

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**

**ONKOLOGIJOS INSTITUTAS**

Viktoras Sidorovas

**ODOS MELANOMOS PROGNOZINIŲ IR PREDIKTYVINIŲ  
FAKTORIŲ TYRIMAS**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (07 B)

Vilnius, 2009

Disertacija rengta 2004 – 2008 metais Vilniaus universiteto  
Onkologijos institute

Mokslinis vadovas:

med. dr. Dainius Characiejus (Vilniaus universiteto Onkologijos  
institutas, Vilniaus universiteto Imunologijos institutas, biomedicinos mokslai,  
medicina-07 B)

## **TURINYS**

### **1. Įvadas**

1.1 Darbo tikslas

1.2 Darbo uždaviniai

1.3 Ginamieji teiginiai

### **2. Teorinės darbo prielaidos (literatūros apžvalga)**

2.1 Odos melanoma – trumpi epidemiologiniai duomenys ir šiuolaikinė klasifikacija

2.2 Melanosos prognozinių faktorių apžvalga

2.3 Melanosos gydymas

### **3. Metodai**

3.1 Imunohistocheminiai metodai

3.2 Imunologiniai metodai

3.3 Statistiniai metodai

### **4. Rezultatai**

4.1 Tiriamų pacientų ir kontrolinės žmonių grupės charakteristikos

4.2 Tiriamų pacientų išgyvenimo analizė

4.3 Melanoma sergančių pacientų imunologinių rodiklių ypatumai

4.4 Melanoma sergančių pacientų naviko proliferacijos ir imunologinių rodiklių sąsajos

**5. Rezultatų aptarimas**

**6. Išvados**

**7. Praktinės rekomendacijos**

**8. Publikacijos**

**9. Pranešimai**

**10. Literatūra**

## **Tekste vartojamų trumpinių sąrašas**

n – absoliutus tiriamųjų skaičius

p – statistinio rezultatų reikšmingumo lygmuo

IFN- $\alpha$  – alfa interferonas

AJCC – angl. *American Joint Committee on Cancer*, JAV Jungtinis vėžio komitetas

NK – natūralūs kileriai

LDH – laktato dehidrogenazė

MIA - melanomos aktyvumo slopiklis

MLSN-1 - melastatinas

MMP - angl. *matrix metalloproteinase*, tarpląstelinio užpildo metalo peptidazė

VEGF - angl. *vascular endothelial growth factor*, kraujagyslių endotelio augimo veiksnys

IL-2 - interleukinas 2

TRPM - angl. *transient receptor potential cation channel, subfamily M*, laikinojo receptoriaus potencialo katijonu kanalas, M šeima

VUOI - Vilniaus Universiteto Onkologijos Institutas

VPC – Valstybinis patologijos centras

CDK - nuo ciklino priklausoma kinazė

RNR - ribonukleino rūgštis

HLA – angl. *Human leucocyte antigens*, žmogaus leukocitų antigenai

Treg - T reguliaciniai limfocitai

CD - angl. *cluster of differentiation*, leukocitų diferenciacijos antigenai

CD25 - angl. *IL-2Ra – interleukin-2  $\alpha$ -chain receptor*, interleukino 2 receptorių

GITR - angl. *glucocorticoid-induced TNF receptor*, gliukokortikoidų indukuotas TNF receptorių

CTLA-4 - angl. *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*, citotoksinio T efektorinio limfocito Antigenas 4

FoxP3 - angl. *forkhead/winged-helix transcription factor P3*, *forkhead/winged-helix* transkripcijos faktorių P3

MAK - monokloniniai antikūnai

GM-CSF - granulocitinis-makrofaginis kolonstimuliuojantis faktorių

GMK - Gangliozidinės vakcinos

## 1. ĮVADAS

Sergantiems melanoma pacientams, kuriems buvo pašalintos metastazės sritiniuose limfmazgiuose, adjuvantinis gydymas alfa interferonu (IFN- $\alpha$ ) prailgina laikotarpį iki ligos progresavimo pradžios, o duomenys apie bendrojo išgyvenimo pailgėjimą yra prieštaringi (1). 10 metų išgyvena 33-88% neišplitusia melanoma (I-II ligos stadija) sergančių pacientų, todėl šiems pacientams aktualus adjuvantinio gydymo klausimas (2,3). Pirmųjų tyrimų rezultatai parodė, kad adjuvantinė imunoterapija gali pailginti tokių pacientų laiką iki ligos progresavimo pradžios ir išgyvenimo trukmę, bet kitų autorių tyrimai šių rezultatų nepatvirtino (1,4,5,6).

IFN- $\alpha$  gydomų pacientų išgyvenimo trukmė gali priklausyti nuo prognozinių veiksnių. Vienas iš galimų prognozinių veiksnių yra naviko proliferacijos žymuo Ki-67. Ki-67 – tai ląstelės branduolio baltymas, aptinkamas visose ląstelės ciklo fazėse, išskyrus G0, ir rodantis naviko proliferacinį aktyvumą bei naviko augimo frakcijos dydį (7). Naviko augimo frakcijos (aktyviai proliferuojančių navikinių ląstelių dalis visoje ląstelių populiacijoje) dydis siejamas su daugelio lokalizacijų onkologinės ligos prognoze, todėl tikėtina, kad šis rodiklis svarbus ir melanomos atveju (8,9). Yra nurodomas ryšys tarp Ki-67 rodiklio ir greitesnio ligos progresavimo esant didelei melanomos pirminio naviko infiltracijai (10).

Melanoma yra laikoma nuo imuninės sistemos priklausomu piktybiniu naviku. Rizika susirgti šiuo piktybiniu naviku padidėja, kai imuninė sistema yra susilpnėjusi, o gydoma melanoma taikant imunoterapiją (citokinus). Nors imunologinių tyrimų melanoma sergantiems pacientams atlikta daug, tačiau nėra nustatyta neabejotinų imunologinių faktorių, nuo kurių priklauso ligos eiga ir imunoterapijos efektyvumas.

### **1.1 Darbo tikslas**

Ištirti naviko proliferacijos žymens Ki-67 prognozinę ir prediktyvinę reikšmę bei T limfocitų subpopuliacijų pokyčius esant neišplitusiai melanomai.

### **1.2 Darbo uždaviniai**

1. Ištirti melanomos pirminio naviko augimo frakcijos (Ki-67) reikšmę ligonių išgyvenimo trukmei ir gydymo IFN- $\alpha$  veiksmingumui, kai naviko storis  $\geq 1,5$  mm.

2. Ištirti periferinio kraujo T limfocitų subpopuliacijų pokyčius esant neišplitusiai melanomai.

3. Ištirti melanomos pirminio naviko augimo frakcijos Ki-67 ryšį su periferinio kraujo T limfocitų subpopuliacijomis.

### **1.3 Ginamieji teiginiai**

1. Ki-67 neturi prognozinės vertės išgyvenimo trukmei pacientų, sergančių neišplitusia melanoma, kai naviko storis yra didesnis negu 1,5 mm.

2. Neindividualizuotas neišplitusios melanomos gydymas IFN- $\alpha$  nepailgina pacientų išgyvenimo trukmės.

3. Gydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų išgyvenimo trukmė priklauso nuo Ki-67 reikšmės.

4. Sergant neišplitusia melanoma, T limfocitų subpopuliacijų kiekiai periferiniame kraujyje yra pakitę.



## **2. TEORINĖS DARBO PRIELAIIDOS (LITERATŪROS APŽVALGA)**

### **2.1 Odos melanoma – trumpi epidemiologiniai duomenys ir šiuolaikinė klasifikacija**

Pasaulyje kasmet užregistruojama apie 160 000 naujų melanomos atvejų (11). Melanoma pagal susirgimų dažnėjimą priskiriama prie greičiausiai dažnėjančių navikų – nuo 1950 iki 2000 metų padažnėjo 697% (12). Vėžio registro preliminariais duomenimis, 2007 metais Lietuvoje buvo nustatyta 263 melanomos atvejai. Vyrų ir moterų sergamumas 2007 metais Lietuvoje buvo atitinkamai 5,6 ir 9,7/ 100000 gyventojų. Palyginti su ankstesniais metais, sergamumas turi tendenciją didėti ir 1995 metais buvo 4,5/100000 gyventojų, o 2005 buvo nustatyta 7,0/100000 gyventojų. Dažniausiai buvo nustatoma III ligos stadija, ir ji sudarė 33% visų atvejų, o moterims dažniausiai buvo nustatyta I ligos stadija, ir ji sudarė 35,4% visų atvejų. Vyrų ir moterų mirtingumas 2005 metais Lietuvoje buvo atitinkamai 2,9 ir 3,0/100000 gyventojų. Palyginti su ankstesniais metais, mirtingumas turi tendenciją didėti ir 1995 metais jis buvo 1,6/100000 gyventojų, o 2005 buvo nustatyta 2,9/100000 gyventojų (13).

Šiuolaikinė melanomos TNM klasifikacija patvirtinta 2002 metais AJCC. T - tai pirminio naviko storis (matuojamas milimetrais nuo grūdėtojo ląstelių sluoksnio iki giliausios melanomos ląstelės) ir naviko išopėjimas. Clarko infiltracijos lygis yra svarbus esant T1 reikšmei. N - tai metastazės sritiniuose limfmazgiuose ir pažeistų limfmazgių kiekis. M - tai tolimosios metastazės ir jų vieta bei serumo laktato dehidrogenazės (LDH) koncentracija. Ištyrus pacientą objektyviai, t. y. atlikus radiologinius ir laboratorinius tyrimus, I ir II klinikinė stadija diagnozuojama, kai nenustatoma metastazių sritiniuose limfmazgiuose ir tolimųjų metastazių. III stadija diagnozuojama, kai randama

metastazių sritiniuose limfmazgiuose. IV stadija nustatoma, kai aptinkama tolimųjų metastazių. Melnomos TNM klasifikacija parodyta 1 lentelėje.

**1 lentelė. Melnomos TNM klasifikacija (2002 m., AJCC) (2,3)**

TNM	Aprašymas	Stadija	TNM klasifikacija
<b>T</b>			
<b>Tis</b>	nėra invazijos į dermą (I lygis pagal Clarką)	0	Tis 0 0
<b>1a</b>	≤1,00 mm, nėra išopėjimo	IA	1a 0 0
<b>1b</b>	≤1,00 mm, yra išopėjimas arba IV/V lygio Clarko infiltracija	IB	1b 0 0
<b>2a</b>	1.01-2,00 mm, nėra išopėjimo	IB	2a 0 0
<b>2b</b>	1.01-2,00 mm, yra išopėjimas	IIA	2b 0 0
<b>3a</b>	2,01-4,00 mm, nėra išopėjimo	IIA	3a 0 0
<b>3b</b>	2,01-4,00 mm, yra išopėjimas	IIB	3b 0 0
<b>4a</b>	>4,00 mm, nėra išopėjimo	IIB	4a 0 0
<b>4b</b>	>4,00 mm, yra išopėjimas	IIC	4b 0 0
<b>N</b>		IIIA	1-4a 1a 0
<b>1a</b>	1 limfmazgis, mikrometastazė	IIIA	1-4a 2a 0
<b>1b</b>	1 limfmazgis, makrometastazė	IIIB	1-4b 1a 0
<b>2a</b>	2-3 limfmazgiai, mikrometastazės	IIIA	1-4b 2a 0
<b>2b</b>	2-3 limfmazgiai, makrometastazės	IIIB	1-4b 1b 0
<b>2c</b>	<i>In-transit</i> arba <i>satellite</i> metastazės	IIIB	1-4b 2b 0
<b>3</b>	≥4 metastazinių limfmazgių arba limfmazgių konglomeratas, arba derinys <i>in-transit ir satellite</i> metastazių, arba išopėjusi melanoma esant metastazių limfmazgiuose	IIIC	1-4b 1b 0 1-4b 2b 0 bet koks T 3 0
<b>M</b>		IV	Bet koks TN M
<b>M1a</b>	Tolimosios odos, poodžio arba limfmazgių metastazės, normą atitinkantis LDH kiekis	IV	Bet koks TN 1a
<b>M1b</b>	Metastazės plaučiuose, normą atitinkantis LDH kiekis	IV	Bet koks TN 1b
<b>M1c</b>	Visceralinės metastazės ir normą atitinkantis LDH kiekis arba bet kokia tolimoji metastazė ir padidėjęs LDH kiekis	IV	Bet koks TN 1c

*Mikrometastazės diagnozuojamos pašalinus sarginį limfmazgį arba visiškai pašalinus limfmazgius,; makrometastazės apibūdinamos kaip kliniškai aptinkamos mazginės metastazės. Makrometastazės patvirtinamos po limfonodektomijos.*

Remiantis šiuolaikine melanomos TNM klasifikacija, palyginti su ankstesniu jos variantu, tiksliau apibūdinama pirminio naviko, sritinių ir tolimųjų metastazių būklė. Tai padeda tiksliau įvertinti klinikinę ligos stadiją ir prognozuoti ligonio išgyvenimo trukmę.

Klinikoje dažnai naudojama patologoanatominė klasifikacija. Pagal ją dažniausiai išskiriamos šios melanomos formos:

Plintanti paviršiumi – sudaro 70% visų melanomų, pasižymi horizontaliu augimu ir geresne išgyvenimo prognoze.

Mazginė – sudaro 15-20% visų melanomų, pasižymi vertikaliu augimu ir blogesne išgyvenimo prognoze.

Akralinė (galūnių) – retesnė melanomos forma, pasitaiko apie 5-10% atveju, atsiranda pirštų galų, plaštakų odoje, yra ponaginė forma.

*Lentigo maligna* - dažnesnė moterims, būdingas horizontalus, lėtas augimas, dažniau pasitaiko veido odoje, pasižymi gera prognoze.

Kitos - amelanocitinė melanoma, gleivinių melanoma, desmoplastinė melanoma ir kitos retos formos.

Taip pat reikia pažymėti, kad pasitaiko ir vidaus organų bei akies melanoma.

## 2.2 Melanomos prognoziųjų faktorių apžvalga

Melanoma sergančių pacientų išgyvenimo trukmės prognozinis rodiklis, kuris nustatomas per pirmąjį paciento ištyrimą, yra ligos stadija (17). Pacientų išgyvenimo trukmės priklausomybė nuo ligos stadijos parodyta 2 lentelėje.

**2 lentelė.** Melanomos stadija ir išgyvenimo trukmė (pagal 2002 m. AJCC klasifikaciją) (2,3)

Stadija	TNM	5 metų išgyvenamumas(%)	10 metų išgyvenamumas(%)
IA	1a 0 0	95,3	87,9
IB	1b 0 0	90,9	83,1
IB	2a 0 0	89,0	79,2
IIA	2b 0 0	77,4	64,4
IIA	3a 0 0	78,7	64,4
IIB	3b 0 0	63,0	50,8
IIB	4a 0 0	67,4	53,9
IIC	4b 0 0	45,1	32,3
IIIA	1-4a 1a 0	69,5	63,0
IIIA	1-4a 2a 0	63,3	56,9
IIIB	1-4b 1a 0	52,8	37,8
IIIA	1-4b 2a 0	49,6	35,9
IIIB	1-4b 1b 0	59,0	47,7
IIIB	1-4b 2b 0	46,3	39,2
IIIC	1-4b 1b 0	29,0	24,4
	1-4b 2b 0	24,0	15,0
	bet koks T 3 0	26,7	18,4
IV	(Bet koks TN) M	14,3	7,1
IV	(Bet koks TN) 1a	18,8	15,7
IV	(Bet koks TN) 1b	6,7	2,5
IV	(Bet koks TN) 1c	9,5	6,0

Ši stadijų sistema, naudojama skirtingose melanomos duomenų bazėse, parodo koreliaciją tarp didėjančios stadijos ir mažėjančios išgyvenimo trukmės esant padidėjusiam skirtumui tarp subkategorijų (14,15,16) ir palengvina suskirstyti pacientus į panašios prognozės grupes klinikinių tyrimų metu. Bet

tokioje melanomos klasifikacijoje fiksuojami tik dideli histopatologiniai ir klinikiniai pokyčiai, kuriais remiantis neįmanoma išsamiai apibūdinti ligos prognozės ir paskirti individualizuoto gydymo. Taigi svarbūs tolesni prognozinių ir prediktyvinių žymenų tyrimai.

### 2.2.1 Klinikiniai ir histopatologiniai žymenys

Klinikiniai ir histopatologiniai žymenys turi reikšmės nustatant ligos prognozę. Iš histopatologinių rodiklių ypač svarbus yra naviko storis, kuris matuojamas milimetrais nuo *stratum granulosum* iki giliausio naviko invazijos taško. 1970 m. Breslow iškėlė ligos prognozės priklausomybės nuo naviko storio koncepciją, kuri iki šiol yra viena iš pagrindinių, vertinant melanomos prognozę (18). 1969 m. Clarko pasiūlyta klasifikacija, pagal kurią naviko infiltracija nustatoma remiantis anatomine odos sritimi:

I lygis – navikas išplitęs tik epidermyje ar epitelyje;

II lygis – navikas infiltravęs dalį spenelinio tikrosios odos sluoksnio;

III lygis – navikas „užpildęs“ visą spenelinį tikrosios odos sluoksnį ir jo ląstelės pasiekusios kraujagyslių rezginį, skiriantį spenelinį bei tinklinį tikrosios odos sluoksnius, bet už jo neišplinta;

IV lygis – navikas įsiskverbęs į tinklinį tikrosios odos sluoksnį;

V lygis – navikas išplitęs poodyje ir gilesniuose audiniuose.

Šiuolaikinėje melanomos TNM klasifikacijoje Clarko pasiūlyta klasifikacija naudojama tik apibūdinti T1 (naviko) vertę. P. Buttneris ir kiti ištyrė 5093 pacientus ir nustatė, kad, didėjant naviko storiui, trumpėja pacientų išgyvenimo trukmė, taip pat buvo nustatyta, kad TNM klasifikacijoje naudojant derinį tarp naviko storio pagal Breslow ir naviko invazijos pagal Clarką tiksliau nustatoma ligos prognozė (19). Ligos prognozei svarbus ir melanomos naviko augimo

tipas. Vertikalus naviko augimas sąlygoja trumpesnę išgyvenimo trukmę ir asocijuojasi su ankstyvu metastazavimu (20). Naviko išopėjimas turi prognozinės reikšmės, jeigu išopėjimo skersmuo yra ne mažesnis nei 3 mm, ir yra svarbus nustatant I, II ir III ligos stadiją, bet veiksniai, kurie sukelia šią būklę iki šiol nėra aiškūs (15). Pacientai, kuriems yra išopėjęs navikas, gyvena trumpiau nei pacientai, kuriems yra tokio pat storio, bet neišopėjęs navikas (17). Pirminio naviko regresija gali pabloginti ligos prognozę, ir yra duomenų, kad tai gali būti plonos, linkusios metastazuoti melanomos požymis (21,22,23), nors kiti autoriai nemano, kad regresija paaiškina ankstyvą plonos melanomos metastazavimą (24,25). Naviko limfocitinė infiltracija gali būti geras prognozinis požymis (26), bet kiti autoriai tai neigia (27,28). Naviko vaskuliarizacija asocijuojasi su greitesniu naviko metastazavimu ir sutrumpina išgyvenimo trukmę (29). Tokie rodikliai kaip amžius, lytis, naviko lokalizacija turi neabejotinos prognozinės reikšmės ir įvertinti daugelio tyrinėtojų (30,27,31,32,33,17). 5 ir 10 metų išgyvenamumas priklausomai nuo klinikinių ir histopatologinių rodiklių parodytas 2 lentelėje.

**2 lentelė. Klinikiniai ir histopatologiniai prognoziniai žymenys\* (34)**

<b>Žymenys/kategorijos</b>	<b>Išgyvenamumas 5-10 metų(%)</b>
<b>Klinikiniai variantai</b>	
<b>Amžius (m.)</b>	
10-19	81(10 m.)
20-29	77
30-39	77
40-49	75
50-59	69
60-69	63
70-79	56
≥80	43
<b>Lytis</b>	
Vyrai	57 (8 m.)
Moterys	83
<b>Anatominės sritys</b>	
Galūnės(rankos kojos)	87 (8 m.)
Krūtinės lasta, kaklas, galva	62
Volelio arba ponaginė forma	46

<b>Histologiniai variantai</b>	
<b>Melanomos augimo tipas</b>	
Radialus	100 (8 m.)
Vertikalus	71
<b>Plonos (<math>\leq 1</math> mm) melanomos</b>	
$\leq 1$	91 (10 m.)
1.01-2,0	78
2.01-4.0	62
$> 4.0$	38
<b>Invazijos lygis pagal Clarką</b>	
II	98 (10 m.)
III	92
IV	69
V	25
<b>Mitozinis aktyvumas (/mm<sup>2</sup>)</b>	
0	95 (8 m.)
$\leq 6$	79
$> 6$	38
<b>Išopėjimas</b>	
Nėra	82
Yra	44
<b>Limfocitų infiltracija</b>	
Difuzinė limfocitų infiltracija	55 (10 m.)
Fokusinė limfocitų infiltracija	45
Limfocitų infiltracijos nėra	27
<b>Regresija</b>	
Nėra	77 (8 m.)
Yra	60
<b>Plona (<math>\leq 1,5</math> mm) melanoma</b>	
Nėra	93 (5 m)
Yra	
<b>Kraujagyslių invazija</b>	
Nėra	54
yra	33
<b>Naviko vaskuliarizacija</b>	
Nėra (kraujagyslinis tinklas nepakitęs)	88
Nedidelė arba vidutinė (daugiau smulkių arba išsiplėtusių kraujagyslių)	75
Ryški (daugiau aiškiai matomų plačiai išsiplėtusių kraujagyslių)	58

<b>Naviko mikrosatelitas/ai</b>	
Nėra	65 (10 m.)
Yra	37
<b>Histologinė klasifikacija</b>	
Akralinė melanoma	75 (8 m.)
Radialiai plintanti melanoma	9
Morfologiniai melanomos ląstelių požymiai (fenotipas)	
Standartinė I ir II stadijos melanoma	75 (5 m.)
Desmoplastinė ir neuropropinė melanoma	90 (5 m.)

