1,75] усл. ед.), так и парного «здорового» глаза (1,56 [1,52; 1,69] усл. ед.), $p < 0,01$ (рис.7), а также статистически значимым увеличением содержания ААТ к Аг нДНК во внутриглазной жидкости глаза поражённого опухолью, в сравнении с соответствующим показателем слёзной жидкости контрольной группы (0,47 [0,45; 0,48] усл. ед.), $p < 0,01$.

Выявлена прямая положительная связь между уровнем ААТ к Аг нДНК в слёзной жидкости поражённого и «здорового» глаз у пациентов с меланомой хориоидеи (коэффициент регрессии (95% ДИ) 0,65 (0,42; 0,89), $p < 0,05$, коэффициент корреляции (95% ДИ) 0,69 (0,50; 0,83), $p < 0,05$), а также установлена статистически значимая прямая линейная положительная связь между содержанием ААТ к Аг нДНК в слёзной и внутриглазной жидкостях поражённого опухолью глаза.

Достоверное повышение уровня ААТ к Аг нДНК в поражённом глазу у пациентов с МХ возможно свидетельствует о выраженных иммунных реакциях и деструктивных процессах, связанных с развитием опухолевого процесса. Повышение уровня ААТ к Аг нДНК в «здоровом» парном глазу может быть связано с защитными иммунными реакциями организма от возникновения двустороннего опухолевого процесса.

Уровень ААТ к Аг нДНК в слёзной жидкости на всех стадиях (при стадии Т1 составила 1,53 (1,49; 1,6) усл. ед., при стадии Т2 1,55 (1,55; 1,85) усл. ед., при стадии Т3 1,56 (1,55; 1,65) усл. ед., при стадии Т4 1,57 (1,56; 1,75) усл. ед.) развития опухоли был достоверно выше значений контрольной группы (0,47 [0,45; 0,48] усл. ед.), $p < 0,01$.

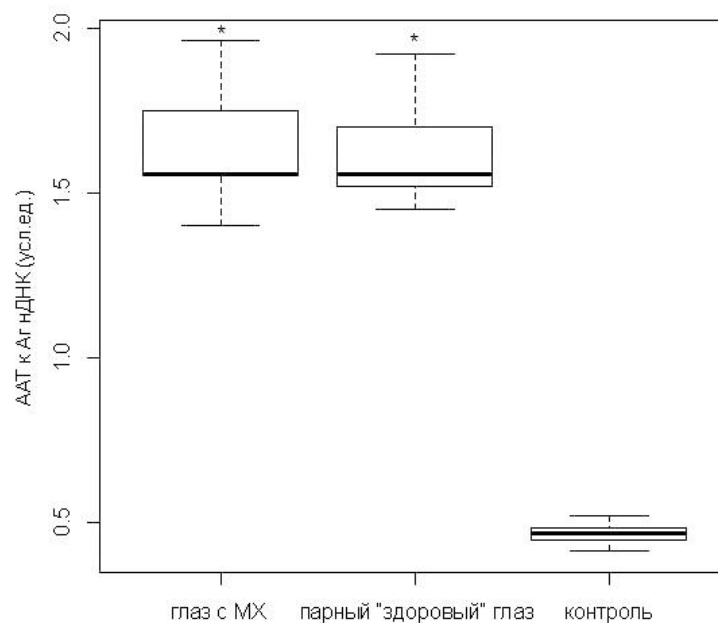


Рисунок 7 - Уровень ААТ к Аг нДНК (усл. ед.) в слёзной жидкости обследованных групп; * $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Содержание ААТ к Аг нДНК в слёзной жидкости поражённого органа при всех локализациях меланомы хориоидеи (при экваториальной составило 1,57 (1,55;1,76) усл.ед., при постэкваториальной - 1,55 (1,47; 1,67) усл.ед. и обширной локализации процесса - 1,57 (1,55; 1,59) усл. ед.) достоверно превышало значения контрольной группы (0,47 [0,45;0,48] усл.ед., $p < 0,01$). Вышеизложенные данные дают представление об относительной равной распределенной активности процессов клеточной деструкции вне зависимости от размера и агрессивности роста, а также локализации меланомы хориоидеи.