\* Pritaikyta iš Carlson et al.

Klinikiniai ir histopatologiniai žymenys padeda nustatyti ligos prognozę, tačiau šių žymenų nepakanka, kad galima būtų individualiai parinkti gydymą. Todėl tiriami naviko molekuliniai ir imuninės sistemos žymenys, kurie suteikia papildomos informacijos apie ligos ypatumus.

## 2.2.2 Su naviku susiję žymenys

### 2.2.2.1. Serumo žymenys

Tarp plačiausiai naudojamų serumo žymenų yra (LDH), S-100β ir melanomos aktyvumą slopinantis baltymas (MIA).

LDH – tai tirpus glikolizės fermentas, kuris randamas beveik visuose žmogaus organuose ir audiniuose, ypač jo daug raumenyse. Tai, kad LDH iš ląstelės patenka į kraujo serumą, parodo plazminės membranos trūkumą ir yra nekrozės žymuo. LDH koncentracijos padidėjimas serume rodo ligos progresavimą. Kaisermanas atliko 30 pacientų, kuriems buvo uvealinė melanoma, analizę ir nustatė, kad LDH koncentracija buvo ties viršutine normos riba arba viršijo normą 80% pacientų, kuriems po 6 mėnesių ultragarsu arba KT buvo nustatytos metastazės kepenyse, nurodydamas, kad LDH nėra



specifinis žymuo kepenų metastazėms prognozuoti. Vis dėlto manoma, kad reikia fiksuoti ne tik patologinius LDH pakitimus, bet atkreipti dėmesį ir į LDH koncentraciją, kuri yra arti viršutinės normos (35).

MIA - tai baltymas, kuris randamas melanomos ląstelėse ir silpnina navikinių ląstelių ryšį su tarpląsteliniu užpildu (matriksu), taip didindamas invazinio augimo potencialą (36,37).

S-100 $\beta$  – tai kalcį surišantis baltymas, kuris randamas melanomos ląstelėse ir naudojamas melanomos imunohistocheminėje diagnostikoje, ypač amelanocitinei melanomai nustatyti (38,39). Kaip prognozinis rodiklis, S-100 $\beta$  yra jautresnis ir specifiškesnis nei MIA (40,41).

Nors egzistuoja glaudus ryšys tarp serumo žymenų koncentracijos ir naviko masės, serumo žymenys nėra tinkami atrankinei patikrai ar pirminei melanomai nustatyti (42). Pacientų, kurie turi tolimųjų metastazių ir kurių serume yra padidėjusi LDH, S-100 $\beta$ , MIA koncentracija, išgyvenimo trukmė yra trumpesnė nei pacientų, kurių serumo žymenų koncentracija yra neperžengusi normos ribų (3,42,43,44,45). Vis dėlto serumo žymenys dabar turi tik ribotą prognozinę vertę naudoti klinikinėje praktikoje melanomos atveju.

#### 2.2.2.2. Molekuliniai melanomos žymenys

Dauguma **molekulinių žymenų** dar tebetiriami ir neturi praktinės reikšmės. Šiandien žinomi daugiau kaip 100 genų ir/arba baltymų, kurių pakitimų randama naviko ląstelėse. Kiekvienas navikas turi tiek bendrų, tiek ir unikalių pakitimų derinį. Nustatyti molekuliniai žymenys gali padėti spręsti apie naviko augimo greitį, invaziją į aplinkinius audinius ir kraujagysles, metastazavimą ir jautrumą gydymui. 2003 metais Carlsonas išskyrė daugiausia žadančius molekulinius žymenis: MLSN-1 (melastatinas), MMP, VEGF, p16INK4a/CDK2NA, Ki-67 (8). Toliau pateiktos šių žymenų savybės.

**Melastatinas** (MLSN-1) yra genas, kuris dar vadinamas melanomos supresijos genu, ir yra TRPM genų šeimos atstovas (46). Literatūros duomenimis, šis genas turi prognozinės reikšmės nustatant melanomos progresavimą – pacientai, praradę šį geną, gyvena trumpiau. Ištyrus 150 pacientų, sergančių melanoma, buvo pastebėta, kad iš I stadijos melanoma sergančių pacientų, neturinčių šio geno, 8 metus išgyveno  $77\% \pm 15\%$ , o iš II stadijos liga sergančių tokių pacientų 8 metus išgyveno  $51\% \pm 8\%$ . Nors MLSN-1 praradimas sąlygoja blogesnę prognozę, mes negalime teigti, kad šio geno praradimas būtinas, kad atsirastų melanomos metastazinis potencialas (47).

**MMP** - tai proteoliziniai fermentai, kuriuos išskiria melanomos ląstelės. Šie fermentai suskaido tarpląstelinį užpildą, ir tai yra pirmasis melanomos ląstelės invazijos į sveikus audinius žingsnis. Pavyzdžiui, manoma kad MMP-2 (želatinazė 2) didina melanomos ląstelės pajėgumą prasiskverbti pro bazinę membraną. Be to, šio fermento raiška koreliuoja su hematogeniniu metastazavimu ir pablogina 5 metų išgyvenimą vyrams (48,49,50). Vaisänenas ištyrė 29 uvealinės melanomos atvejus ir nustatė, kad MMP-2 turinčių pacientų 5 metų išgyvenimas statistiškai buvo blogesnis nei MMP-2 neturinčių pacientų (51). Tiriamųjų skaičius nėra didelis, todėl šių fermentų dar negalima naudoti praktikoje.

**VEGF** lemia fiziologinę (normalią) ir patologinę angiogenezę. Literatūroje pažymėta, kad VEGF koncentracija serume melanomos atveju yra didesnė negu gerybinių odos pigmentinių navikų atveju, ir šis rodiklis gali būti naudojamas atskirti melanocitinį apgamą nuo melanomos (52,53). Tačiau reikia pažymėti, kad VEGF nėra absoliutus malignizacijos indikatorius ir 20% melanomų nepasižymi VEGF raiška. 2001 metais Ugurel, ištyrusi 125 melanoma sergančius pacientus, padarė išvadą, kad VEGF žymuo turi prognozinės reikšmės numatant laiką iki progresavimo pradžios ir išgyvenimo trukmę. Tačiau tiriant VEGF prediktyvinę reikšmę terapijai (buvo skiriamas

gydymas IFN- $\alpha$ , citostatikai ir šių vaistų derinys), nebuvo nustatyta, kad VEGF gali būti naudojamas kaip prediktyvinis žymuo (54). Manoma, kad VEGF gali būti prediktyvinis žymuo gydant melanomą bevacizumabu (VEGFR antikūnas) (55), bet kadangi apie 20% melanomų padidėjusi VEGF raiška nėra būdinga, šio žymens negalima taikyti visiems melanoma sergantiems pacientams.

**p16 INK4a**, kaip navikus supresuojantis genas, atlieka esminį vaidmenį melanomai progresuojant (56,57). p16 INK4a slopina nuo ciklinų priklausančių kinazių CDK4 ir CDK6 aktyvumą ir stabdo ląstelių perėjimą iš ląstelių ciklo G1 fazės į S fazę (58,59,60). 25% šeimų, kuriose yra paveldėta melanoma, buvo mutacijų p16 INK4a gene (61). Straume ištyrė 202 melanomos atvejus ir nustatė, kad šio geno netekimas susijęs su greitesniu naviko progresavimu, blogesne išgyvenimo prognoze ir koreliuoja su didėjančia ląstelių proliferacija (Ki-67 indeksu) (62).

**Ki-67** yra navikinių ląstelių proliferacijos žymuo, ir iš ląstelės ciklo žymenų šitas rodiklis tiriamas daugiausia. Ki-67 yra ląstelės branduolyje esantis baltymas. Šis baltymas nustatomas visose ląstelės ciklo fazėse, išskyrus G0. Ki-67 žymuo rodo naviko augimo frakcijos dydį, t.y. naviko proliferacinį aktyvumą (7). Ki-67 naudojamas ir melanomos pirminio naviko diferencinėje diagnostikoje. Ki-67 rodikliui esant didesniai negu 5% greičiausiai bus nustatyta melanomos, o ne apgamo diagnozė (63,64,65,66). Naviko augimo frakcijos dydis siejamas su daugelio lokalizacijų piktybinių navikų progresavimu, taip pat šis rodiklis svarbus ir melanomos atveju (9,8). 2001 metais Ostmeieris ištyręs 399 pacientus nustatė, kad Ki-67 turi prognozinę reikšmę nustatant laiką iki progresavimo pradžios esant neišplitusiai melanomai. Geresnė prognozė buvo Ki-67 esant  $<75$  ląst./mm<sup>2</sup> (9). Yra duomenų apie Ki-67 rodiklio reikšmę plonai melanomai metastazuoti. Ištyręs 167 pacientus, sergančius melanoma, kai naviko storis buvo iki 1 mm, Frahmas su kitais tyrinėtojais nustatė, kad 4 pacientams iš 5, kurių Ki-67 rodiklis buvo didesnis kaip 25%, atsirado metastazių, ir šie pacientai neturėjo

kitų faktorių, predisponuojančių ankstyvą progresavimą (67). Kita vertus, Bani ištyrusi 34 pacientus, nerado koreliacijos tarp Ki-67 ir metastazavimų melanomos storiui esant iki 0,75 mm, bet naviko storiui esant >1,5 mm pacientams, kurių Ki-67 rodiklis – 12,3+/-7,7%, laikas iki progresavimo pradžios buvo trumpesnis (10). Pagal Carlsono 2003 metais paskelbtą analizę Ki-67 tiesiogiai koreliuoja su naviko metastazavimu ir pacientų išgyvenimo trukme, tačiau autorius nurodo, kad proliferacinio aktyvumo reikšmė priklauso nuo melanomos naviko storio ir, jam pasiekus 1,5-2,0 mm storį, Ki-67 praranda prognozinę vertę (8). Kaip matome, duomenys yra prieštaringi, todėl tikslingi tolesni tyrimai nustatant Ki-67 prognozinę reikšmę melanoma sergančių pacientų išgyvenimo trukmei.

Gydymas interferonu paremtas antiproliferaciniu veikimu, todėl iš visų išvardytų žymenų mes pasirinkome Ki-67, kuris tiesiogiai parodo naviko proliferacinį aktyvumą ir dažnai naudojamas kaip pagrindinis proliferacijos žymuo, su kurio aktyvumu lyginamas kitų žymenų informatyvumas.

### **2.2.3 Melanomos imunologija**

Idėja, kad imuninė sistema gali sunaikinti vėžines ląsteles ar kontroliuoti jų augimą, gimė daugiau negu prieš 120 metų. Įkvėptas antikūnų savybių pažinti infekcinius veiksnius ir vėžines ląsteles, Paulis Ehrlichas 1880 metais pasiūlė terminą “stebuklinga kulka”. 1890 metais Niujorko chirurgas Williamas Coley pastebėjo, kad kai kuriems vėžiu sergantiems jo pacientams navikai išnykdavo ar sumažėdavo po sisteminių infekcijų. Coley teigė, kad sisteminė infekcija gali nespecifiškai suaktyvinti imuninę sistemą, kuri kovoja prieš piktybinius navikus. Coley ruošė ekstraktus iš bakterijų, kurių sukeltos infekcijos buvo susijusios su navikų regresija, ir bandė šiais ekstraktais gydyti kitus vėžiu sergančius pacientus. Bakterijų ekstraktais, vadinamais Coley toksinai, kartais pavykdavo sukelti didelės masės navikų regresiją, ir tai tuo metu kėlė nemažą susidomėjimą. Deja, Coley toksinai pasižymėjo dideliu

toksiškumu, o jų priešnavikinio veikimo mechanizmas liko neaiškus. Dėl šių priežasčių plačiau vartoti Coley toksinus buvo atsisakyta. Beje, įdomu pažymėti, kad "Coley toksinų" terminas prigijo dėka Williama Coley oponento Jameso Ewingo (aprašiusio jo pavarde pavadintą Ewingo sarkomą), kuris manė, kad Williamas Coley per daug tikėjo bakterijų ekstraktų priešnavikiniu poveikiu ir per mažai dėmesio kreipė į šių ekstraktų toksiškumą. 1961 m. Kleinas pirmą kartą pademonstravo efektyvų priešnavikinį imunitetą, kuris buvo sukeltas *polyoma* virusų gyvuliams, imunizuotiems šiuo virusu. Šie tyrimai davė stiprų impulsą vystyti navikų imunologijai.

Melanoma, kaip ir kiti navikai, atsiranda ir vystosi organizme dėl įvairios kilmės genetinių sutrikimų: fizikinių, cheminių kancerogenų ar virusų sukeltų genų pakitimų, spontaninių genų mutacijų ląstelių dalijimosi metu. Kaip žinoma, šie pokyčiai turėtų sukelti tam tikrų baltymų, kurie nebūdingi normalioms ląstelėms, ekspresiją navikinių ląstelių paviršiuje. Tokie baltymai galėtų būti navikiniais antigenais, kuriuos, kaip svetimus, turėtų atpažinti ir sunaikinti imuninė sistema. Vėžys vystosi kaip sąveikos tarp transformuotų ląstelių ir jų mikroaplinkos rezultatas ir imuninė sistema nebūtinai turi būti nusilpusi. Dar 1940-1950m. Zilberis ir Goreris rado navike antigenų, kurių nebuvo normaliuose homologiniuose audiniuose. Paskutiniaisiais metais panaudojant šiuolaikinius tyrimo metodus (RT-PCR ir monokloniniai antikūnai) ir klonuotus citotoksinius T limfocitus pavyko daugiau suprasti apie santykius tarp melanomos naviko ir organizmo. Citotoksinių T limfocitų klonai, kurie yra specifiniai autologinėms navikinėms ląstelėms, buvo gauti iš melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo arba iš naviką infiltruojančių limfocitų (68). Šis metodas leido identifikuoti daugelį antigenų, kurių sąrašas nuolat didėja.

Identifikuoti antigenai padalyti į 5 grupes (69):

1. **Navikiniai-testis antigenai.** Molekuliniai tyrimai parodė, kad šios grupės antigenus koduojantys genai būdingi ir normalioms organizmo ląstelėms, tačiau suaugusio organizmo ląstelės jo neekspresuoja, išskyrus sėklidžių ir placentos ląsteles. Navikinėse ląstelėse šie genai suaktyvinami (70). MAGE-1 buvo pirmasis klonuotas su naviku susijęs žmogaus antigenas, išskirtas iš žmogaus, turinčio labai stiprų CD8+ T limfocitų aktyvumą prieš autologines melanomos ląsteles. MAGE-1 koduoja melanominį antigeną ir aptinkamas beveik 40% žmogaus melanomų, 20% krūties vėžio ir 30% plaučių smulkialąstelinio vėžio atveju. Navikinių-*testis* antigenų pagrindu yra kuriamos antinavikinės vakcinės. Nors tokie genai labiausiai ištirti iš visų su navikais susijusių genų ir su jais siejamos viltys sukurti efektyvias vėžio imunoterapijos strategijas, jų fiziologinės funkcijos nėra aiškios.

2. **Diferenciacijos antigenai.** Šie su navikais susiję antigenai būdingi normalaus audinio tam tikrų vystymosi stadijų ląstelėms ir diferencijuotose ląstelėse neekspresuojami. Juos gali ekspresuoti ir navikinės ląstelės, kurios išsivystė iš to audinio ląstelių. Daugiausia iš dabar žinomų šios klasės antigenų randama normaliuose melanocituose ir melanomų ląstelėse (tirozinaze, su tirozinaze susiję baltymai TRP-1/-2, MelanA/MART-1, gp100 ir gp75) (71).

3. **Antigenai - ląstelinio streso signalo perdavimo molekulės.** Šiuolaikiniai tyrimų rezultatai pateikia įrodymų ir apie žmogaus įgimto imuniteto ląstelių galimybes kai kuriais atvejais atskirti navikines ląsteles nuo normalių organizmo ląstelių. Šių tyrimų dėmesio centre – molekulės, kurios atlieka ląstelinio streso signalo perdavimo vaidmenį. Tai su I klasės HLA grandine susiję baltymai A ir B (MICA/B). MICA/B yra nespecifinės citolizines funkcijas aktyvinančio NKG2D receptoriaus ligandas. Šį receptorių turi natūralūs kileriai,  $\gamma/\delta$ T limfocitai ir dalis CD8+ T limfocitų. MIC baltymų ir NKG2D sąveika aktyvina nespecifines NK ląstelių citolizines reakcijas ir kostimuliuoja specifinių CD8+ limfocitų citotoksiškumą.

Ištirus normalius organizmo audinius, nustatyta, kad šie baltymai ekspresuojami tik skrandžio bei žarnyno epitelio ląstelėse. MICA/B baltymų ekspresija ląstelėse indukuojama šiluminio šoko baltymų ar infekcijos poveikio. Padidėjusi šių baltymų ekspresija nustatyta ir daugelių navikinių ląstelių paviršiuje: melanomos, plaučių adenokarcinomos, krūties, inkstų, kiaušidžių, prostatos ir storžarnos vėžio atvejais.

MICA/B reikšmė navikų imuninės priežiūros procesuose yra dvejopa. Tyrimais nustatyta tiesioginė koreliacija tarp naviko infiltracijos  $\gamma/\delta T$  limfocitais ir MICA/B ekspresijos naviko ląstelių paviršiuje o *ex vivo* tyrimuose  $\gamma/\delta T$  limfocitų sugebėjimo pažinti ir lizuoti MIC+ navikines ląsteles. Tačiau tuo pat metu pateikiama duomenų, kad navikus (tiek MIC molekules turinčius, tiek jų neturinčius) infiltruojančių limfocitų bei periferinio kraujo limfocitų paviršiuje NKG2A receptoriaus ekspresija gali būti ir sumažėjusi. Šio reiškinio paaiškinimas buvo pateiktas vėliau, įrodžius, kad sumažėjusi NKG2D ekspresija susijusi su tirpiųjų MIC baltymų frakcijų atsiradimu, ir ši navikinių ląstelių savybė buvo įvardyta „šėrimusi“ (angl. *shedding*). Limfocitų specifinio citotoksiškumo slopinimas ekstraceliuliariai išskiriant savo antigenus yra vienas iš būdų, kuriais besivystydamas navikas nuslopiną imuninės priežiūros reakcijas.

4. **Superekspresuoti antigenai**, atliekantys augimo faktoriaus receptoriaus funkcijas (HER-2/neu, EGFR) Ląstelių onkogenų koduojami baltymai gali būti vertinami kaip navikiniai antigenai. Protoonkogenas HER-2/neu koduoja baltymą, homologišką epidermio augimo faktoriui, todėl manoma, kad jis pats atlieka augimo faktoriaus receptoriaus funkcijas. Šio geno amplifikacija sukelia baltymo superekspresiją, kuri pasireiškia 30–40% krūties, kiaušidžių, gimdos kūno, skrandžio vėžio, plaučių adenokarcinomos atvejų.

5. **Viruliniai antigenai**, pavyzdžiui, antigenai, koduojami žmogaus papildomos virusais arba Epštein-Baro virusais.

Taigi imuninės sistemos ląstelių antigeniniais taikiniai gali būti daugybė skirtingų navikinių ląstelių struktūrų, dalis kurių yra pakankamai gerai identifikuota, kita dalis dar tiriama arba egzistuoja tik hipotezėse.

Žmogaus imuninės sistemos priešnavikiniai citolitiniai efektoriai yra citotoksiniai T limfocitai ir NK ląstelės (natūralūs kileriai). CD8+ citotoksiniai T limfocitai atpažįsta antigeninius peptidus, kurie koduojami MAGE arba kitų mutavusių genų melanomos ląstelėse. Bet atpažinimas būna efektyvus tik tada, jeigu antigenas yra pateikiamas kartu su HLA I klasės molekulėmis. NK ląstelės naikina melanomos ląsteles netgi tada, jeigu ląstelė praranda savo paviršiuje HLA I klasės molekules. Pagal citotoksinio poveikio mechanizmą NK ląstelės panašios į citotoksinių T limfocitų ląsteles (72). Pastaruoju metu vis daugiau reikšmės imunologinio atpažinimo procesuose teikiama dendritinėms ląstelėms. Tai imuninės sistemos ląstelės, kurios savo paviršiuje ekspresuoja HLA I ir II klasės molekules ir kitas kostimuliacines molekules. Dendritinės ląstelės pristato CD8+ citotoksiniams limfocitams antigenus peptidus per HLA I klasės molekules ir CD4+ T limfocitams per HLA II klasės molekules. CD4+ T limfocitai produkuoja citokinus, kurie suaktyvina dendritines ląsteles ir citotoksinius T limfocitus. Kaip matome, HLA I klasės molekulės vaidina svarbų vaidmenį atpažįstant navikines ląsteles ir pagrindinė navikinių ląstelių rezistencijos citotoksiniams T limfocitams priežastis yra šių molekulių praradimas (73). Yra žinoma, kad ankstyvoje stadijoje navikines ląsteles ekspresuoja ir HLA I klasės molekulės, o vėlesnių stadijų navikai šių molekulių ekspresavo mažiau arba visai neekspresavo (74). Tokie faktai gali paaiškinti mažai arba visai neekspresuojančių HLA I molekulių navikų greitesnį progresavimą ir rezistenciją imunoterapijai, kuri aktyvina citotoksinius T limfocitus.

Apie melanomos antigenines savybės žinoma nemažai, o apie T limfocitų pokyčius, kurie gali daryti įtaką melanomai atsirasti arba paankstinti ligos progresavimą, žinoma nedaug. Rizika susirgti šiuo piktybiniu naviku



padidėja, kai imuninė sistema yra nusilpusi (75), todėl melanoma sergantiems pacientams taikoma imunoterapija (citokinai). Nenustatyta, kokie imunologiniai pokyčiai būdingi ankstyvųjų stadijų melanoma sergantiems pacientams.

Kaip minėjome anksčiau, esant melanomai, priešnavikinėse imuninės sistemos reakcijose didžiausią reikšmę turi T limfocitai, t.y. CD4+ ir CD8+ limfocitai. T supresinių limfocitų egzistavimą ir jų funkcijas imunologai kontraversiškai aptarinėjo jau kelis dešimtmečius, tačiau tik apie 2000-uosius metus buvo apibūdinta viena iš supresorių populiacijų – natūralių CD4+ T reguliacinių limfocitų subpopuliacija.

Natūralūs T reguliaciniai limfocitai yra specializuota CD4+ T limfocitų subpopuliacija, kurios pagrindinė funkcija – autoimuninių reakcijų kontrolė. Jie atlieka svarbiausią vaidmenį sukeliant toleranciją „saviems“ antigenams, įskaitant ir tuos, kuriuos ekspresuoja navikai. Pelių periferiniame kraujyje jų randama 5–10% visų CD4+ limfocitų (žmonių – 1–3%).

Tiriant Treg kiekį onkologinėmis ligomis sergančių ligonių periferiniame kraujyje, nustatyta, kad epitelinės kilmės navikais sergančiųjų kraujyje Treg kiekis 2,5 karto didesnis nei sveikų žmonių. Daugumos natūraliai atsirandančių navikų antigenai nėra pakitę, palyginti su „savais“ antigenais. Tikėtina, kad „savų“ antigenų superekspresija navikinių ląstelių paviršiuje – vienas iš būdų, kuriais navikas aktyvina Treg limfocitus, slopinančius efektyvias priešnavikines reakcijas. Taigi nustatyti Treg limfocitų imunosupresinius mechanizmus gali būti vienas svarbiausių žingsnių gydant žmogaus autoimunines ligas, kontroliuojant transplantantų atmetimo reakcijas bei parenkant efektyvius gydymo būdus sergantiesiems onkologinėmis ligomis.

Treg limfocitai pirmiausia buvo nustatyti ir apibūdinti pelių modeliuose. *In vitro* tyrimuose konstatuota jų savybė slopinti T helperių ir citotoksinių limfocitų proliferaciją bei citokinų sintezę.

Treg savo paviršiuje ekspresuoja CD25, GITR ir CTLA-4, taip pat viduląstelinį baltymą foxP3 (76,77,78). FoxP3 baltymas, būdingas tiek pelių, tiek žmogaus Treg limfocitams, yra itin svarbus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg limfocitams vystytis bei jų supresorinėje veikloje. Nustatyta, kad foxP3 indukavimas *in vitro* sąlygomis ar šio baltymo geno transfekavimas į CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T limfocitus sukelia juose intensyvią CD25, CTLA-4 bei GITR molekulių ekspresiją, ir šie limfocitai įgyja supresorinių savybių (79,80).

FoxP3 priklauso *forkhead/winged-helix* šeimos transkripcijos reguliatoriams. Žmogaus foxP3 baltymas (sinonimas angl. *scurfin*) yra 431 amino rūgšties peptidas. Pagrindinė šios šeimos savybė yra FKH domenas, kuris reikalingas efektyviai jungtis prie DNR. Manoma, kad foxP3, kaip transkripcijos represorius, slopina CD4<sup>+</sup> limfocitų citokinų genų ekspresiją. CD4<sup>+</sup> limfocitai, ekspresuojantys foxP3, net ir stimuliuojant *in vitro* per TCR, neišskiria nei IL-2, IL-4, nei IFN- $\gamma$ .

Nepaisant Treg žymenų ir funkcijų panašumo, žmogaus ir pelių *FOXP3* geno reguliavimas bei foxP3 baltymo sandara skiriasi. Pats foxP3 baltymas, kitaip negu pelių, turi dvi izoformas, kurių funkcijos nėra galutinai ištirtos.

Kitaip negu pelių, kurių Treg formuojasi tik čiobrialiaukėje, žmogaus periferiniame kraujyje aptinkamos dvi skirtingos kilmės Treg populiacijos: susiformavusios čiobrialiaukėje (angl. *natural*) ir indukuotos periferijoje (angl. *adaptive*) Treg populiacijos. Nustatyta, kad, stimuliuojant žmogaus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> limfocitus kartu su IL-2, galima indukuoti foxP3 baltymo sistezę ir kartu supresinių savybių išraišką *in vitro* (81).

Iš CD8<sup>+</sup> limfocitų išsivysto imuninės sistemos efektorinės ląstelės, nuo kurių ir priklauso navikinių ląstelių sunaikinimas ar naviko augimo kontrolė (82). Žinoma, kad IFN- $\alpha$  priešnavikinis veikimas asocijuojasi su CD8<sup>+</sup> ląstelių sukkelto autologinių navikinių ląstelių žūties indukcija (83). Be to, CD8<sup>+</sup> limfocitų funkcinis aktyvumas gali būti susijęs su CD8 antigeno

tankiu ląstelės paviršiuje. Ankstesnių tyrimų rezultatai rodo, kad CD8+ limfocitų dalyvavimas priešnavikinėse reakcijose melanomos atveju gali būti susijęs su CD57 antigeno raiška (84,85). CD57 yra adhezijos molekulė – glikoproteinas, būdingas daugumai (50–60%) NK ląstelių, bet aptinkamas ir CD4+ ir CD8+ limfocituose. Sveikų žmonių periferiniame kraujyje CD8+CD57+ limfocitų populiacija yra nedidelė (vidutiniškai 16,4% visų CD8+ limfocitų). CD8+CD57+ T limfocitai nėra homogeniška subpopuliacija. Jų fenotipas ir funkcijos kinta įvairiomis pataloginėmis sąlygomis ir gali atspindėti imuninės sistemos citotoksinį pajėgumą. CD8+CD57+ T limfocitai, išskiriantys perforiną, granzymą B, INF- $\gamma$ , savo paviršiuje turintys Fas ligandą, atlieka citotoksinių efektorių vaidmenį. Literatūroje yra duomenų apie CD57+ limfocitų kiekio naviko infiltratuose ar periferiniame kraujyje ryšį su išgyvenimo trukme sergant melanoma ir kitais piktybiniais navikais – dauginė mieloma, plokščialąstelinis plaučių vėžys (86,87).

Tiriant limfocitų subpopuliacijas prieš pradedant išplitusio inkstų piktybinio naviko imunoterapiją interferonu alfa2b, pastebėta: jei CD8<sup>high</sup>CD57+ limfocitų yra <30%, išgyvenimo trukmė žymiai ilgesnė nei tuo atveju, kai CD8<sup>high</sup>CD57+ limfocitų yra >30% (88). CD8<sup>high</sup>CD57+ buvo nagrinėjamas tyrime III stadijos melanomos gydymo interferonu alfa efektyvumui įvertinti. Nustatyta, kad jei prieš pradedant gydymą IFN- $\alpha$  CD8<sup>high</sup>CD57+ limfocitų yra < 23% išgyvenimo trukmė ilgesnė ( $p=0,046$ ) nei CD8<sup>high</sup>CD57+ limfocitų esant >23% (85). Aprašytų tyrimų duomenys rodo, kad minėtų limfocitų subpopuliacijos susijusios su IFN- $\alpha$  gydymu melanoma sergančių pacientų ligos eiga ir galima manyti, jog CD8<sup>high</sup>CD57+ limfocitų subpopuliacija dalyvauja IFN- $\alpha$  priešnavikiniuose mechanizmuose. Kaip vyksta imunoreguliacija, tvirtų įrodymų dar nėra. CD8+CD57+ T limfocitai, kaip citotoksiniai efektoriai, imuninį atsaką gali aktyvinti keliais būdais: 1) išskiriamais citokiniais (INF- $\gamma$ , IL-4) gali aktyvinti T helperius, 2)

išskirdami granzymą B, per Fas ligandą sukelti taikininių ląstelių apoptozę, 3) perforinu – taikininių ląstelių nekrozę.

### 2.3 Melanomos gydymas

Pagrindinis melanomos gydymas yra operacija. Pirminio naviko šalinamo apimtis priklauso nuo naviko invazijos lygio. Priklausomai nuo ligos išplitimo atliekamas sarginio limfmazgio pašalinimas ir limfonodektomija. Įvertinus ligonio bendrąją būklę ir ligos išplitimą skiriamas adjuvantinis (tai yra gydymas norint sumažinti riziką atsirasti metastazėms po pirminio naviko pašalinimo) gydymas. Gydomo pasirinkimas priklausomai nuo melanomos stadijos parodytas 3 lentelėje.

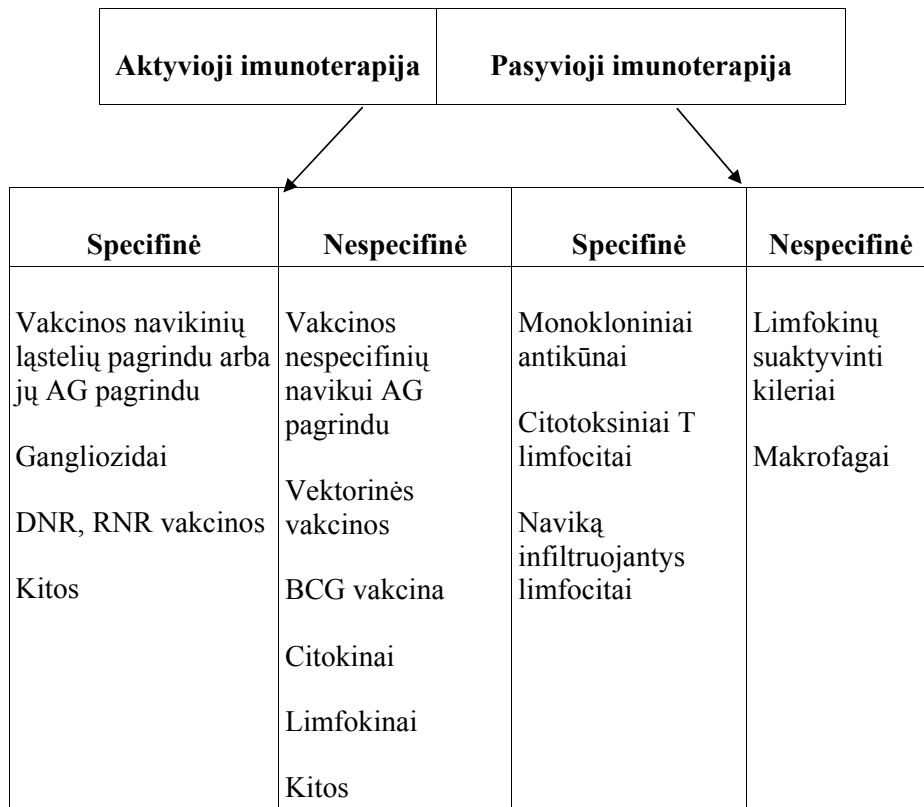
**3 lentelė.** *Melanomos gydymas priklausomai nuo ligos stadijos*

<b>Ligos stadija</b>	<b>Gydymo metodai</b>
<b>I</b>	Chirurginis
<b>II</b>	Chirurginis, adjuvantinis
<b>III</b>	Chirurginis, adjuvantinis
<b>IV</b>	Chirurginis, sisteminis

**Adjuvantinė chemoterapija** dakarbazinu ir kitais chemoterapijos preparatais buvo intensyviai tiriama nuo 1980 metų. 2006 metais Verma pristatė 7 atsitiktinės atrankos tyrimų metaanalizę (buvo įtraukta 1000 pacientų). Nė viename tyrime nebuvo pastebėta, kad toks gydymas pagerintų pacientų išgyvenimą (89). Taigi iki šios dienos nėra nustatyta, kad adjuvantinė chemoterapija statistiškai pagerintų pacientų išgyvenimą, todėl toks gydymas gali būti skiriamas tik esant IV stadijai kaip sisteminis gydymas (90).

**Imunoterapijos**, kaip melanomos adjuvantinio ar sisteminio gydymo metodo, galimybės plačiai diskutuojamos. Idėja, kad organizmo apsauginiai mechanizmai, t.y. už ląstelinį imunitetą atsakingi leukocitai, gali kontroliuoti vėžinių ląstelių augimą, buvo išsakyta daugiau negu prieš 100 metų. Dabar eksperimentiniai ir klinikiniai tyrimai rodo, kad visais atvejais imuninė sistema atpažįsta vėžines ląsteles kaip svetimą organizmui. Vėžio imunoterapijos tikslas yra panaudoti imuninę sistemą vėžiui gydyti. Šiuo metu navikų imunoterapija pagal veikimą skiriama į 2 kategorijas; pirmoji - aktyvioji, kai vyksta imuninės reakcijos indukcija prieš naviko ląsteles, tai yra sergančio vėžiu paciento organizmo imunizacija medžiagomis, galinčiomis sukelti imunines reakcijas, naikinančias vėžines ląsteles arba stabdančias jų augimą. Antroji – pasyvioji, kai į organizmą įvedamos imunologiškai aktyvios substancijos, pasižyminčios priešnavikiniu veikimu (91). Imunoterapijos klasifikacija pateikiama 1 schemeje.

1 shema. Piktybinių navikų imunoterapijos klasifikacija



Klinikoje jau daugiau kaip 30 metų naudojami aktyvios nespecifinės imunoterapijos metodai, o ateityje daug žadanti yra pasyvioji specifinė imunoterapija monokloniniais antikūnais ir aktyvioji specifinė imunoterapija vakcinomis (92,93). Melanomai gydyti aktyviaja nespecifine imunoterapija praktikoje nuo XX amžiaus 9-ojo dešimtmečio pradžios pradėti naudoti rekombinantiniai citokinai - interferonas alfa (IFN- $\alpha$ ) ir interleukinas 2 (IL-2). Citokinai - tai baltymai, kurie produkuojami makroorganizmo ląstelių kaip atsakas į virusus ir kitus žalojančius poveikius.

**IFN- $\alpha$**  - tai natūralus baltymas, produkuojamas leukocitų ir monocitų. Šis baltymas buvo atrastas 1957 metais. Pirmą kartą 1973 metais INF buvo paskirtas osteogeninei sarkomai gydyti. Šio laiku šis citokinas plačiai

naudojamas onkologinėms ligoms gydyti. Yra žinomi 3 pagrindiniai IFN tipai (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  ir IFN- $\gamma$ ). Taip pat žinomi IFN- $\omega$  ir IFN- $\tau$ . IFN- $\beta$ , - $\gamma$ , - $\omega$  tipai, koduojami tik 3 skirtingais genais, todėl jais koduoto interferono yra tik vienas tipas. IFN- $\alpha$  koduojamas 25 genais ir tai paaiškina, kodėl yra žinomi 25 skirtingi IFN- $\alpha$  subtipai. 90% visų IFN- $\alpha$  sudaro IFN- $\alpha$ 2b subtipas. Lietuvoje onkologiniams pacientams gydyti vartojamas rekombinantinis IFN- $\alpha$ 2b realdironas (UAB "Sicor Biotech"). Yra žinomas jo priešvirusinis ir priešnavikinis aktyvumas, kuris remiasi imunomoduliuojančiu (makrofagų, NK ir citotoksinių limfocitų suaktyvėjimas), antiproliferaciniu (slopina navikines ląsteles RNR sinteze, atstato proliferacijos kontrolę) veikimu. Žinoma, kad IFN- $\alpha$  selektyviai veikia tik navikinių ląstelių ciklą ir indukuoja genus, kurie supresyviai veikia navikinės ląstelės augimą (94). Be to, IFN- $\alpha$  padidina navikinių antigenų ekspresiją ir pasižymi tiesioginiu priešnavikiniu aktyvumu (95,96). IFN- $\alpha$  gaminamas naudojant genetinės inžinerijos technologijas. Kadangi, viena vertus, melanoma yra chemoterpijai ir spinduliniai terapijai atsparus navikas, o kita vertus, yra žinomas faktas apie spontanią melanomos regresiją (apie 2 % atvejų), todėl melanoma laikoma imunogeniniu naviku ir tai labai paskatino pasirinkti šį naviką kaip modeli tirti IFN efektyvumą. Vienas iš pirmų didelių tyrimų buvo ECOG 1684. Jo metu ištirta 280 pacientų, kurių naviko storis buvo didesnis nei 4 mm, ir/arba jiems buvo metastazių sritiniuose limfmazgiuose. Nustatyta, kad IFN- $\alpha$  pailgina laiką iki progresavimo pradžios ir pagerina išgyvenimą (97). Vėliau atliktų tyrimų metaanalizė patvirtino adjuvantinio gydymo IFN- $\alpha$  reikšmę melanoma sergančių ligonių remisijos trukmei (laikas iki ligos progresavimo pradžios pailgėja 17%), tačiau dėl IFN- $\alpha$  poveikio ligonių bendrajam išgyvenimui iki šiol diskutuojama (98). Taip pat buvo atlikti keli atsitiktinės atrankos tyrimai IFN- $\alpha$  veikimui įvertinti, palyginti su kontroline grupe. Šiuose tyrimuose gauti išgyvenimo rezultatai buvo nevienodi, ir tai galima susieti su tuo, kad dažnai skirtos skirtingos IFN- $\alpha$  dozės (aukštos/vidutinės/mažos) ir gydymas truko skirtingus laikotarpius

(95,99,100,101). Pacientų, sergančių II stadijos melanoma, atsitiktinės atrankos tyrimų analizė pateikta 4 lentelėje.

**4 lentelė.** *Pacientų, sergančių II stadijos melanoma, atsitiktinės atrankos tyrimų analizė*

<b>Protokolas, publikacija</b>	<b>Ligonių skaičius, n</b>	<b>Laikas iki progresavimo</b>	<b>Bendrasis išgyvenimas</b>
<b>ECOG 1684 (1984–1990), Kirkwood et al., 1996 [97]</b>	31	-	-
<b>ECOG 1690, (1991–1995), Kirkwood et al., 2000 [102]</b>	112	-	-
<b>NCCTG 837052 (1984–1989), Creagen et al., 1995 [103]</b>	102	+/-	-
<b>Prancuzija (1990–1994), Grob et al., 1998 [6]</b>	499	+	+/-
<b>Austrija (1990–1994), Pechamberger et al., 1998 [104]</b>	311	+	+/-
<b>EORTC 18871 (1987–1996), Eggermont et al., 2001 [105]</b>	340	-	-
<b>EORTC 18952 (1996–2000), Eggermont et al., 2001 [105]</b>	380	+/-	-

- rezultatai nesiskyrė nuo kontrolinės grupės

+/- teigiama tendencija



+ *statistiškai teigiamas rezultatas*

Kaip matome iš aprašytų tyrimų, gydymas IFN- $\alpha$  yra diskutuotinas ir skirti šį gydymą neturint papildomų atrankos kriterijų gali būti netikslinga.

**IL-2** pirmą kartą buvo identifikuotas dar 1976 metais (106). Identifikavus IL-2 koduojantį geną, biologiškai charakterizavus rekombinantinį IL-2, sukaupus informaciją apie svarbų IL-2 vaidmenį reguliuojant imuninės sistemos reakcijas, taip pat atlikus daug eksperimentų su pelėmis, prasidėjo klinikiniai IL-2 efektyvumo, gydant išplitusiu vėžiu sergančius ligonius, tyrimai. Šiuo metu IL-2 vartojamas gydyti pacientus, sergančius išplitusiu inkstų vėžiu ir metastazavusia melanoma. Be to, IL-2 naudojamas *in vitro* tyrimuose, nustatant žmogaus vėžio antigenus, taip pat kaip adjuvantas imunizacijos *in vivo* tyrimuose. IL-2 pagrindinė funkcija – stimuliuoti imunokompetentinių ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją. IL-2 taip pat yra natūralių kilerių (NK) augimo faktorius. Naudojant IL-2 kaip monoterapiją arba kaip derinį su IFN- $\alpha$  negaunama patenkinamų rezultatų dėl blogos gydymo tolerancijos (didelis toksiškumas) ir palyginti nedidelio išgyvenimo pailginimo efekto (107). 2003 metais buvo atliktas multicentrinis atsitiktinės atrankos IIB stadijos melanomos citokinoterapijos (IFN- $\alpha$ +IL-2) efektyvumo tyrimas. Statistiškai teigiamo rezultato nebuvo nei laiko iki progresavimo pradžios, nei bendrojo išgyvenimo atžvilgiu (108).

Turbūt vienas sėkmingiausių imuninės sistemos panaudojimų yra pasyvioji imunoterapija taikant **monokloninius antikūnus**. Klinikinę antikūnų terapijos plėtrą paspartino G. Koehlerio ir C. Milsteino 1975 metais sukurtos hibridomų technologijos, taip pat vėliau sukurtos rekombinantinės technologijos. Šios naujovės dabar leidžia imortalizuoti atskiras plazmines ląsteles ir klonuoti sunkiąsias bei lengvąsias gyvūnų bei žmogaus antikūnų grandines. Per mažiau nei tris dešimtmečius monokloniniai antikūnai iš mokslinių tyrimų laboratorijose pasiekė kliniką, ir šiuo metu klinikoje

vartojamų MAK sąrašas siekia 20. Iš jų 8 MAK JAV Maisto ir vaistų administracijos yra aprobuoti vėžiui gydyti.

Priešvėžiniai MAK gali efektyviai naikinti vėžines ląsteles *in vitro* ir *in vivo*. Priešvėžinių MAK poveikis pasireiškia perduodant signalą surišus ląstelės receptorių nuo antikūnų priklausomu citotoksiškumu (NAPC) ir nuo komplemento priklausomu citotoksiškumu (NKPC). Monokloniniai antikūnai gali surišti ląstelės paviršiaus receptorius naudodami savo antigeno prijungimo vietas. Tačiau jie skiriasi savo sugebėjimu sukelti po to einančius efektus. Anti-CD20 MAK sukelia apoptozę, ypač kai antigenas taikynys yra stipriai surišamas. Panašūs stebėjimai atlikti ir anti-CD19 bei anti-CD22 antikūnų atžvilgiu. Matyt, vyksta proapoptozinių Bax molekulių skatinimas arba antiapoptozinių Bcl-x1 molekulių slopinimas. MAK efektorinis mechanizmas yra aiškus, bet terapinis efektas gydant standžiuosius navikus nėra didelis. Todėl siūloma naudoti dviejų ar daugiau monokloninių antikūnų derinius. Kitas MAK trūkumas yra trumpas gyvavimo laikas serume po suleidimo. Taip pat MAK gali būti taikomi ir kaip nešėjai. Prie jų galima prijungti įvairus toksinus, radionukleotidus, citokinus, fermentus. MAK terapijos pavyzdžiu gali būti ipilimumabo (MDX-010) taikymas. Tai monokloniniai antikūnai prieš citotoksinių T limfocitų CTLA-4 antigeną. CTLA-4 antigenas inhibuoja citotoksinių T limfocitų proliferaciją, todėl šio antigeno blokavimas yra tikslingas norint sustiprinti CD8 limfocitų efektorinę funkciją. Literatūros duomenimis, teigiamas atsakas (ligos progresavimas sustojo) buvo nuo 7-15% pacientų, sergančių metastazine melanoma. Kurie buvo gydyti ipilimumabu (109).