Учитывая результаты статистического анализа содержания ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ММР-9, ААТ к Аг нДНК в слёзной жидкости поражённого опухолью глаза и парного «здорового» глаза, которые выявили однотипные изменения изучаемых показателей в слёзной жидкости «здорового» глаза относительно соответствующих значений группы контроля, можно предположить о проявлении системного характера заболевания.

При проведении статистического анализа взаимозависимости концентраций изучаемых показателей в слёзной и внутриглазной жидкостях пациентов с диагнозом меланомы хориоидеи была определена достоверная прямая линейная положительная связь концентраций про- и противовоспалительных цитокинов, маркера деструктивных процессов и иммунных реакций, процессов пролиферации в ВГЖ глаза с МХ и концентраций идентичных показателей в СЖ глаза поражённого опухолью. Таким образом, слёзная жидкость может быть использована для изучения процессов воспаления, пролиферации, клеточной деструкции и иммунных нарушений внутри глазного яблока. Главное преимущество данного метода исследования это неинвазивность и практически отсутствие противопоказаний и осложнений.

Опухолевый процесс, происходящий внутри глазного яблока, вероятно, нарушает гематоофтальмический барьер, развитие локальных иммунопатологических реакций обеспечивается с помощью «иммунокомпетентных» зон собственного глаза, инфильтрирующим его клетками или гуморальными факторами. При этом в развитии и прогрессировании меланомы хориоидеи принимают участие различные иммунометаболические факторы: про- (ИЛ-6, ИЛ-8) и противовоспалительные цитокины (ИЛ-4, ИЛ-10), матриксная металлопротеиназа-9 и процессы клеточной деструкции, маркером которых выступает повышенный уровень аутоантител к антигенам нативной ДНК (рис. 8).