**Vakcinoterapija** sergant melanoma plačiai tiriama. Sąlygiškai priešnavikinę vakcinoterapiją galima suskirstyti į šias grupes:

1. Vakcinų ląstelių pagrindu (alogenines ir autologines);
2. Gangliozidai;

3. Sintetiniai peptidai;
4. DNR vakcinos;
5. Rekombinantiniai virusai;
6. Dendritinių ląstelių vakcinos;
7. Kitos.

**Alogeninės** ląstelių vakcinos taikymas paremtas mintimi, kad skirtingu individų to paties tipo navikinės ląstelės gali turėti bendrus antigenus, kurie sugeba indukuoti imuninį atsaką. Alogeninės vakcinos pavyzdžiu gali būti CancerVax vakcina. Tai gyvų ląstelių vakcina, kuri gauta iš spinduliais apdorotų 3 melanomos ląstelių linijų, pasižyminčių aukšta imunogeninių antigenų ekspresija. CancerVax turi MHC gaplotipus, tokius pat kaip 95% melanoma sergančių pacientų. Taikant šią vakciną (II fazės tyrimas) gauta diseminuota melanoma sergančių pacientų teigiama išgyvenimo statistika. Palyginus 5 metų išgyvenimą su istorine kontrole, vakcina gydytų pacientų išgyvenamumas buvo 42%, o kontrolinės grupės išgyvenimas sudarė 19% (110).

**Autologinių** ląstelių vakcinų privalumas galėtų būti galimybė taikyti vakcinoterapiją unikaliam, būdingam tik konkrečiam pacientui antigenų kombinacija. Bet šių vakcinų minusas yra sudėtinga gamyba ir žemas antigenų imunogeniškumas. Siekiant padidinti Ag imunogeniškumą į genetinį navikinių ląstelių aparatą įtraukiami genai, atsakingi už citokinų produkciją. Tai yra vadinamosios modifikuotos autologinės vakcinos. Pagal Dranoff'o atliktą tyrimo geriausiai tinkamas pasiekti ši tikslą yra GM-GSF (111). Šių vakcinų pritaikymas klinikoje ribotas ir tyrimai vyksta toliau.

**Gangliozidinių** vakcinų (GMK) pagrindą sudaro tai, kad melanomos ląstelės paviršiuje intensyviai ekspresuojami gangliozidai. Gangliozidai – tai glikolipidai, ir žinomi keli gangliozidu tipai: GM3, GD3, GD2, GM2 ir O-acetil GD3 (112). GM2 yra labiausiai pasižymintis imunogeniškumu gangliozidas, todėl jo atliekama daugiausia klinikinių tyrimų. Pirmuose atliktuose tyrimuose gautas teigiamas rezultatas (antikūnų prieš melanomos ląstelių glikozidus buvo randama 100% atvejų), bet išgyvenimo trukmės šis gydymas nepagerina (113). Manoma, kad taip yra dėl to, kad nors GM2 ekspresuojamas ant visų melanomos ląstelių, bet šios ekspresijos lygis nedidelis, palyginti su kitų gangliozidų. Todėl manoma, kad siekiant gauti klinikinį rezultatą tikslinga naudoti polivalentines vakcinos gangliozidų pagrindu.

Šiuolaikiniai biotechnologiniai metodai leidžia susintetinti navikinius antigenus. Taip buvo sukurtos **peptidų** vakcinos. Tai perspektyvus metodas, bet jo dabartinis trūkumas yra tai, kad sintetinių peptidų trumpalaikis gyvavimo pusperiodis ir silpna potencija susiję su HLA molekulėmis *in vivo*.

**DNR** vakcinos ir **dendritinių** ląstelių pagrindu pagamintos ir rekombinantinių **virusų** vakcinos, manoma, yra perspektyvios, bet kol kas yra tik tyrimo stadijoje. Rekombinantinių virusų vakcinų galimu privalumu gali būti galimybė juos naudoti peroraliai. Šiuo metu atliekami šio metodo I ir II fazių tyrimai (114,115,116).

Iš aprašytų imunoterapijos gydymo metodų šiandien praktinę reikšmę turi tik IFN- $\alpha$ , bet ir šis citokinas neturėtų būti skiriamas neatsižvelgus į atrankos kriterijus.

### 3. METODAI

Tiriant proliferacijos žymens Ki-67 reikšmę, buvo atlikta 80 pacientų, kuriems VUOI 2000-2002 metais diagnozuota neišplitusi melanoma (pacientai buvo tiriami pagal VUOI naudojamus tyrimo algoritmus), retrospektyvinė analizė. Tyrimui atlikti gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas. Įtraukimo į tyrimą kriterijai buvo: pirmą kartą nustatyta ir histologiškai patvirtinta odos melanoma, naviko storis  $\geq 1,5$  mm, nėra sritinių ir tolimųjų metastazių, nėra kitos lokalizacijos piktybinio naviko. 33 šių pacientų po operacinio gydymo praėjus dviem mėnesiams buvo paskirtas adjuvantinis gydymas IFN- $\alpha$  nuo 3 mln. TV iki 18 mln. TV 3 kartus per savaitę į raumenis. Gydymo IFN- $\alpha$  trukmė – nuo 23 iki 1124 dienų, mediana – 269 dienos. Gydymo nutraukimo priežastys buvo ligos progresavimas, blogas vaisto toleravimas, paciento atsisakymas taip gydytis. Duomenys apie išgyvenimo trukmę gauti iš Vėžio registro. Gydyti pacientai (n=33) buvo palyginti su negydytais pacientais (n=47).

Tiriant imunologinius rodiklius buvo atliktas prospektyvinis tyrimas. Išanalizuoti imunologiniai duomenys 27 pacientų, kuriems 2006-2007 metais Vilniaus universiteto Onkologijos institute buvo nustatyta neišplitusi melanoma. Tyrimui atlikti gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas. Įtraukimo kriterijai buvo: pirmą kartą nustatyta ir histologiškai patvirtinta odos melanoma (pTis-pT4N0M0), sritinių ir tolimųjų metastazių nebuvimas, kitos lokalizacijos piktybinio naviko nebuvimas. Žemiau parodyta pacientų, kurių imunologiniai rodikliai buvo tiriami, stebėjimo anketa (1 anketa).

**1 anketa. Pacientų stebėjimo ir tyrimų atlikimo anketa**

<b>Tyrimai/ data</b>	<b>Pirmine konsultacija</b>	<b>1 mėn. iki operacijos</b>	<b>10 d. iki operacijos</b>	<b>1 mėn. po operacijos</b>	<b>3 mėn. po operacijos</b>	<b>6 mėn. po operacijos</b>	<b>9 mėn. po operacijos</b>	<b>12 mėn. po operacijos</b>
<b>Imunologinis tyrimas CD4, CD8, CD8hCD57+)</b>			+	+	+	+	+	+
<b>Morfologinis diagnozės patvirtinimas</b>				+				
<b>Augimo frakcijos (Ki-67)</b>				+				
<b>Sritiniai limfmazgiai ir vidaus organų echoskopija</b>		+				+		+
<b>Plaučių rentgenograma</b>		+				+		+
<b>Biocheminiai ir hematologiniai tyrimai</b>			+	+	+	+	+	+
<b>anamnezė</b>	+							

Melanoma sergančių pacientų imunologiniai rodikliai buvo palyginti su 39 kontrolinės grupės asmenų atitinkamais rodikliais. Į kontrolinę grupę buvo įtraukti onkologinėmis ir autoimuninėmis ligomis nesergantys asmenys. Duomenys surinkti 2000 m.

### **3.1 Imunohistocheminiai tyrimai**

Imunohistocheminiai tyrimai buvo atlikti bendradarbiaujant su VPC ir su VUOI Molekulinės onkologijos laboratorija. Histologiniai preparatai

paruošti VPC, o imunohistocheminiai tyrimai atlikti Molekulinės onkologijos laboratorijoje.

Odos fragmentas su naviku (melanoma), buvo fiksuojamas 10% buferiniame formalino tirpale 18-24 val. Po fiksacijos histologiniam ištyrimui buvo paimama ne mažiau kaip du 2-3 mm storio pjūviai iš centrinės (didžiausios) naviko dalies. Naviko fragmentai (reprezentaciniai pjūviai) buvo apdorojami audinių procesoriuje „Shandon pathcentre“ ir įliejami į išlydytą (56-58°C) parafiną. Parafinui su naviko pjūviais sustingus (po 5-10 min), buvo gaminami 3 mikronų pjūviai, kurie buvo dedami ant objektinių stiklelių. Naviko pjūviai buvo dažomi hematoksilinu ir eozinu MEDITE TST 30 automatu, prieš dažymą objektiniai stikleliai su parafininiais pjūviais buvo džiovinami automato + 60° C temperatūros džiovinimo kameroje.

Dažymo principas: baziniai dažai (hematoksilinas) jungiasi su ląstelių branduoliais, bazofiliniais ląstelių citoplazmos bei bazofiliniais audinio elementais ir nudažo juos mėlyna spalva. Rūgštiniai dažai (eozinas) jungiasi su acidofiliniais/eozinofiliniais ląstelių citoplazmos bei acidofiliniais audinio elementais ir nudažo juos nuo rožinės iki raudonos spalvos (1,3 pav.).

Darbo eiga:

Pjūvių džiovinimas + 60 °C temperatūros džiovinimo kameroje 15 min.

1. Ksilenas	3 min.
2. Ksilenas	3 min.
3. Izopropilo alkoholis	1 min.
4. Izopropilo alkoholis	1 min.
5. 96 % etilo alkoholis	1 min.
6. 96 % etilo alkoholis	1 min.
7. Kambario temperatūros tekantis vanduo	1 min.
8. Mejerio hematoksilinas	5 min.

9. 0,1 % amonio vanduo	1 min.
10. Kambario temperatūros tekantis vanduo	1 min.
11. 96 % etilo alkoholis	1 min.
12. Eozino tirpalas (alkoholinis)	1 min.
13. 96 % etilo alkoholis	1 min.
14. Izopropilo alkoholis	1 min.
15. Ksilenas	2 min.
16. Ksilenas	2 min.
17. Ksilenas (finišas)	

Nudažyti pjūviai buvo dengiami dengiamaisiais stikleliais (24 x 50 mm) Medite RCM 2000 dengimo automatu, naudojant permanentinę dengiamąją medžiagą.

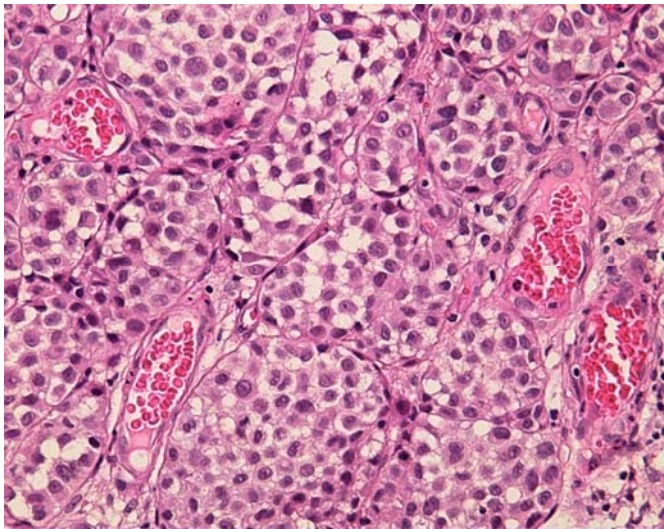
Gauti dažyti naviko mikropreparatai buvo tiriami šviesiniu mikroskopu Olympus BX41, x100, x200 ar x400 kartų padidiniu.

Ki-67 baltymo raiška buvo nustatyta imunohistocheminiu metodu. Parafininiai histologiniai melanomų preparatai prieš reakciją deparafinizuoti standartiniu būdu. Kelis kartus plauti ksilole, vėliau rehidratuojami, preparatus paeiliui pamerkiant į 99<sup>o</sup> etilo alkoholi, į 96<sup>o</sup>, 70<sup>o</sup> etilo alkoholio vandeninį tirpalą ir į vandenį. Endogeninėms peroksidazėms slopinti po deparafinizacijos preparatai inkubuoti metanolio ir 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mišinyje. Antigeno ir antikūno sąveikai sustiprinti preparatai inkubuoti citratiname buferiniame tirpale (pH 6,0), po to 1% arklio serumo fiziologiniame tirpale (pH=7,5, PBS). Po to atlikta inkubacija, naudojant monokloninius antikūnus prieš Ki-67 (klonas MIB-1, kodas Nr. M7240, DAKO A/S, Danija), praskiedus juos antikūnų skiedikliu (kodas Nr.S0809 DAKO A/S, Danija) pagal gamintojo instrukciją. Po šios inkubacijos, praplovus PBS, preparatai užlieti konjugotu su peroksidaze ožkos/triušio antikūnų atskleidimo tirpalu, atpažįstančiu pelės imunoglobulinas (kodas Nr. K5007, EnVision rinkinys, DAKO A/S, Danija). Po kiekvienos inkubacijos preparatai nuosekliai nuplauti PBS. Kaip

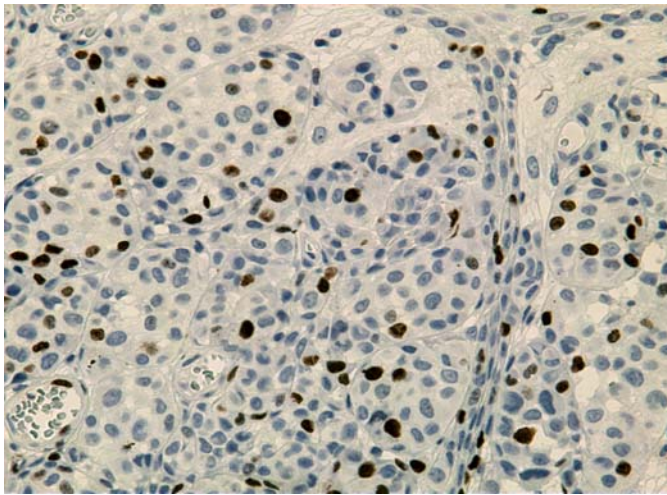


chromogeninis substratas naudotas 3,3'-diaminobenzidino ir 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mišinys (EnVision rinkinys, DAKO A/S, Danija). Po to histologiniai preparatai dažyti Mejer'io hematoksilino tirpalu (SIGMA, JAV), pamerkiant juos į tirpalą 3 min.

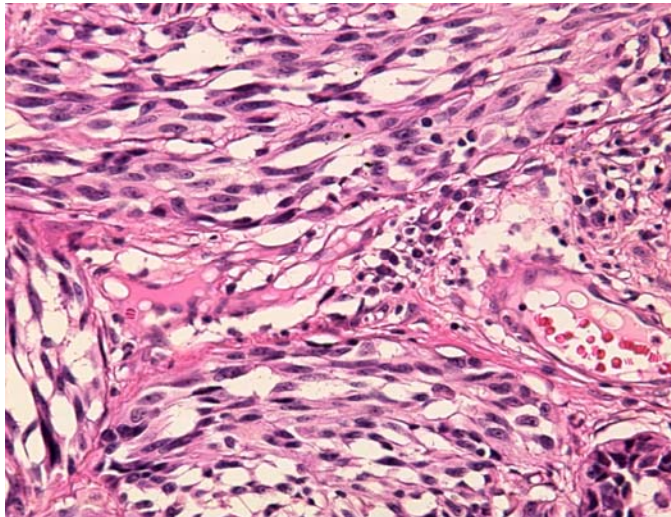
Imunohistocheminė reakcija vizualizuota pagal ląstelėje atsiradusį chromogeninės reakcijos produktą, DAB precipitą, mikroskopuojant visą preparatą po 40x objektyvu. Vertinant skaičiuota iki tūkstančio ląstelių, laikant, kad imunohistochemiškai Ki-67 teigiamos ląstelės yra tos, kurios pasižymi bet kurio spalvinio intensyvumo – nuo gelsvai rudos iki tamsiai rudos – spalvos chromogeninės reakcijos produktu (2,4 pav.).



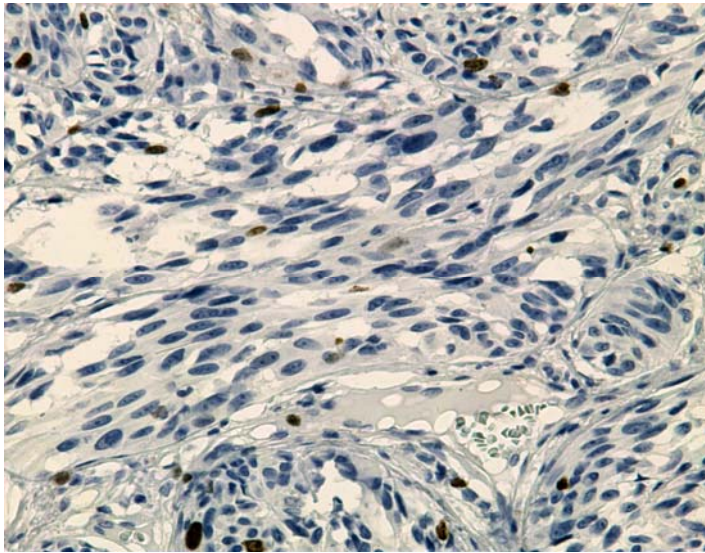
*1 pav. Stambių epitelioidinių melanocitų židiniai epidermio dermos riboje ir dermoje, HE, x200*



2 pav. Ki-67 ekspresija naviko ląstelėse (branduolinė reakcija, ruda spalva).  
Imunohistochemija Ki-67=10%. Padidinimas x200 (tas pats preparatas kaip  
ir 1 pav.).



3 pav. Stambių epitelioidinių melanocitų židiniai epidermio-dermos riboje ir  
dermoje, HE, x200



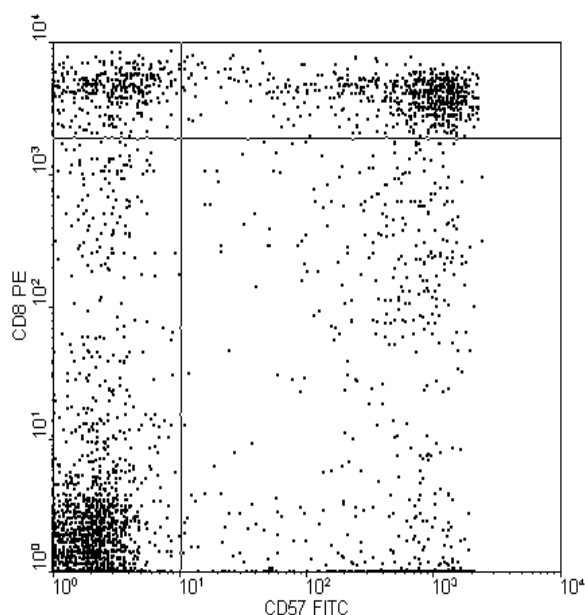
4 pav. Ki-67 ekspresija naviko ląstelėse (branduolinė reakcija, ruda spalva).  
Imunohistochemija Ki-67=3%. Padidinimas x200 (tas pats preparatas kaip ir  
3 pav.).

### 3.2 Imunologiniai tyrimai

Leukocitams analizuoti buvo imama 5 ml antikoaguliuto periferinio kraujo. Į mėgintuvėlius buvo pilama po 100 µl kraujo, po 20 µl monokloninių antikūnų ir inkubuojama 15 min. kambario temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos eritrocitai buvo suardomi lizuojančiu tirpalu (Lysing Solution, Becton-Dickinson). Leukocitai buvo 2 kartus perplaunami fosfatiniu buferiu (CellWash, Becton-Dickinson) ir fiksuojami 1% paraformaldehido tirpalu (CellFix, Becton-Dickinson). Fiksuotų ląstelių suspensija buvo laikoma 4°C temperatūroje ir analizuojama tėkmės citometru ne vėliau kaip po 12 valandų.

Analizei buvo naudojamas FACSort tėkmės citometras (Becton-Dickinson), kurio lazerio šviesos emisija yra 488 nm. Citometru buvo registruojama priekinė (FSC) ir šoninė (SSC) šviesos sklaidos bei 3 bangos ilgių fluorescencijos (530 nm bangos ilgio žalia, 585 nm bangos ilgio oranžinė ir 650 nm bangos ilgio raudona).

Limfocitai nuo monocitų ir granulocitų buvo atskiriami pagal šviesos sklaidą. Limfocitų fenotipinei analizei buvo naudojami monokloniniai antikūnai prieš ląstelių paviršiaus antigenus, konjuguotus su fluorescuojančiais dažais: CD57 FITC/ CD8 PE/ CD4 PerCP (Becton-Dickinson). Pagal CD8 antigeno ekspresijos intensyvumą ir antigeno CD57 buvimą ląstelių paviršiuje buvo išskirtos trys CD8+ limfocitų subpopuliacijos: daug CD8 antigeno turinčias CD8highCD57+ ir CD8highCD57- bei mažai CD8 antigeno turinčią CD8low. Atskirti nespecifiškai nusidažiusius limfocitus buvo naudojami Simultest Control  $\gamma_1/\gamma_{2a}$  (IgG1/IgG2a) monokloniniai antikūnai prieš pelių limfocitus (Becton-Dickinson). Žemiau 5 paveiksle kairės pusės viršutiniame kvadrante pavaizduota CD8+highCD57+ limfocitų subpopuliacija.



5 pav. CD8+ limfocitų subpopuliacijų analizė tėkmės citometru

Naudojant CellQuest programą (Becton-Dickinson), buvo nustatomi procentiniai limfocitų, monocitų, CD4+ bei CD8+ limfocitų populiacijų, CD8highCD57+, CD8highCD57- ir CD8low limfocitų subpopuliacijų kiekiai. Buvo išanalizuota po 10 tūkst. kiekvienam bandinio ląstelių. Limfocitų

koncentracijos buvo apskaičiuotos, naudojant hemocitometru nustatytą bendrą leukocitų skaičių.

### **3.3 Statistiniai metodai**

Visi duomenų statistiniai skaičiavimai atlikti, naudojant kompiuterinę programą STATISTICA 7. Pacientų išgyvenamumas buvo skaičiuotas nuo diagnozės nustatymo datos iki paciento mirties arba paskutinės datos, kada buvo žinoma, kad pacientas yra gyvas. Stebėjimas buvo atliekamas padedant Vėžio registrui. Grupių išgyvenamumas buvo analizuojamas Kaplan- Meier'io metodu. Skirtumai tarp išgyvenamumo kreivių įvertinti naudojant Log rangų testą. Kitų faktorių įtaka išgyvenimo trukmei buvo vertinta naudojant Cox'o modelį. Pacientų imunologiniai rodikliai buvo palyginti su kontrolinės grupės individų atitinkamais rodikliais. Skirtumų statistinis reikšmingumas buvo vertinamas pagal Student'o testą.

## **4. REZULTATAI**

### **4.1 Tiriamų pacientų ir kontrolinės žmonių grupės charakteristikos**

#### **4.1.1 Retrospektyvinė tiriamų pacientų grupė**

Tiriant proliferacijos žymens Ki-67 reikšmę, atlikta 80 pacientų, kuriems Vilniaus universiteto Onkologijos institute 2000-2002 metais buvo diagnozuota neišplitusi melanoma, retrospektyvinė analizė. Pacientų amžius – nuo 17 iki 89 metų. Dauguma pacientų buvo moterys (n=57). Pirminis navikas dažniausiai nustatytas galūnėse (51,2%) ir kūno srityje (35,36%). 64,63% atvejais melanomos pirminio naviko storis buvo 1,5-4,00 mm. Negydytų pacientų stebėjimo mediana buvo 53 mėn., intervalas - nuo 4 iki 77 mėn. Gydytų pacientų stebėjimo mediana buvo 59,5 mėn., intervalas nuo 10 iki 80 mėn. Ki-67 buvo nustatomas imunohistochemiškai, ribos 2,3-54,9%, vidurkis 16%. Pagrindinės ligonių charakteristikos pateiktos 5 lentelėje.

**5 lentelė. Retrospektyvinės grupės pacientų charakteristikos (gydytų ir negydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų charakteristikos)**

<b>Charakteristikos</b>	<b>Gydyti IFN-<math>\alpha</math> (n=33)</b>	<b>Negydyti IFN-<math>\alpha</math> (n=47)</b>
<b>Amžius: mediana, ribos</b>	60, 17-81	61, 34-89
<b>Lytis (vyrai/moterys)</b>	15/18	9/38
<b>Lokalizacija:</b>		
<b>Galva-kaklas</b>	1	9
<b>Liemuo</b>	16	12
<b>Galūnės</b>	16	26
<b>Naviko storis(Breslow )</b>		
<b>1,5-4 mm</b>	18	33
<b>&gt; 4 mm</b>	15	14
<b>Naviko infiltracija(Clark)</b>		
<b>III</b>	9	21
<b>IV</b>	22	20
<b>V</b>	2	6

#### **4.1.2 Prospektyvinė pacientų grupė**

Tiriant imunologinių rodiklių reikšmę buvo atliktas prospektyvinis tyrimas, kurį vykdant buvo surinkti 27 neišplitusia melanoma sergančių ligonių duomenys, jų amžiaus mediana buvo 52 metai (intervalas 24-85 metai). Melanoma sergančių pacientų grupėje buvo 22 moterys ir 5 vyrai. Pagrindinės ligonių charakteristikos pateiktos 6 lentelėje.

**6 lentelė. Prospektinės tiriamų pacientų grupės charakteristikos**

<i>Charakteristikos</i>	<i>Skaičius</i>
<b>Pacientų skaičius</b>	27
<b>Lytis</b>	
<b>Vyrai</b>	5
<b>Moterys</b>	22
<b>Amžius (metais)</b>	
<b>Mediana</b>	52
<b>Intervalas</b>	24-85
<b>Naviko storis(Breslow )</b>	
<b>≤1 mm</b>	10
<b>&gt;1≤2 mm</b>	7
<b>&gt;2&lt;4 mm</b>	6
<b>≥4 mm</b>	4

#### **4.1.3 Kontrolinė grupė**

Kontrolinę grupę sudarė 39 sveiki asmenys, jų amžiaus mediana buvo 55 metai (intervalas 24-84 metai). Melanoma sergančių pacientų grupėje buvo 22 moterys ir 5 vyrai. Pagrindinės charakteristikos apie kontrolinės grupės žmones pateikti 7 lentelėje.

**7 lentelė. Kontrolinės žmonių grupės charakteristikos**

<i>Charakteristikos</i>	<i>Skaičius</i>
<b>Žmonių skaičius</b>	39
<b>Lytis</b>	
<b>Vyrai</b>	19
<b>Moterys</b>	20
<b>Amžius (metais)</b>	
<b>Mediana</b>	58,5
<b>Vyrų</b>	59,5

<b>Moterų</b>	52
<b>Intervalas</b>	37-84
<b>Vyrų</b>	41-84
<b>Moterų</b>	37-82
<b>Sveiki kraujo donorai</b>	11
<b>Sergantys neaktyvių formų širdies ir kraujagyslių ligomis</b>	17
<b>Sergantys akmenlige</b>	4
<b>Sergantys stuburo ir sąnarių ligomis*</b>	3
<b>Kiti**</b>	5

\* 1 ligonis, sergantis periartritu, 1- artroze ir 1 besiskundžiantis stuburo skausmais;

\*\* 2 ligonės, kurioms yra gerybinė kiaušidės cista, 1 ligonis, kuriam yra gerybinė prostatos adenoma ir 1 ligonė, kuriai yra anemija.

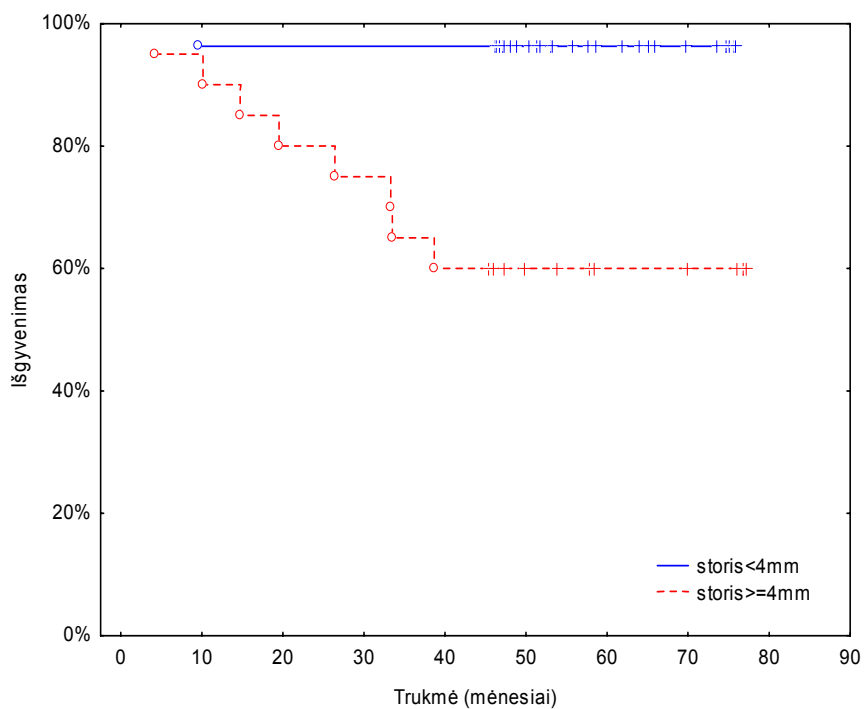
Duomenys surinkti 2000 metais.

#### **4.2 Pacientų išgyvenimo trukmės analizė**

Analizuota 80 neišplitusia melanoma sergančių ligonių išgyvenimo trukmė.

Buvo ištirta neišplitusia melanoma sergančių pacientų, negydytų IFN- $\alpha$ , išgyvenimo trukmė priklausomai nuo naviko storio (6 pav.).

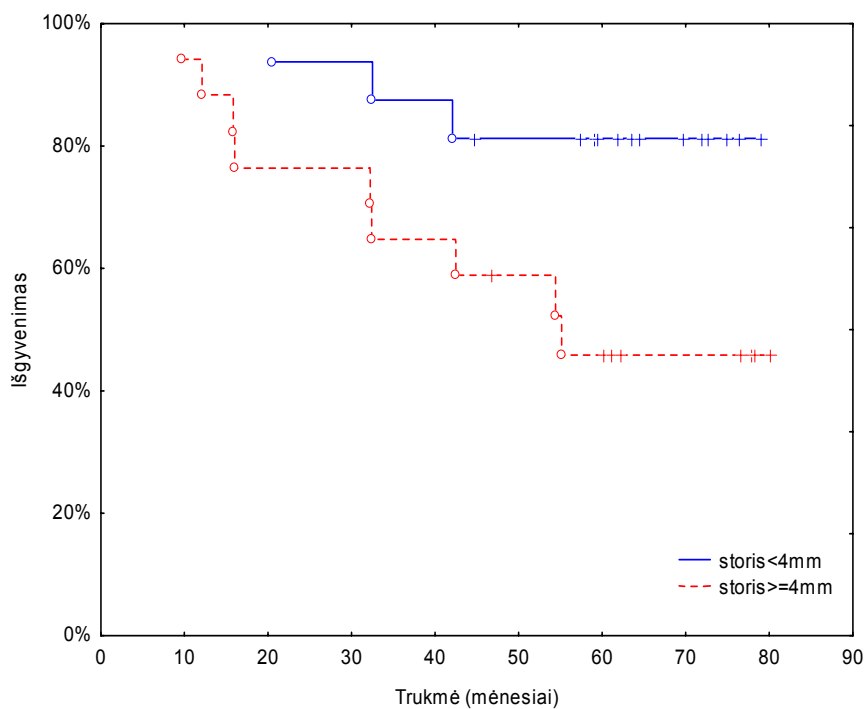




6 pav. Negydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių naviko storis  $<4$  mm ( $n=27$ ) ir  $\geq 4$  mm ( $n=20$ ), Kaplan-Meierio išgyvenimo kreivės ( $p=0,002$ ).

Negydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių naviko storis buvo  $<4$  mm, išgyvenimo trukmė buvo ilgesnė, stebėjimo mediana buvo 57 mėnesiai, pacientams, kurių naviko storis buvo  $\geq 4$  mm, stebėjimo mediana buvo 50 mėnesių.

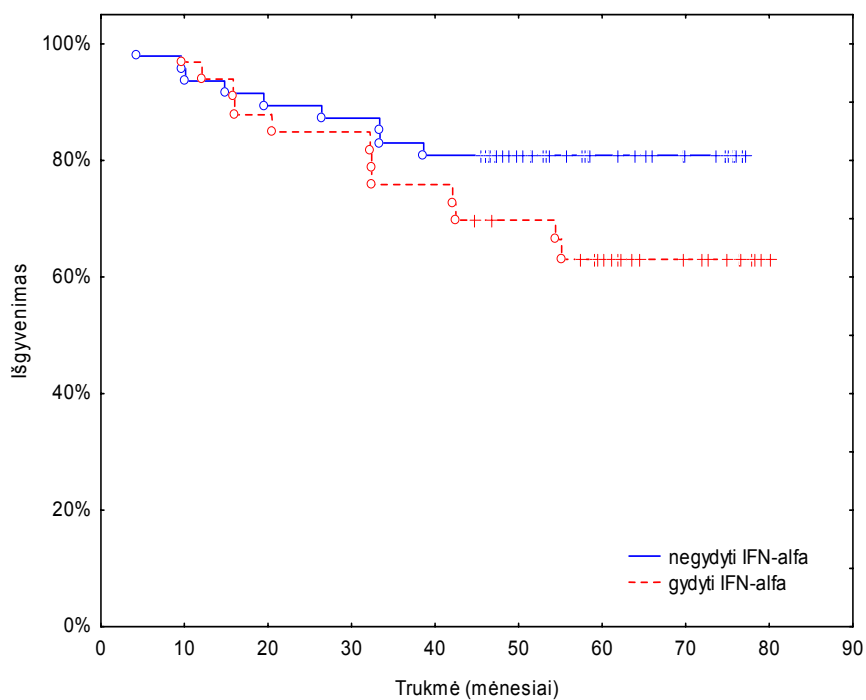
Buvo ištirtas neišplitusia melanoma sergančių pacientų, gydytų IFN- $\alpha$ , išgyvenimas priklausomai nuo naviko storio (7 pav.).



7 pav. Gydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių naviko storis  $<4$  mm ( $n=16$ ) ir  $\geq 4$  mm ( $n=17$ ), Kaplan-Meierio išgyvenimo kreivės ( $p=0,04$ ).

Gydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių naviko storis buvo  $<4$  mm išgyvenimo trukmė buvo ilgesnė, stebėjimo mediana buvo 64 mėnesiai, pacientams, kurių naviko storis buvo  $\geq 4$  mm stebėjimo mediana buvo 54 mėnesiai.

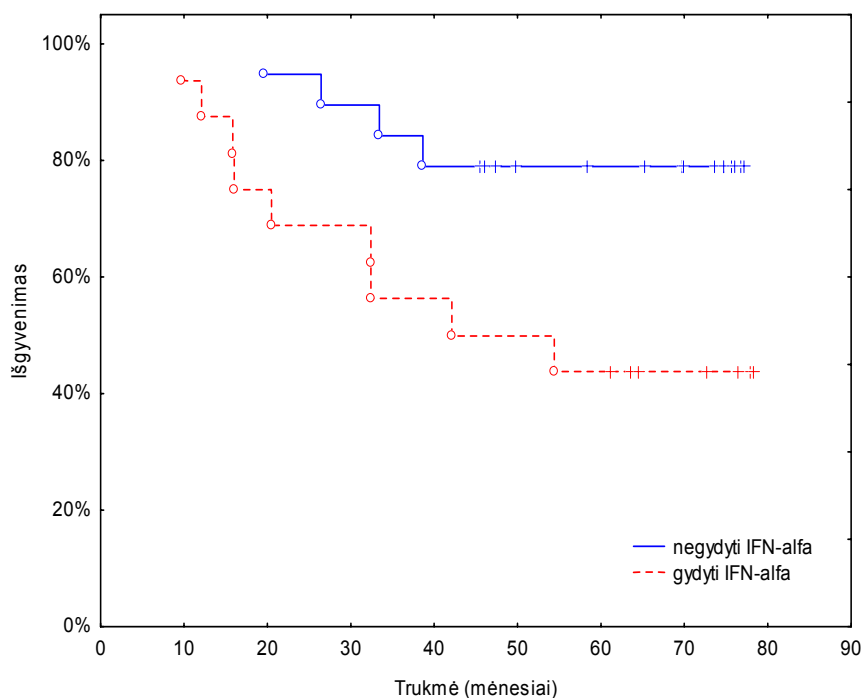
Pacientų išgyvenimo trukmė priklausomai nuo gydymo IFN- $\alpha$  pavaizduota 8 paveiksle.



8 pav. Gydytų IFN- $\alpha$  ( $n=33$ ) ir negydytų IFN- $\alpha$  ( $n=47$ ) neišplitusia melanoma sergančių pacientų Kaplan-Meierio išgyvenimo kreivės ( $p=0,14$ ).

Visų gydytų IFN- $\alpha$  pacientų išgyvenimo trukmė reikšmingai nesiskyrė nuo negydytų IFN- $\alpha$  pacientų išgyvenimo trukmės. Abiejų ligonių grupių išgyvenimo medianos duomenų analizės metu buvo dar nepasiektos.

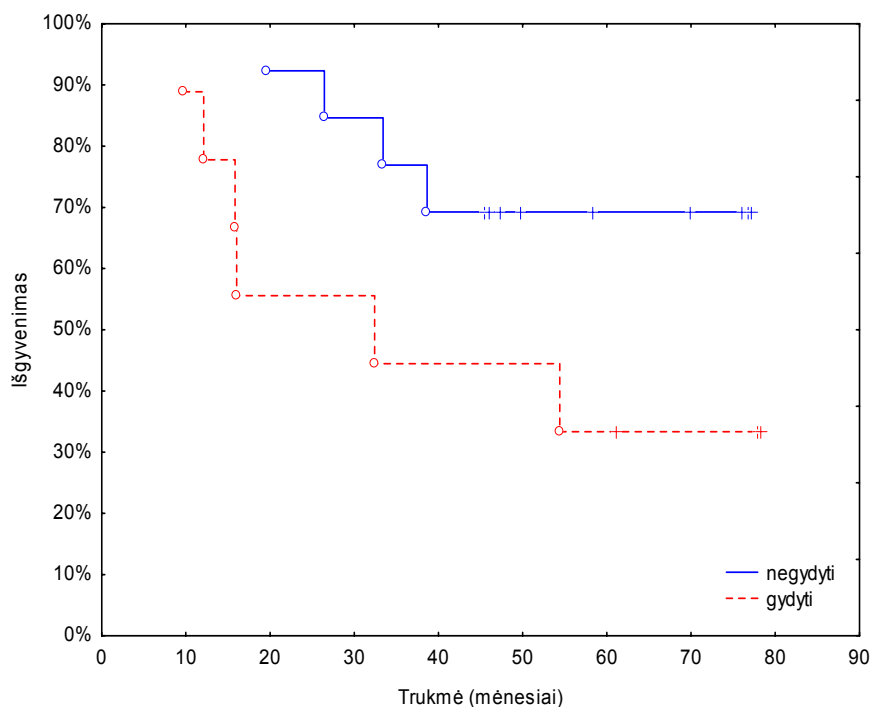
Buvo ištirtas negydytų ir gydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas  $\geq 16\%$  ląstelių, išgyvenimo trukmė (9 pav.).



9 pav. Gydytų IFN- $\alpha$  ( $n=16$ ) ir negydytų IFN- $\alpha$  ( $n=19$ ) neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 išreikštas  $\geq 16\%$  naviko ląstelių, Kaplan-Meierio išgyvenimo kreivės ( $p=0,03$ )

Gydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas  $\geq 16\%$  ląstelių, išgyvenimo mediana buvo 48,2 mėnesiai, o negydytų pacientų išgyvenimo mediana duomenų analizės metu buvo dar nepasiekta.

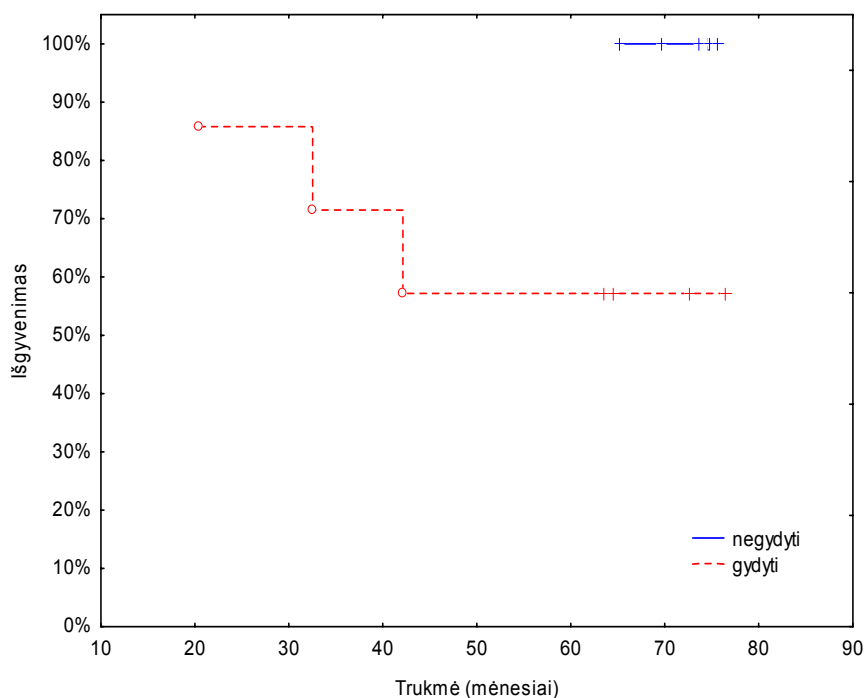
Negydytų ir gydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas  $\geq 16\%$  ląstelių ir naviko storis buvo  $\geq 4$  mm, išgyvenimas pateiktas 10 paveiksle.



10 pav. Gydytų IFN- $\alpha$ (n=9) ir negydytų IFN- $\alpha$ (n=13) neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 išreikštas  $\geq 16\%$  naviko ląstelių, Kaplan-Meierio išgyvenimo kreivės ( $p=0,08$ ). Navikų storis  $\geq 4$  mm

Gydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas  $\geq 16\%$  ląstelių ir naviko storis buvo  $\geq 4$  mm, išgyvenimo trukmės mediana buvo 24 mėnesiai, negydytų pacientų išgyvenimo mediana duomenų analizės metu taip pat buvo dar nepasiekta, stebėjimo mediana buvo 47 mėnesiai.