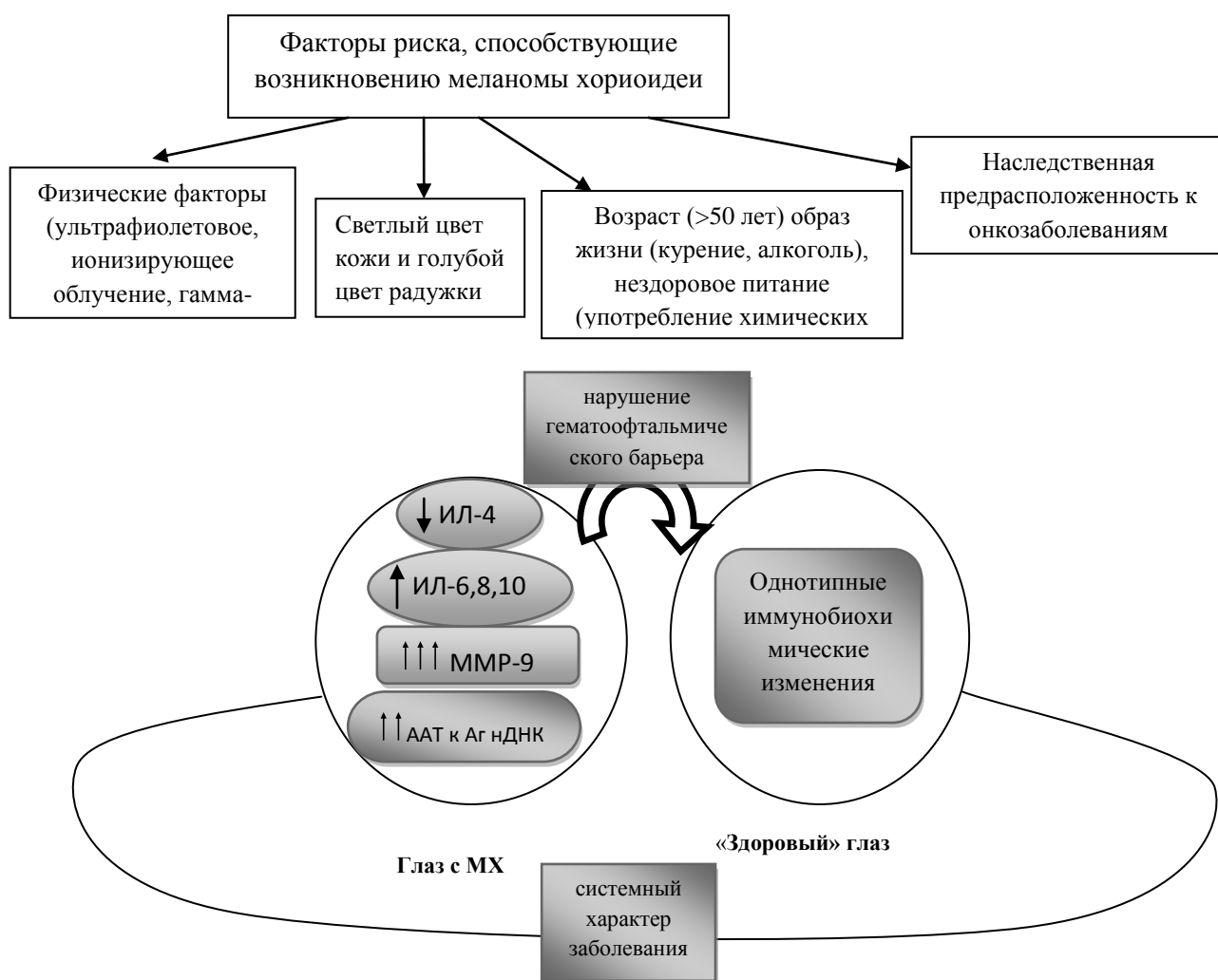


Рисунок 8 – Схема патогенеза МХ (белый цвет фигур – литературные данные; серый цвет фигур - полученные результаты в исследовании).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование показало, что развитие и рост меланомы хориоидеи сопровождается высокой активностью локального воспаления, что подтверждается высокими концентрациями ИЛ-6, ИЛ-8 и низкими концентрациями ИЛ-4 в слезной и внутриглазной жидкостях. На всех стадиях опухолевого роста меланома хориоидеи характеризуется высоким

уровнем пролиферативных процессов и выраженной активностью клеточной деструкции на локальном уровне, проявляющееся в исследуемых биологических жидкостях высокими концентрациями ММР-9 и высоким уровнем ААТ к Аг нДНК соответственно. Во время исследования в слёзной, внутриглазной жидкостях глаза с меланомой хориоидеи и слёзной жидкости парного «здорового» глаза обнаружены однотипные иммунобиохимические изменения, что доказывают нарушение целостности гематофтальмического барьера. Учитывая результаты исследования, имеет место перспектива дальнейшего изучения маркёров различных патологических процессов в слёзной и внутриглазной жидкостях, как при опухолевом поражении, так и при других глазных заболеваниях. Полученные данные исследования доказали, что забор и исследование слёзной жидкости может быть использован как один из менее инвазивных методов для изучения процессов воспаления, пролиферации, клеточной деструкции и иммунных нарушений внутри глазного яблока.

ВЫВОДЫ

1. Развитие и рост меланомы хориоидеи сопровождается активностью местного воспалительного процесса, что подтверждается высокими концентрациями провоспалительных цитокинов – ИЛ-6, ИЛ-8 на фоне низких концентраций противовоспалительного цитокина – ИЛ-4.

2. Выявлена прямая достоверная взаимосвязь между содержанием ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ММР-9, ААТ к Аг к нДНК в слёзной и внутриглазной жидкостях поражённого глаза у пациентов с меланомой хориоидеи, что свидетельствует о нарушении гематофтальмического барьера при развитии опухолевого процесса.

3. Для всех стадий развития меланомы хориоидеи характерно повышение продукции ИЛ-6 в слёзной жидкости, более выраженное на ранних (Т1-Т2) этапах развития патологического процесса, что указывает на активность воспалительного процесса и опухолевой прогрессии на начальных стадиях формирования меланомы хориоидеи.

4. Усиление выработки ИЛ-10 на ранних этапах развития меланомы хориоидеи выступает фактором противоопухолевой защиты, а на поздних стадиях - свидетельствует о выраженности локальной иммуносупрессии индуцированной опухолевым ростом.

5. В патогенезе меланомы хориоидеи вне зависимости от стадии и локализации процесса играют важную роль пролиферативные процессы, выраженные процессы клеточной деструкции, что подтверждается высокими уровнями ММР-9 и ААТ к Аг нДНК соответственно.

6. Развитие меланомы хориоидеи вызывает иммунобиохимические сдвиги в слёзной жидкости не только поражённого органа, но и парного «здорового» глаза, что свидетельствует о переходе патологического процесса на системный уровень.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Чернявская, М.А.** Особенности продукции интерлейкина-8 у пациентов с меланомой хориоидеи / М.А. Чернявская, А.В. Ефремов, В.В. Черных, М.Г. Пустоветова [Электронный ресурс] // Медицина и образование в Сибири. – 2014. – №4. – Режим доступа: http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1476.