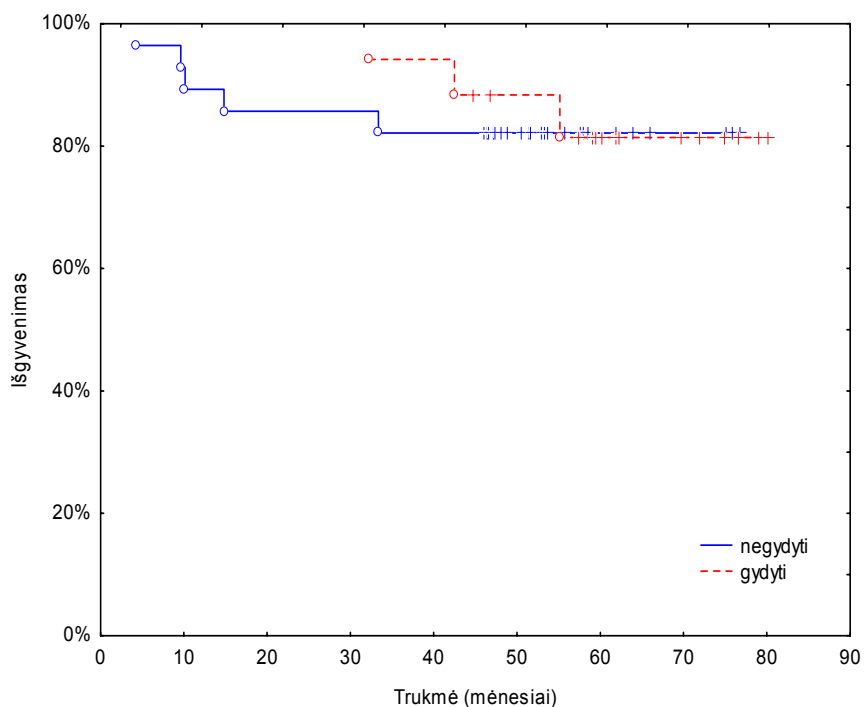
Negydytų ir gydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas  $\geq 16\%$  ląstelių ir naviko storis buvo  $< 4$  mm, išgyvenimo trukmė pateikta 11 paveiksle.



11 pav. Gydytų IFN- $\alpha$ ( $n=7$ ) ir negydytų IFN- $\alpha$ ( $n=5$ ) neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 išreikštas  $\geq 16\%$  naviko ląstelių, Kaplan-Meierio išgyvenimo kreivės ( $p=0,08$ ). Navikų storis  $< 4$  mm.

Gydytų ir negydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas  $\geq 16\%$  ląstelių ir naviko storis buvo  $< 4$  mm, išgyvenimo mediana duomenų analizės metu taip pat buvo dar nepasiekta. Negydytų pacientų stebėjimo mediana buvo 74 mėnesiai, gydytų pacientų stebėjimo mediana buvo 64 mėnesiai.

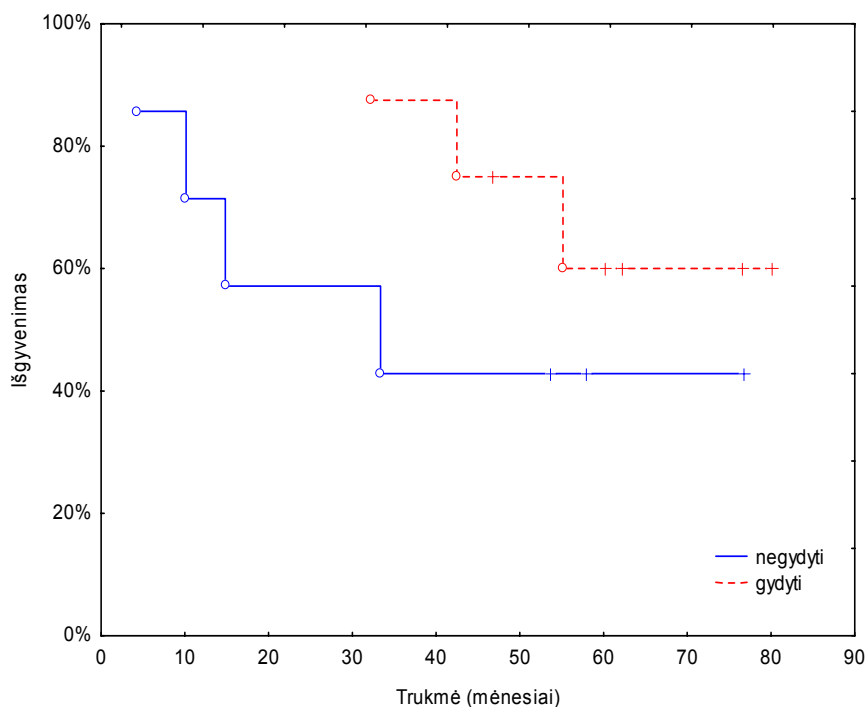
Negydytų ir gydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas  $< 16\%$  ląstelių išgyvenimas pateiktas 12 paveiksle.



12 pav. Gydytų IFN- $\alpha$ (n=17) ir negydytų IFN- $\alpha$ (n=28) neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 išreikštas <16% naviko ląstelių, Kaplan-Meierio išgyvenimo kreivės.

Gydytų ir negydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas <16% ląstelių, išgyvenimo mediana duomenų analizės metu buvo dar nepasiekta, negydytų pacientų stebėjimo mediana buvo 51 mėnesiai, gydytų pacientų stebėjimo mediana buvo 60 mėnesiai.

Buvo ištirta negydytų ir gydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas <16% ląstelių ir naviko storis buvo  $\geq 4$  mm, išgyvenimo trukmė (13 pav.).



13 pav. Gydytų IFN- $\alpha$  ( $n=8$ ) ir negydytų IFN- $\alpha$  ( $n=7$ ) neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 išreikštas <16% naviko ląstelių, Kaplan-Meierio išgyvenimo kreivės ( $p=0,27$ ). Navikų storis  $\geq 4$  mm.

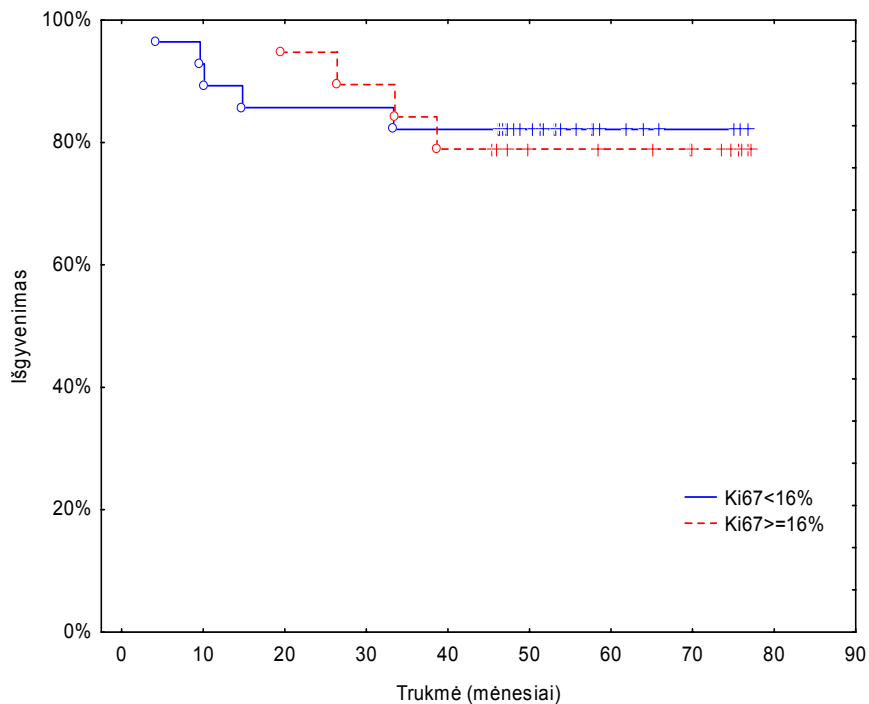
Gydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas <16% ląstelių ir naviko storis buvo  $\geq 4$  mm, išgyvenimo mediana duomenų analizės metu buvo dar nepasiekta, stebėjimo mediana buvo 57 mėnesiai, negydytų pacientų išgyvenimo mediana duomenų analizės metu taip pat buvo dar nepasiekta, stebėjimo mediana buvo 24 mėnesiai.

Gydytų ir negydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas <16% ląstelių ir naviko storis buvo <4 mm, susidaro grupės kuriose per mažai minėtus kriterijus atitinkančių ligonių, todėl palyginti pacientų išgyvenimo trukmės



negalime. Gydytų grupėje (n=9) gyvi visi ligoniai, stebėjimo mediana buvo 62 mėnesiai, negydytų pacientų (n=21)- 1 pacientas miręs, stebėjimo mediana – 52 mėnesiai.

Negydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų išgyvenimo trukmė priklausomai nuo Ki-67 režio pateikta 14 paveiksle.

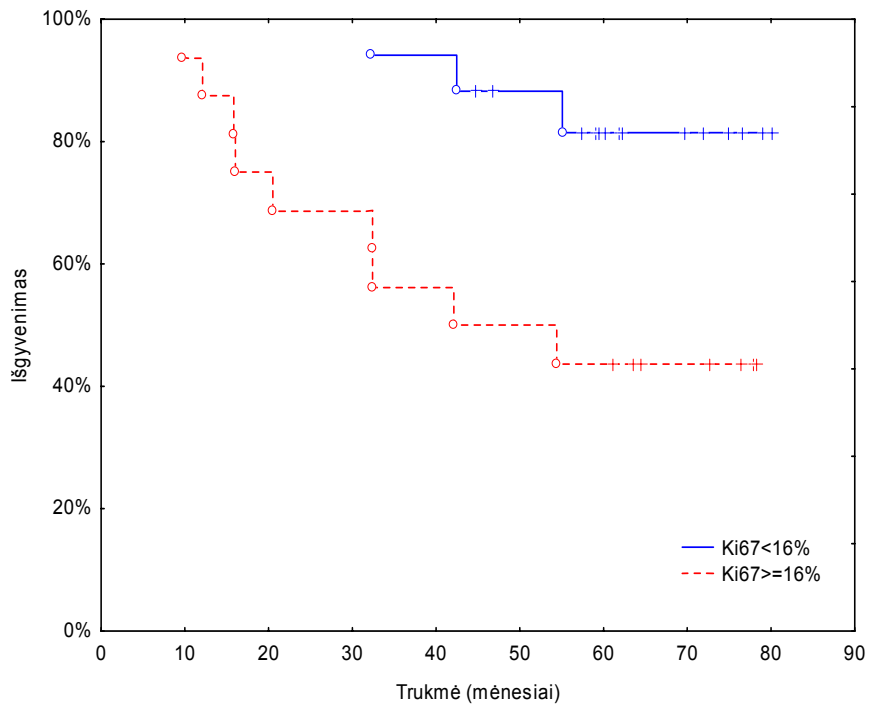


14 pav. Negydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 išreikštas < arba  $\geq 16\%$  naviko ląstelių, Kaplan-Meierio išgyvenimo kreivės ( $p=0,89$ ).

Negydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas <16% ląstelių, išgyvenimas nesiskyrė nuo pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas  $\geq 16\%$ . Abiejų grupių pacientų išgyvenimo mediana buvo nepasiekta, stebėjimo mediana buvo 26,7 mėnesiai pacientų, kurių Ki-67 buvo

išreikštas <16% ląstelių, ir 20,2 mėnesiai tų pacientų, kurių proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas  $\geq 16\%$  naviko ląstelių.

Gydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų išgyvenimas priklausomai nuo Ki-67 režio pateiktas 15 paveiksle.



15 pav. Gydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 išreikštas < arba  $\geq 16\%$  naviko ląstelių, Kaplan-Meierio išgyvenimo kreivės ( $p=0,016$ ).

Gydytų IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas <16% ląstelių, išgyvenimo mediana buvo nepasiekta (stebėjimo mediana – 41,2 mėnesio), o pacientų, kurių navikuose proliferacijos žymuo Ki-67 buvo išreikštas  $\geq 16\%$ , išgyvenimo mediana buvo 48,2 mėnesio.

Įvertinus lyties, naviko storio, Ki-67 raiškos ir amžiaus įtaką pacientų išgyvenimo trukmei naudojant Cox'o modelį, buvo nustatyta, kad išgyvenimo trukmė statistiškai reikšmingai priklauso nuo lyties ( $p = 0,008$ ; moterų išgyvenimo trukmė buvo ilgesnė) ir naviko storio ( $p = 0,049$ ; didėjant naviko storiui trumpėjo išgyvenimo trukmė). Gydytas IFN- $\alpha$ , proliferacijos žymens Ki-67 raiška naviko ląstelėse ir pacientų amžius statistiškai reikšmingos įtakos pacientų išgyvenimo trukmei neturėjo.

#### **4.3 Melanoma sergančių pacientų imunologinių rodiklių ypatumai**

Tiriant imunologinių rodiklių ypatumus buvo išanalizuoti 27 neišplitusia melanoma sergančių ligonių duomenys. Ligonų T limfocitų subpopuliacijų kiekiai periferiniame kraujyje pateikti 8 lentelėje.

**8 lentelė. Melanoma sergančių pacientų grupės T limfocitų subpopuliacijų kiekiai periferiniame kraujyje**

Eil.nr	monoc	limf	CD8	CD4	CD8hCD57+	CD8hCD57-	CD8low	CD8hCD57+%CD8	CD8hCD57-%CD8	CD8low%CD8
1	228	1110	556	827	177	202	177	31,8	36,4	31,8
2	215	1248	348	720	58	110	180	16,8	31,5	51,7
3	241	1436	355	859	75	175	106	21,1	49,2	29,8
4	305	2631	931	940	105	248	578	11,3	26,6	62,0
5	229	975	451	.	103	136	211	22,9	30,2	46,8
6	713	2487	773	1826	156	243	373	20,3	31,5	48,2
7	228	1569	624	1151	259	165	199	41,5	26,5	31,9
8	388	1833	460	921	58	133	270	12,6	28,8	58,6
9	238	1523	672	1007	146	170	355	21,7	25,4	52,9
10	324	1126	446	910	94	241	111	21,0	54,0	24,9
11	324	1544	599	944	130	243	226	21,6	40,7	37,7
12	247	736	240	441	47	32	161	19,5	13,4	67,1
13	328	1361	551	891	106	219	227	19,2	39,7	41,1
14	446	2684	852	1185	123	347	383	14,4	40,7	44,9
15	183	729	202	425	48	103	51	23,9	51,0	25,1
16	182	744	210	406	18	71	120	8,7	34,0	57,3
17	198	1714	576	1078	15	245	315	2,6	42,6	54,8
18	370	2029	1052	1452	121	441	491	11,5	41,9	46,6
19	302	930	316	629	57	227	31	18,1	72,1	9,8
20	228	1387	463	919	76	235	152	16,4	50,8	32,8
21	541	1788	1377	1173	274	326	776	19,9	23,7	56,4
22	336	1253	412	518	135	120	158	32,7	29,0	38,3
23	237	1616	560	1157	41	210	308	7,3	37,6	55,1
24	524	1557	599	1032	41	232	326	6,9	38,7	54,4
25	291	1478	336	681	111	116	109	33,0	34,5	32,5
26	292	1494	545	690	89	211	244	16,4	38,7	44,8
27	134	521	192	384	39	81	72	20,2	42,3	37,6

Neišplitusia melanoma sergančių ligonių periferiniame kraujyje monocitų vidurkis buvo 306 ląst/μl, intervalas (133,6-712,5) ląst/μl, limfocitų vidurkis 1463,1 ląst/μl, intervalas (520,8-2683,5) ląst/μl, CD8 limfocitų vidurkis buvo 544,3 ląst/μl, intervalas (191,5-1376,7) ląst/μl, CD4 limfocitų vidurkis buvo 891 ląst/μl, intervalas (384,4-1826,1) ląst/μl, CD8highCD57+ limfocitų vidurkis buvo 100,1 ląst/μl, intervalas (15,1-274,5) ląst/μl, CD8highCD57- limfocitų vidurkis buvo 195,7 ląst/μl, intervalas (32,2-441,0) ląst/μl, CD8low limfocitų vidurkis buvo 248,5 ląst/μl, intervalas (30,9-776,3) ląst/μl.

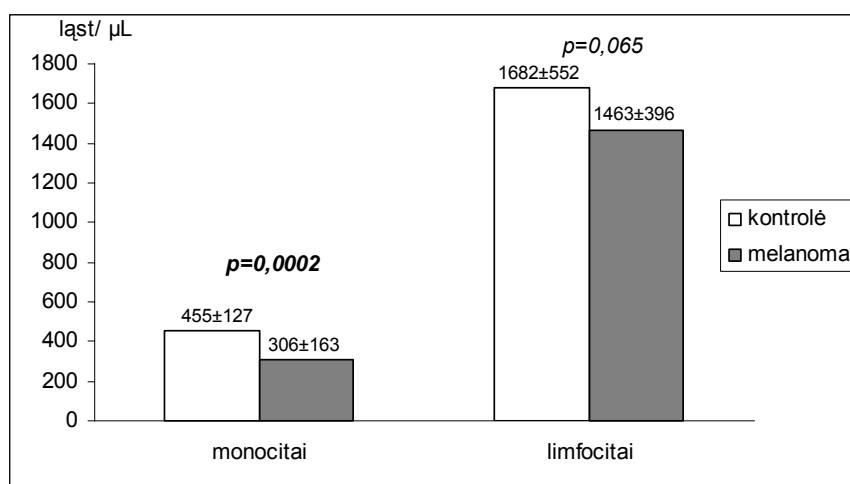
Neišplitusia melanoma sergančių ligonių duomenys buvo palyginti su kontrolinės grupės asmenų tyrimais. Kontrolinės grupės T limfocitų subpopuliacijų kiekiai periferiniame kraujyje pateikti 9 lentelėje.

**9 lentelė.** *Kontrolinės grupės T limfocitų subpopuliacijų kiekiai periferiniame kraujyje*

Eil.Nr.	monoc	limf	CD8	CD4	CD8hCD57+	CD8hCD57-	CD8low	CD8hCD57+%CD8	CD8hCD57-%CD8	CD8low%CD8
1	451	1583	640	551	252	204	184	39	32	29
2	882	2331	1103	809	438	545	119	40	49	11
3	290	1673	696	565	35	259	402	5	37	58
4	389	1764	538	792	282	109	146	52	20	27
5	466	1736	526	779	54	264	208	10	50	40
6	555	1982	815	765	305	218	291	37	27	36
7	446	909	318	341	65	114	140	20	36	44
8	613	1135	204	574	25	129	50	12	63	24
9	385	771	216	301	15	150	51	7	69	24
10	404	1479	583	600	126	383	74	22	66	13
11	405	1768	783	665	140	286	357	18	37	46
12	532	1944	663	818	175	327	161	26	49	24
13	434	1849	871	701	366	353	152	42	41	17
14	211	1875	654	902	266	316	72	41	48	11
15	432	1661	499	828	32	148	319	6	30	64
16	408	2042	534	885	49	221	264	9	41	49
17	264	1334	615	317	193	228	194	31	37	32
18	340	1738	593	672	55	365	173	9	62	29
19	548	2017	1051	651	276	736	39	26	70	4
20	158	1058	301	444	46	199	56	15	66	19
21	667	2139	687	889	177	322	188	26	47	27
22	254	1302	374	672	91	195	88	24	52	24
23	274	1667	572	661	109	321	143	19	56	25
24	282	1991	602	895	21	334	247	3	55	41
25	688	2064	557	877	43	390	124	8	70	22
26	429	2358	1170	625	215	658	297	18	56	25
27	358	1593	645	645	225	234	186	35	36	29
28	470	1646	487	663	63	245	179	13	50	37
29	669	1373	424	645	7	213	205	2	50	48
30	458	1984	490	1051	61	331	97	13	68	20
31	494	1537	513	592	91	161	261	18	31	51
32	177	1378	550	405	58	214	278	11	39	51
33	593	1800	569	832	32	130	407	6	23	72
34	630	2125	846	922	198	491	157	23	58	19
35	327	1766	482	811	111	230	141	23	48	29
36	616	1910	523	943	71	288	164	14	55	31
37	557	2068	614	893	163	163	287	27	27	47
38	764	1561	501	645	108	284	109	21	57	22
39	429	690	239	331	68	113	59	28	47	24

Kontrolinės grupės periferiniame kraujyje monocitų vidurkis buvo 455,1 ląst/μl, intervalas (158,2-882) ląst/μl, limfocitų vidurkis 1682,1 ląst/μl, intervalas (690,0-2358,4) ląst/μl, CD8 limfocitų vidurkis buvo 591 ląst/μl, intervalas (204,3-1169,8) ląst/μl, CD4 limfocitų vidurkis buvo 691,3 ląst/μl, intervalas (301,4-1051,3) ląst/μl, CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> limfocitų vidurkis buvo 130,9 ląst/μl, intervalas (6,9-438,2) ląst/μl, CD8<sup>high</sup>CD57<sup>-</sup> limfocitų vidurkis buvo 278,8 ląst/μl, intervalas (109,4-736,2) ląst/μl, CD8<sup>low</sup> limfocitų vidurkis buvo 181,3 ląst/μl, intervalas (39,3-406,8) ląst/μl.

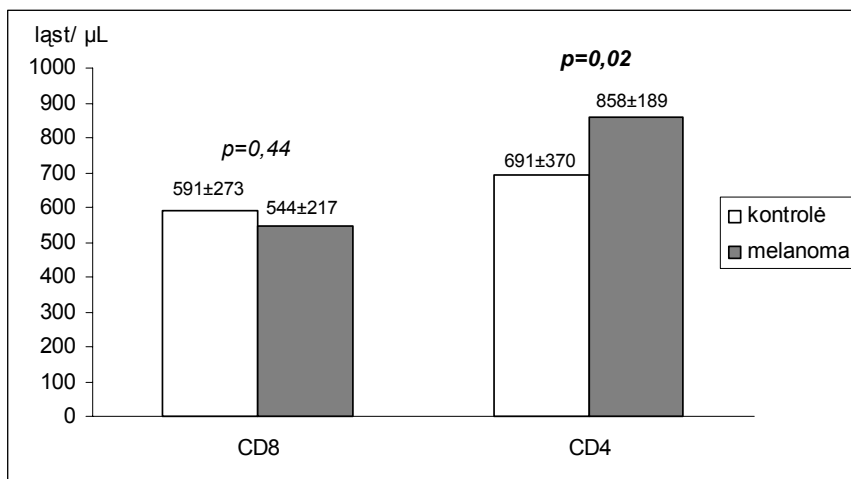
Buvo ištirta neišplitusia melanoma sergančių pacientų ir kontrolinės grupės asmenų monocitų ir limfocitų kiekiai periferiniame kraujyje (16 pav.).



16 pav. Limfocitų ir monocitų pakitimai periferiniame kraujyje kontrolinėje ir melanoma sergančiųjų grupėse.

Palyginti su kontrolinės grupės duomenimis, melanoma sergančių pacientų kraujyje monocitų kiekis buvo sumažėjęs, o limfocitų kiekis reikšmingai nesiskyrė.

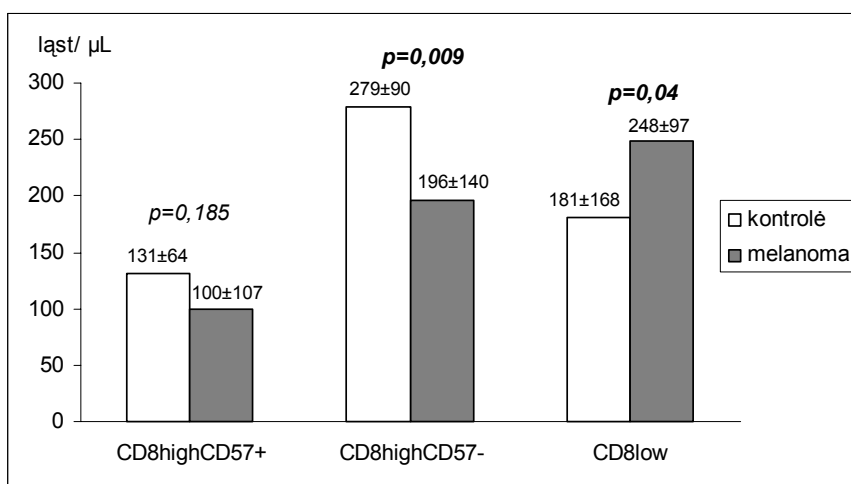
17 paveiksle parodyti periferinio kraujo T limfocitų kiekiai neišplitusia melanoma sergančių pacientų ir sveikų asmenų grupėse.



17 pav. T limfocitų pakitimai periferiniame kraujyje kontrolinėje ir melanoma sergančiųjų grupėse.

Melanoma sergančių pacientų kraujyje CD4+ limfocitų kiekis buvo didesnis negu kontrolinės grupės asmenų kraujyje, tuo tarpu CD8+ limfocitų kiekiai abiejose grupėse reikšmingai nesiskyrė.

Buvo ištirta CD8+ limfocitų populiacijos vidinės struktūros ypatumai neišplitusia melanoma sergančių pacientų ir kontrolinės grupės asmenų periferiniame kraujyje (18 pav.).



18 pav. T limfocitų subpopuliacijų pakitimai periferiniame kraujyje kontrolinėje ir melanoma sergančiųjų grupėse.

CD8highCD57+ limfocitų subpopuliacijos kiekiai abiejose grupėse reikšmingai nesiskyrė. CD8highCD57- limfocitų kiekis melanoma sergančių pacientų grupėje buvo sumažėjęs, palyginti su sveikų asmenų, o CD8low limfocitų melanoma sergančių pacientų grupėje buvo reikšmingai daugiau.

#### 4.4 Melanoma sergančių pacientų naviko proliferacijos ir imunologinių rodiklių sąsajos

Tiriant imunologinių rodiklių sąsajas su Ki-67 buvo išanalizuoti 21 neišplitusia melanoma sergančio ligonio duomenys. Ligonų T limfocitų subpopuliacijų periferiniame kraujyje duomenys iki operacijos pateikti 10 ir 11 lentelėse.



**10 lentelė. I tyrimo(iki operacijos) imunologinių tyrimų rezultatai**

Eil.nr	WBC	monoc	limf	CD8	CD4	CD8hCD57+	CD8hCD57-	CD8low
1	4935	227,5	1109,9	556,2	827,0	176,9	202,2	177,0
2	7980	214,7	1248,1	348,5	720,1	58,4	109,8	180,2
3	3885	247,5	735,8	239,9	441,3	46,8	32,2	160,9
4	5093	328,0	1361,4	551,5	890,7	105,8	219,0	226,7
5	8400	304,9	2630,9	931,3	940,0	105,5	248,1	577,7
6	7245	446,3	2683,5	852,0	1184,5	122,6	346,7	382,7
7	5408	182,8	729,0	202,4	425,2	48,3	103,3	50,8
8	4830	291,2	1478,0	335,9	681,3	110,8	115,9	109,2
9	4620	198,2	1713,6	575,8	1078,0	15,1	245,2	315,5
10	6720	370,3	2029,4	1052,3	1452,1	120,5	441,0	490,7
11	4358	301,6	930,4	315,6	628,7	57,2	227,5	30,9
12	7770	712,5	2487,2	772,5	1826,1	156,4	243,5	372,6
13	3780	228,3	1387,3	462,9	918,9	75,7	235,3	151,9
14	9030	540,9	1787,9	1376,7	1172,5	274,4	325,9	776,3
15	7403	336,1	1253,3	411,8	518,0	134,7	119,6	157,5
16	5355	387,7	1833,0	460,5	920,7	58,1	132,7	269,6
17	4988	236,9	1615,6	559,6	1157,3	41,0	210,4	308,3
18	4515	237,9	1523,4	671,8	1006,8	146,1	170,5	355,2
19	4778	323,9	1125,7	445,6	909,7	93,8	240,8	111,0
20	5145	292,2	1494,1	544,8	689,7	89,5	211,0	244,3
21	4410	133,6	520,8	191,5	384,4	38,6	80,9	72,0

**11 lentelė. I tyrimo (iki operacijos) imunologinių tyrimų rezultatai**

Eil.nr	CD8hCD57+%CD8	CD8hCD57-%CD8	CD8low%CD8	CD4CD57+%	CD25+Foxp3%CD4	CD4CD25Fxp3
1	31,8	36,4	31,8	21,2	7,75	64,1
2	16,8	31,5	51,7	9,63	3,66	26,4
3	19,5	13,4	67,1	16,15	3,88	17,1
4	19,2	39,7	41,1	13,66	11,06	98,5
5	11,3	26,6	62,0	4,09	5,04	47,4
6	14,4	40,7	44,9	3,77	3,04	36,0
7	23,9	51,0	25,1	9,34	6,53	27,8
8	33,0	34,5	32,5	2,79	12,6	85,8
9	2,6	42,6	54,8	2,04	15	161,7
10	11,5	41,9	46,6	10,53	4,23	61,4
11	18,1	72,1	9,8	10,7	7,69	48,3
12	20,3	31,5	48,2	14,18	5,16	94,2
13	16,4	50,8	32,8	10,07	5,27	48,4
14	19,9	23,7	56,4	23,73	14,38	168,6
15	32,7	29,0	38,3	1,48	6,99	36,2
16	12,6	28,8	58,6	8,87	13,46	123,9
17	7,3	37,6	55,1	4,66	8,69	100,6
18	21,7	25,4	52,9	25,39	4,22	42,5
19	21,0	54,0	24,9	16,65	9,58	87,1
20	16,4	38,7	44,8	10,17	15,22	105,0
21	20,2	42,3	37,6	14,63	0,83	3,2

Pacientams iki operacijos periferiniame kraujyje monocitų vidurkis buvo 309,1 ląst/μl, intervalas (131,3-545,4) ląst/μl, limfocitų vidurkis 1500,2 ląst/μl, intervalas (582,8-2828,2) ląst/μl, CD8 limfocitų vidurkis buvo 581,6 ląst/μl, intervalas (198,1-2177,7) ląst/μl, CD4 limfocitų vidurkis buvo 909,1 ląst/μl, intervalas (364,4-1854,7) ląst/μl, CD8highCD57+ limfocitų vidurkis buvo 107,5 ląst/μl, intervalas (9,6-434,1) ląst/μl, CD8highCD57- limfocitų vidurkis buvo 209 ląst/μl, intervalas (26,6-515,6) ląst/μl, CD8low limfocitų vidurkis buvo 265,1 ląst/μl, intervalas (42,0-434,3) ląst/μl.

Ligonų T limfocitų subpopuliacijų tyrimai periferiniame kraujyje po operacijos pateikti 12 ir 13 lentelėse.

**12 lentelė. II tyrimo(po operacijos) imunologinių tyrimų rezultatai**

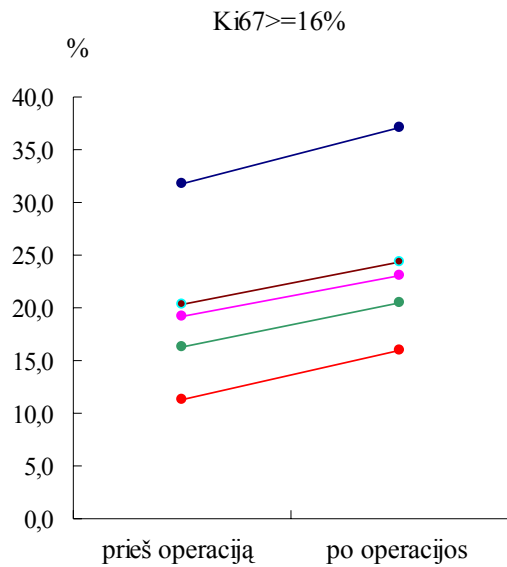
Eil.nr	WBC	limf	MONOC	CD8	CD4	CD8hCD57+	CD8hCD57-	CD8low
1	4463	962,2	219,6	548,8	660,4	203,2	168,6	177,0
2	8190	2062,2	323,5	554,3	1419,6	116,9	197,6	239,8
3	5093	1118,4	274,5	269,0	559,9	72,0	31,8	165,2
4	4673	1277,1	314,5	559,5	811,6	128,9	238,1	192,6
5	5723	1364,9	253,5	409,6	789,3	65,7	140,0	203,9
6	4670	1379,1	243,8	394,3	1014,3	52,3	167,3	174,7
7	5933	1089,3	299,6	377,8	825,6	94,0	193,8	90,0
8	4778	1279,5	247,5	300,8	775,7	97,4	95,7	107,7
9	5513	1866,7	273,4	685,1	1063,5	14,0	268,2	402,8
10	7455	1895,1	328,0	1002,5	796,1	109,9	388,3	504,3
11	3203	909,0	274,2	268,2	540,0	45,9	180,7	41,5
12	7665	1190,4	552,6	332,8	691,6	81,3	100,8	150,7
13	4253	1419,2	230,9	403,9	777,0	82,6	196,6	124,7
14	6900	1707,1	378,8	1221,1	1064,0	215,1	343,6	662,3
15	7088	1628,8	443,0	604,3	982,2	179,2	175,1	250,0
16	8925	2602,5	720,2	540,0	1484,7	50,5	183,5	306,1
17	4305	1648,4	201,5	452,0	1213,4	40,6	251,9	159,6
18	5145	1992,7	344,2	915,4	1385,9	205,0	231,9	478,4
19	6930	1756,1	581,4	1129,9	1309,0	177,4	356,5	596,0
20	3203	1143,8	152,1	449,4	551,4	108,5	174,8	166,1
21	4620	1217,4	209,7	409,3	950,9	95,3	165,4	148,5

**13 lentelė. II tyrimo(po operacijos) imunologinių tyrimų rezultatai**

Eil.nr	CD4CD57+%	CD25+Foxp3%CD4	CD4CD25Foxp3	CD8hCD57+%CD8	CD8hCD57-%CD8	CD8low%CD8
1	22,98	4,58	30,2	37,0	30,7	32,2
2	11,42	2,65	37,6	21,1	35,6	43,3
3	6,21	6,03	33,8	26,8	11,8	61,4
4	13,77	12,83	104,1	23,0	42,5	34,4
5	7,67	12,74	100,6	16,0	34,2	49,8
6	11,19	5,06	51,3	13,3	42,4	44,3
7	13,62	10,17	84,0	24,9	51,3	23,8
8	10,23	5,45	42,3	32,4	31,8	35,8
9	1,17	8,27	87,9	2,0	39,2	58,8
10	2,38	10,66	84,9	11,0	38,7	50,3
11	7,86	9,48	51,2	17,1	67,4	15,5
12	9,56	7,71	53,3	24,4	30,3	45,3
13	5,78	7,96	61,9	20,4	48,7	30,9
14	16,2	10,47	111,4	17,6	28,1	54,2
15	14,2	9,31	91,4	29,6	29,0	41,4
16	6,74	7,77	115,4	9,3	34,0	56,7
17	4,1	7,47	90,6	9,0	55,7	35,3
18	28,25	9,29	128,7	22,4	25,3	52,3
19	16,67	6,85	89,7	15,7	31,6	52,8
20	13,3	5,55	30,6	24,2	38,9	37,0
21	18,35	3,14	29,9	23,3	40,4	36,3

Pacientams po operacijos periferiniame kraujyje monocitų vidurkis buvo 327 ląst/μl, intervalas (152,1-720,3) ląst/μl, limfocitų vidurkis 1500,5 ląst/μl, intervalas (909,0-2602,5) ląst/μl, CD8 limfocitų vidurkis buvo 563,2 ląst/μl, intervalas (268,2-1221,1) ląst/μl, CD4 limfocitų vidurkis buvo 936,5 ląst/μl, intervalas (540,0-1484,7) ląst/μl, CD8highCD57+ limfocitų vidurkis buvo 106,5 ląst/μl, intervalas (14-215,1) ląst/μl, CD8highCD57- limfocitų vidurkis buvo 202,4 ląst/μl, intervalas (31-388,3) ląst/μl, CD8low limfocitų vidurkis buvo 254,4 ląst/μl, intervalas (41,5-662,3) ląst/μ.

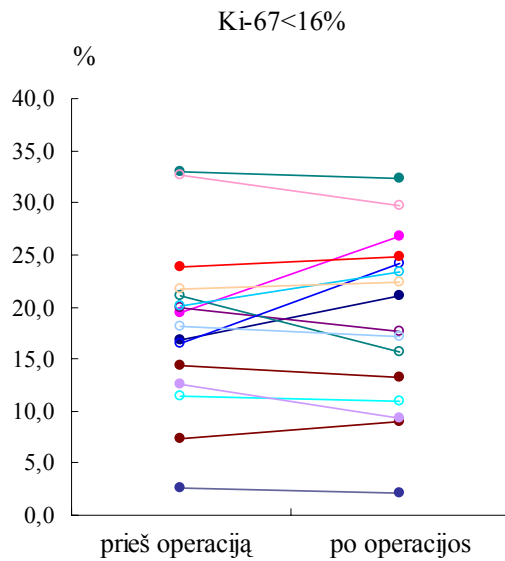
Buvo ištirta neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių naviko proliferacijos žymuo Ki-67 $\geq$ 16%, CD8highCD57+ limfocitų subpopuliacijos pakitimai prieš ir po operacijos (19 pav.)



19 pav. *CD8highCD57+* limfocitų kiekio pakitimai *CD8+* limfocitų populiacijoje prieš ir po operacijos, kai naviko proliferacijos žymenų Ki-67 $\geq$ 16%.

Po operacijos visems pacientams (n=5) pasireiškė *CD8highCD57+* limfocitų subpopuliacijos didėjimas.

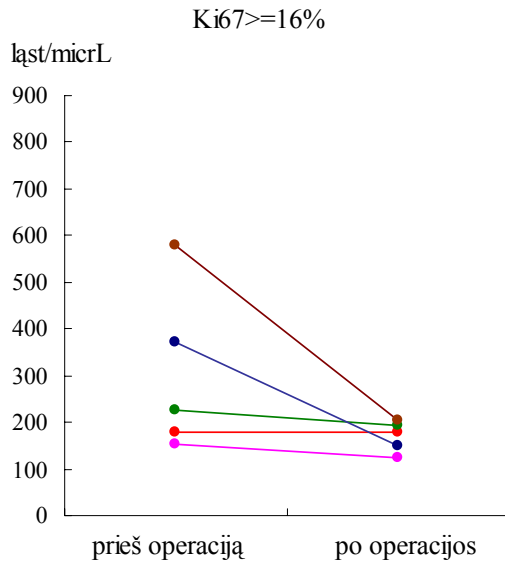
Pacientų, kurių naviko proliferacijos žymuo Ki-67<16%, *CD8highCD57+* limfocitų subpopuliacijos pakitimai prieš ir po operacijos parodyti 20 paveiksle.



20 pav. *CD8highCD57+ limfocitų kiekio pakitimai CD8+ limfocitų populiacijoje prieš(I) ir po operacijos(II), kai naviko proliferacijos žymenų Ki-67<16%.*

Po operacijos 8 pacientų CD8highCD57+ limfocitų subpopuliacija buvo sumažėjusi ir 7 pacientų buvo padidėjusi.

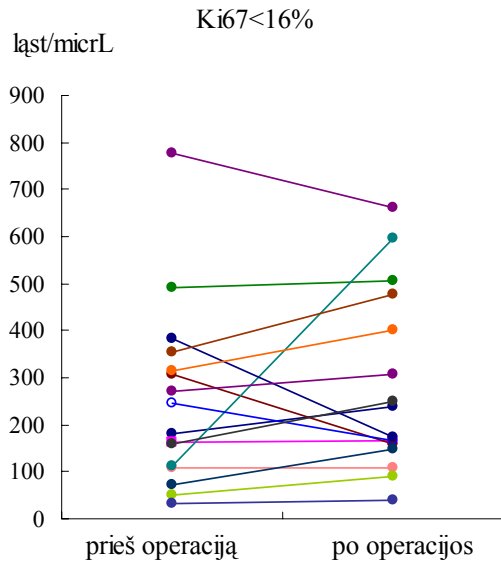
Buvo ištirta neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių naviko proliferacijos žymuo  $Ki-67 \geq 16\%$ , CD8low T limfocitų subpopuliacijos pakitimai prieš ir po operacijos (21 pav.).



21 pav. CD8low T limfocitų subpopuliacijos pakitimai prieš(I) ir po operacijos(II), kai naviko proliferacijos žymenų Ki-67 $\geq$ 16%.

Po operacijos visų pacientų (n=5).CD8low limfocitų subpopuliacija buvo sumažėjusi.

CD8low T limfocitų subpopuliacijos pakitimai prieš ir po operacijos tų pacientų, kurių naviko proliferacijos žymuo Ki-67<16%, parodyti 22 paveiksle.

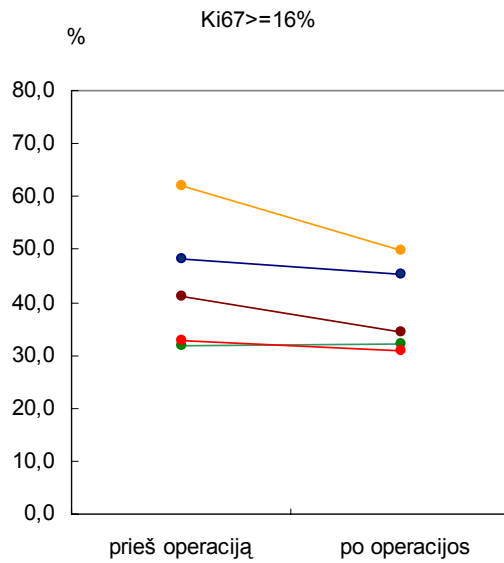


22 pav. CD8low T limfocitų subpopuliacijos pakitimai prieš(I) ir po operacijos(II), kai naviko proliferacijos žymenų Ki-67<16%).

Po operacijos 4 pacientų CD8low limfocitų subpopuliacija buvo sumažėjusi ir 12 pacientų buvo padidėjusi.

Buvo ištirta neišplitusia melanoma sergančių pacientų, kurių naviko proliferacijos žymuo Ki-67 $\geq$ 16%, CD8low T limfocitų subpopuliacijos procento CD8+ populiacijoje pakitimai prieš ir po operacijos (23 pav.).

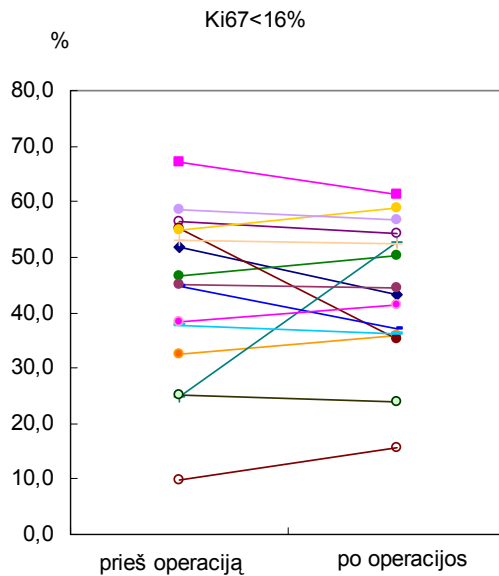




23 pav. CD8low limfocitų kiekio pakitimai CD8+ limfocitų populiacijoje prieš(I) ir po operacijos(II), kai naviko proliferacijos žymenų Ki-67 $\geq$ 16%.

Po operacijos 4 pacientų CD8low limfocitų subpopuliacija buvo sumažėjusi ir 1 paciento buvo padidėjusi.

Pacientų, kurių naviko proliferacijos žymuo Ki-67<16%, CD8low limfocitų subpopuliacijos pakitimai parodyti 24 paveiksle.



24 pav. CD8low limfocitų kiekio pakitimai CD8+ limfocitų populiacijoje prieš(I) ir po operacijos(II), kai naviko proliferacijos žymenų Ki-67<16%.

Po operacijos 10 pacientų CD8low limfocitų subpopuliacija buvo sumažėjusi ir 6 pacientų buvo padidėjusi.

## 5. REZULTATŲ APTARIMAS

Neišplitusia melanoma sergančių ligonių gydymas IFN- $\alpha$  nesilaikant atrankos kriterijų (neindividualizuotas), mūsų duomenimis, nepagerina ligonių išgyvenimo trukmės. Mūsų duomenys atitinka 2002 metais Marko B. Lenso ir Martino Daweso atlikto 9 atsitiktinės atrankos kontrolinių tyrimų metaanalizės rezultatus, apibendrinančius duomenis apie melanoma sergančių pacientų gydymo IFN- $\alpha$  efektyvumą. Tik viename tyrime buvo patvirtinti teigiami gydymo IFN- $\alpha$  rezultatai laikotarpiu iki ligos progresavimo pradžios, o išgyvenimo trukmei teigiamos įtakos nustatyta nebuvo (1).