2. **Чернявская, М.А.** Содержание маркеров воспалительного процесса ИЛ-4 и ИЛ-6 в слезной жидкости больных с меланомой хориоидеи / М.А. Чернявская, А.В. Ефремов, В.В. Черных [Электронный ресурс] // Медицина и образование в Сибири. – 2014. – №5. – Режим доступа: <http://ngmu.ru/cozo/mos/article/abauthors.php?id=1543>.

3. **Чернявская, М.А.** Особенности содержания интерлейкина-10 на локальном уровне у пациентов с меланомой хориоидеи / М.А. Чернявская, А.В. Ефремов, В.В. Черных // Вестник ОГУ. – 2014. – №12 (173). – С. 338-341.

4. **Чернявская, М.А.** Процессы клеточной деструкции и аутоиммунных реакций в слезной жидкости при меланоме хориоидеи / М.А. Чернявская, А.В. Ефремов, В.В. Черных [Электронный ресурс] // Медицина и образование в Сибири. – 2014. – №6. – Режим доступа: http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1612.

5. **Chernyavskaya, M.A.** Inflammatory process in lacrimal and intraocular liquids in patients with choroidal melanoma / M.A. Chernyavskaya, V. V. Chernych, A.V. Efremov, V.V. Atamanov // The 47th Ophthalmic Oncology Group. – 2014. – P. 27.

6. **Чернявская, М.А.** Особенности локального воспаления у пациентов с меланомой хориоидеи / М.А. Чернявская, А.Н. Трунов, В.В. Черных // Актуальные проблемы офтальмологии: IX Всерос. науч. конф. молодых ученых: Сб. науч. работ – М., 2014. – С. 166-168.

7. **Чернявская, М.А.** Особенности пролиферативных процессов, активности клеточной деструкции и иммунных реакций у пациентов с меланомой хориоидеи / М.А. Чернявская, А.Н. Трунов, В.В. Черных // Актуальные проблемы офтальмологии: IX Всерос. науч. конф. молодых ученых: Сб. науч. работ – М., 2014. – С. 254-256.

8. **Чернявская, М.А.** Взаимосвязь между содержанием цитокинов в слезной и внутриглазной жидкостях при меланоме хориоидеи / М.А. Чернявская, А.Н. Трунов, В.В. Черных // Современные технологии диагностики и лечения заболеваний органа зрения: Юбилейная науч. конф.: Сб. науч. работ – Томск, 2014. – С. 92-94.

9. **Чернявская, М.А.** Взаимосвязь цитокинов в слезной и внутриглазной жидкости при меланоме хориоидеи / М.А. Чернявская, А.В. Ефремов, В.В. Черных // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. – 2015. – Т. 20. – № 3. – С. 710-712.

10. **Чернявская, М.А.** Содержание матриксной металлопротеиназы-9 в слезной и внутриглазной жидкости при меланоме хориоидеи / М.А. Чернявская,

А.В. Ефремов, В.В. Черных, М.Г. Пустоветова // Сибирский научный медицинский журнал. – 2015. – Т. 35. – № 3. – С. 16-20.

11. **Chernyavskaya, M.** Inflammation, immune disorders and cell destruction at the local level in patients with choroidal melanoma / M. Chernyavskaya, V. Chernych, A. Efremov, V. Atamanov // European Journal of Cancer Supplements. – 2015. – Т. 13. – №. 1. – P. 11.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ААГ к Аг нДНК – аутоантитела к антигенам нативной дезоксирибонуклеиновой кислоты

АГ – антиген

АТ – антитело

ВГЖ – внутриглазная жидкость

ДИ – доверительный интервал

ИЛ-1 β , 2, 4, 6, 8, 10 – интерлейкин-1 бета, 2, 4, 6, 8, 10

ИФН- α , β , γ – интерферон альфа, бета, гамма

МХ – меланома хориоидеи

НК – нормальные киллерные клетки

СЖ – слезная жидкость

УМ – увеальная меланома

ФНО- α – фактор некроза опухоли-альфа

ММР-9 – металлопротеиназа-9