Yra nemažai informacijos apie Ki-67 įtaką melanomos prognozei, tačiau ši informacija prieštaringa (9,10,67). Mūsų tyrimai neparodė Ki-67 raiškos navike prognozinės reikšmės negydytiems IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergantiems pacientams, kurių naviko storis  $\geq 1,5$  mm. Kitų autorių duomenimis, Ki-67 raiška tiesiogiai koreliuoja su naviko metastazavimu ir pacientų išgyvenimo trukme (10,62,117,118) tačiau nurodoma, kad proliferacinio aktyvumo reikšmė priklauso nuo naviko storio ir, pasiekus navikui 1,5-2,0 mm storį, Ki-67 praranda prognozinę vertę (8). Mūsų rezultatai atitinka šių autorių duomenis.

Iki šiol Ki-67 žymens reikšmė adjuvantinį gydymą IFN- $\alpha$  gavusiems melanoma sergantiems ligoniams nebuvo tirta. Mūsų darbe pirmą kartą buvo nustatyta, kad gydymo IFN- $\alpha$  efektyvumas gali priklausyti nuo pirminio naviko augimo frakcijos, išmatuotos Ki-67 žymens raiška, dydžio. Taigi gydytiems IFN- $\alpha$  neišplitusia melanomas sergantiems pacientams Ki-67 žymuo įgyja prediktyvinę reikšmę. Gydytiems IFN- $\alpha$  pacientams, kai Ki-67 > 16%, išgyvenimo trukmė buvo statistiškai reikšmingai trumpesnė. Kadangi pacientų skaičius mūsų tyrime nebuvo labai didelis (n=33), reikia pripažinti, kad didesnio pacientų skaičiaus tyrimai gali ir nepatvirtinti melanoma sergančių pacientų išgyvenimą trumpinančio IFN- $\alpha$  poveikio. Šiaip ar taip, mažai tikėtina, kad gydymas interferonu alfa gali pailginti pacientų, kurių navikuose Ki-67 raiška yra didesnė negu 16%, išgyvenimą. Mūsų duomenimis, gydyti IFN- $\alpha$  pacientai, kurių naviko storis buvo > 4 mm, o Ki-67 raiška navikuose buvo < 16%, išgyveno ilgiau negu negydyti Ki-67, nors skirtumas ir nebuvo statistiškai reikšmingas. Šiems rezultatams patvirtinti reikalingi didesnio pacientų skaičiaus perspektyviniai atsitiktinės atrankos tyrimai.

Kad nustatytume, ar neišplitusia melanoma sergančių pacientų imuninėje sistemoje atsiranda pokyčių, mes palyginome melanoma sergančių pacientų ir kontrolinės grupės individų imunologinius rodiklius. Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad neišplitusia melanoma sergančių pacientų periferiniame

kraujyje sumažėja monocitų, o limfocitų kiekis reikšmingai nesiskiria nuo sveikų asmenų limfocitų kiekio. Atlikus detalesnę T limfocitų analizę, pavyko atskleisti ryškius atskirų limfocitų subpopuliacijų skirtumus tarp pacientų ir kontrolinės grupės asmenų.

Melanoma sergančių pacientų kraujyje nustatytas padidėjęs CD4+ limfocitų kiekis. CD4+ limfocitai yra helperiai/induktoriai, būtini imuninio atsako iniciacijai. Tačiau į CD4+ subpopuliaciją įeina ir T reguliaciniai limfocitai (CD4+CD25+FoxP3+), kurių kiekis yra padidėjęs melanoma sergančių pacientų kraujyje ir kurie gali mažinti priešvėžinių imuninių reakcijų efektyvumą (119,120).

Šiame darbe daugiau dėmesio buvo skirta CD8+ limfocitų populiacijai, kadangi citotoksiniai CD8+ limfocitai vaidina pagrindinį vaidmenį eliminuojant navikines ir virusu infekuotas ląsteles (121). CD8<sup>high</sup>CD57+ limfocitai gali pasižymėti ryškiu citotoksiškumu, nors jų proliferacinis aktyvumas ir sumažėjęs (122). Kiti autoriai nurodo, kad šita subpopuliacija gali pasižymėti ir supresinėmis savybėmis (123,124). Yra duomenų, kad gydomų IFN- $\alpha$  melanoma sergančių pacientų, kuriems yra metastazių sritiniuose limfmazgiuose, kraujyje didėjant CD8<sup>high</sup>CD57+ limfocitų kiekiui išgyvenimo trukmė darosi ilgesnė. Taigi, sergant melanoma ir esant metastazių sritiniuose limfmazgiuose, CD8<sup>high</sup>CD57+ limfocitai, matyt, atlieka citotoksinę funkciją (84,85). Mūsų tyrime nenustatėme ryškesnių šios subpopuliacijos kiekio skirtumų tarp melanoma sergančių pacientų ir kontrolinės grupės individų. CD57 antigeno raiška, priešingai, susijusi su kostimuliacinės molekulės CD28 raiška CD8+ limfocito paviršiuje (125). CD8<sup>high</sup>CD57- limfocitai turi kostimuliacinę molekulę CD28 ir todėl gali proliferuodami reaguoti į antigeno signalą. Iš šių limfocitų išsivysto citotoksinių limfocitų populiacija. Mūsų rezultatai rodo, kad neišplitusia melanoma sergančių pacientų kraujyje CD8<sup>high</sup>CD57- limfocitų yra

statistiškai reikšmingai mažiau negu sveikų asmenų kraujyje. Taigi melanoma sergančių pacientų CD8<sup>+</sup> limfocitų citotoksinės funkcijos yra susilpnėjusios.

Duomenų apie CD8<sup>low</sup> limfocitų subpopuliaciją yra palyginti nedaug, tačiau, kai kurių autorių duomenimis, šių limfocitų proliferacijos atsakas į T limfocito receptoriaus surišimą paprastai būna menkas (126). Mūsų duomenys rodo, kad neišplitusia melanoma sergančių pacientų kraujyje CD8<sup>low</sup> limfocitų yra reikšmingai daugiau negu kontrolinės grupės asmenų kraujyje.

Taigi, mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad neišplitusia melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje yra sumažėję monocitų, padaugėję CD4<sup>+</sup> limfocitų ir pakitusi CD8<sup>+</sup> limfocitų populiacijos vidinė struktūra. Neišplitusia melanoma sergančių pacientų CD8<sup>+</sup> populiacijoje yra sumažėję potencialiai citotoksinių CD8<sup>high</sup>CD57<sup>-</sup> limfocitų ir padaugėję disfunkcinių CD8<sup>low</sup> limfocitų. Kadangi mūsų tirtų melanoma sergančių pacientų navikai buvo palyginti maži, mažai tikėtina, kad nustatyti imuninės sistemos pokyčiai yra sukelti navikinio proceso. Galima išskirti prielaidą, kad šie imuninės sistemos pokyčiai sudarė sąlygas atsirasti ar vystytis navikams.

Tiriant Ki-67 raišką navikuose buvo nustatyta, kad šis žymuo įgyja prediktyvinę reikšmę neišplitusia melanoma sergantiems pacientams, gydytiems IFN- $\alpha$ . Kadangi vienas iš pagrindinių IFN- $\alpha$  veikimo mechanizmų yra poveikis imuninei sistemai, buvo ištirtas Ki-67 raiškos navike ryšys su imunine sistema. Tuo tikslu buvo tirta imuninės sistemos būklė prieš ir po operacijos. Tyrimo rezultatai rodo, kad Ki-67 raiškai navike esant  $\geq 16\%$ , imuninės sistemos rodiklių pokyčiai yra vienos krypties. Po operacijos padidėjo visų tirtų pacientų (n=5) CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> limfocitų subpopuliacijos ląstelių procentas CD8<sup>+</sup> limfocitų populiacijoje, o CD8<sup>low</sup> limfocitų subpopuliacijos ląstelių kiekis visų pacientų sumažėjo. Esant Ki-67 raiškai navikuose  $< 16\%$  imuninės sistemos atsakas jau nebuvo vienos krypties. Pašalinus melanomos naviką tarp limfocitų subpopuliacijų buvo tiek

padidėjusių, tiek ir sumažėjusių reikšmių. Tai rodo, kad imuninė sistema neabejotinai reaguoja į didelės proliferacijos ( $Ki-67 \geq 16\%$ ) melanomos navikus. Esant mažesnei naviko augimo frakcijai ( $Ki-67 < 16\%$ ), matyt, imuninės sistemos rodikliams didesnę įtaką gali daryti kiti faktoriai.

Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad gydant  $IFN-\alpha$  pacientus, kurių navikų proliferacijos žymens  $Ki-67$  raiška buvo  $\geq 16\%$ , statistiškai reikšmingai sumažėjo jų išgyvenimo trukmė. Kaip matome iš aprašytų duomenų, pacientams, kurių navikų proliferacijos žymens  $Ki-67$  raiška buvo  $\geq 16\%$ , po naviko pašalinimo padidėjo citotoksinių ir sumažėjo disfunkcinių limfocitų. Taigi galima daryti prielaidą, kad pašalinus naviką, tokių pacientų imuninė sistema suaktyvėja. Tokiems pacientams vartojant  $IFN-\alpha$ , gali būti sutrikdomi imuninės sistemos autoreguliaciniai mechanizmai, o tai gali turėti neigiamą poveikį gydymo efektyvumui.

## 6. IŠVADOS

1. Ki-67 proliferacijos žymuo neturi prognozinės reikšmės neišplitusia melanoma sergantiems pacientams, kai naviko storis  $\geq 1,5$  mm.

2. Ki-67 proliferacijos žymuo turi prediktyvinę reikšmę gydytiems IFN- $\alpha$  neišplitusia melanoma sergantiems pacientams.

3. Nustatytas reikšmingas monocitų, CD8<sup>high</sup>CD57- limfocitų kiekio sumažėjimas ir CD4<sup>+</sup> ir CD8<sup>low</sup> limfocitų kiekio padidėjimas neišplitusia melanoma sergančių pacientų periferiniame kraujyje.

4. Neišplitusia melanoma sergančių pacientų naviko augimo frakcijos dydis (Ki-67 raiška) gali daryti įtaką T limfocitų subpopuliacijų pakitimams po operacinio gydymo.

## 7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Netikslinga skirti adjuvantinį gydymą IFN- $\alpha$  nesilaikant atrankos kriterijų (neindividualizuotai) pacientams, sergantiems neišplitusia melanoma, kai naviko storis  $\geq 1,5$  mm, ypač jei navike Ki-67 žymens raiška yra  $\geq 16\%$ .

## 8. PUBLIKACIJOS

1. Jonušauskaitė R., Characiejus D., Pašukonienė V., Aleknavičius E., Kazlauskaitė N., Rėklaitis J., Sidorovas V. Prognostinė CD8<sup>h</sup>CD57+ limfocitų populiacijos reikšmė gydant melanoma sergančius ligonius interferonu-alfa. *Laboratorinė medicina*, 2004; 22: 7-10.

2. Sidorovas V., Pašukonienė V., Rėklaitis J., Sužiedėlis K., Meškauskas R., Characiejus D. Prediktyvinė proliferacijos žymens Ki-67 reikšmė gydant interferonu neišplitusią melanomą. *Sveikatos mokslai*, 2008; 5: 1866-1869.

Sidorovas V., Pašukonienė V., Dobrovolskienė N., Sužiedėlis K., Meškauskas R., Characiejus D. Melanoma sergančių pacientų periferinio kraujo imunokompetentinių ląstelių pokyčiai. Medicinos teorija ir praktika, 2009;

## **9. PRANEŠIMAI**

Lietuvos dermatovenerologų respublikinė konferencija „Uždegiminių ir navikinių odos ligų valdymo naujovės“: „Prediktyvinė proliferacijos žymens Ki-67 reikšmė gydant interferonu alfa neišplitusią melanomą“. 2008 04 18, Vilnius.



## 10. LITERATŪRA

1. Lens M. B., Dawes M. Interferon alfa therapy for malignant melanoma: a systematic review of randomized controlled trials. *Journal of Clinical Oncology*, 2002; 20: 1818-25.
2. Balch C. M., Buzaid A. C., Song S.-J., et al. Final version of the American joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2001; 19: 3635-48.
3. Balch C. M., Buzaid A. C., Atkins M. B., et al. A new American joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer*, 2000; 88: 1484-91.
4. Rusciani L., Petraglia S., Alotto M., et al. Postsurgical adjuvant therapy for melanoma. *Cancer*, 1997; 79: 2354-60.
5. Hancock B. W., Wheatley K., Harris S., et al. Adjuvant interferon in high-risk melanoma: The AIM HIGH study - United Kingdom coordinating committee on cancer research randomized study of adjuvant low-dose extended-duration interferon alfa-2a in high-risk resected malignant melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2004; 22: 53-61.
6. Grob J. J., Dreno B., de la Salmoniere P., et al: Randomised trial of interferon  $\alpha$ -2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1,5 mm without clinically detectable node metastases. *Lancet*, 1998; 351: 1905-10.
7. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the know and the unknown. *J. Cell Physiol.* 2000; 182: 311-22

8. Carlson J. A., Slominski A., Linette G. P., et al. Biomarkers in melanoma: predisposition, screening and diagnosis. [Expert Review of Molecular Diagnostics](#), 2003; 3: 89-110.
9. Ostmeier H., Fuchs B., Otto F., et al. Prognostic immunohistochemical markers of primary human melanomas. *Br. J Dermatol.*, 2001; 145: 203-9.
10. Boni R., Doguoglu A., Burg., et al. MIB-1 immunoreactivity correlates with metastatic dissemination in primary thick cutaneous melanoma. *J of the American Academy of Dermatology*, 1996; 35:416-418.
11. The International Agency for Research on Cancer (IARC). World cancer report.
12. Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, et al, eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2000. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2003. Available at: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2000,2003](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2000,2003).
13. Piktybiniai navikai Lietuvoje. Lietuvos vėžio registras, 2008.
14. Retsas S., Henry K., Mohammed M. Q., et al. Prognostic factors of cutaneous melanoma and a new staging system proposed by the American Joint Committee on Cancer (AJCC): validation in a cohort of 1284 patients. *European Journal of Cancer*, 2002; 38: 511-6.
15. Balch C. M., Soong S. J., Gershenwald J. E., et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *Journal of Clinical Oncology*, 2001; 19: 3622-34.
16. Merkel S., Meyer T., Papadopoulos T., et al. Testing a new staging system for cutaneous melanoma proposed by the American Joint Committee on Cancer. *European Journal of Cancer*, 2002; 38: 517-26.

17. Balch C. M., Soong S. J., Gershwald J. E, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *Journal of Clinical Oncology*, 2001; 19: 3622-34.
18. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of Surgery*, 1970; 172: 902-8.
19. Buttner P., Garbe C., Bertz J., et al. Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. *Cancer*, 1995; 75: 2499-506.
20. Oliveira Filho R. S., Ferreira L. M., Biasi L. J., et al. Vertical growth phase and positive sentinel node in thin melanoma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2003; 36: 347-50.
21. Ronan S. G., Eng A. M., Briele H. A., et al. Thin malignant melanomas with regression and metastases. *Archives of Dermatology*, 1987; 123: 1326-30.
22. Månsson-Brahme E., Carstensen J., Erhardt K., et al. Prognostic factors in thin cutaneous malignant melanoma. *Cancer*, 1994; 73: 2324-32.
23. Cook M. G., Spatz A., Bröcker E. B., Ruitter D. J. Identification of histological features associated with metastatic potential in thin (<1.0 mm) cutaneous melanoma with metastases. A study on behalf of the EORTC Melanoma Group. *Journal of Pathology*, 2002; 197: 188-93.
24. McGovern V. J., Shaw H. M., Milton G. W. Prognosis in patients with thin malignant melanoma: influence of regression. *Histopathology*, 1983; 7: 673-80.

25. Cooper P. H., Wanebo H. J., Hagar R. W. Regression in thin malignant melanoma. Microscopic diagnosis and prognostic importance. [Archives of dermatological research](#), 1985; 121: 1127-31.
26. Clemente C. G., Mihm M. C. Jr., Bufalino R., et al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*, 1996; 77: 1303-10.
27. Thorn M., Ponten F., Bergstrom R., et al. Clinical and histopathologic predictors of survival in patients with malignant melanoma: A population-based study in Sweden. *Journal of the National Cancer Institute*, 1994; 86: 761-9.
28. Kopf A. W., Welkovich B., Frankel R. E., et al. Thickness of malignant melanoma: global analysis of related factors. *Journal of Dermatologic Surgery and Oncology*, 1987; 13: 345-90, 401-20.
29. Kashani-Sabet M., Sagebiel R. W., Ferreira C. M. M., et al. Vascular involvement in the prognosis of primary cutaneous melanoma. [Archives of dermatology](#), 2001; 137: 1169-73.
30. Sondegaard K., Schou G. Therapeutic and clinical-pathological factors in the survival of 1 469 patients with primary cutaneous malignant melanoma in clinical stage I: a multivariate regression analysis. *Virchows Archiv*, 1985; 408: 249-58.
31. Stidham K. R., Johnson J. L., Seigler H. F. Survival superiority of females with melanoma: a multivariate analysis of 6383 patients exploring the significance of gender in prognostic outcome. *Archives of Surgery*, 1994; 129: 316-24.

32. Cohen H. J., Cox E., Manton K., Woodbury M. Malignant melanoma in the elderly. *Journal of Clinical Oncology*, 1987;5:100-6.
33. Austin P. F., Cruse C. W., Lyman G., et al. Age as a prognostic factor in the malignant melanoma population. *Annals of Surgical Oncology*, 1994; 1: 487-94.
34. Carlson J. A., Slominski A., Linette G., et al. Biomarkers in melanoma: staging, prognosis and detection of early metastases. [Expert Review of Molecular Diagnostics](#), 2003; 3: 303-30.
35. Kaiserman I, Amer R. Liver function tests in metastatic uveal melanoma. *Am J Ophthalmol.*, 2004; 137 (2): 236–43.
36. Callejo S.A., Marshall J.C., Cools-Lartigue J. et al. Macrophage-derived soluble factor enhances melanoma inhibitory activity expression by uveal melanoma cells in vitro. *Melanoma Res.*, 2004; 14 (2): 91–5. (37, 38).
37. Bosserhoff A. K., Hein R., Bogdahn U., et al. Structure and promoter analysis of the gene encoding the human melanoma-inhibiting protein MIA. *Journal of Biological Chemistry*, 1996; 271: 490-5.
38. Gaynor R., Irie R., Morton D. L., et al. S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature* 1980; 286: 400-1.
39. Carrel S., Rimoldi D. Melanoma-associated antigens. *European Journal of Cancer*, 1993; 29: 1903-7.
40. Loppin M., Quillien V., Adamski H. et al. Protein S100 beta and Melanoma Inhibitory Activity (MIA): a prospective study of their clinical value for the early detection of metastasis in malignant melanoma. *Ann Dermatol Venereol.*, 2007; 134 (6–7): 535–40.

41. Djukanovic D., Hofmann U., Sucker A. et al. Comparison of S100 protein and MIA protein as serum marker for malignant melanoma. *Anticancer Res.*, 2000; 20 (3B): 2203–7.
42. Urugel S. Serum markers for melanoma. *Hautarzt*, 2005; 56: 173-84; 185-6.
43. Balch C. M., Soong S. J., Gershenwald J. E., et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *Journal of Clinical Oncology*, 2001; 19: 3622-34.
44. Vuoristo M. S., Kellokumpu-Lehtinen P., Laine S., et al. The value of S-100 $\beta$  and interleukins as tumour markers in advanced melanoma. *Melanoma Research*, 2000; 10: 237-41.
45. Cao M. G., Auge J. M., Molina R., et al. Melanoma inhibiting activity protein (MIA), beta-2 microglobulin and lactate dehydrogenase (LDH) in metastatic melanoma. *Anticancer Research*, 2007; 27: 595-9.
46. Hunter J. J., Shao J., Smutko J. S., et al. Chromosomal localization and genomic characterization of the mouse melastatin gene (*Mlsn1*). *Genomics*, 1998; 54: 116-123.
47. Duncan L. M., Deeds J., Cronin F. E., et al. Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2001; 19: 568-76.
48. Ferrier C. M., van Muijen G. N., Ruiter D. J. Proteases in cutaneous melanoma. [Annals of Medicine](#), 1998; 30: 431-42.
49. Väisänen A., Tuominen H., Kallioinen M., et al. Matrix metalloproteinase-2 (72 kD type IV collagenase) expression occurs in the early

stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value. *Journal of Pathology*, 1996; 180: 283-9.

50. Väisänen A., Kallioinen M., Taskinen P. J., et al. Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma. *Journal of Pathology*, 1998; 186: 51-58.

51. Väisänen A., Kallioinen M., Kai von Dickhoff, et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) immunoreactive protein - a new prognostic marker in uveal melanoma? *The Journal of Pathology*, 1999; 188: 56-62.

52. Simonetti O., Lucarini G., Brancorsini D., et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions. *Cancer*, 2002; 95: 1963-70.

53. Bayer-Garner I. B., Hough A. J. Jr., Smoller B. R. Vascular endothelial growth factor expression in malignant melanoma: prognostic versus diagnostic usefulness. *Modern Pathology*, 1999; 12: 770-774.

54. Ugurel S., Rappl G., Tilgen W., Reinhold U. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *Journal of Clinical Oncology*, 2001; 19: 577-583.

55. Glade-Bender J., Kandel J. J., Yamashiro D. J. VEGF blocking therapy in the treatment of cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2003; 3: 263-76.

56. Karjalainen J. M. Transcription factors and other dysregulated proteins in melanoma prognosis. *Current Oncology Reports*, 2001; 3: 368- 375.

57. Straume O., Sviland L., Akslen L. A. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clinical Cancer Research*, 2000; 6: 1845-53.
58. Castellano M., Parmiani G. Genes involved in melanoma: an overview of INK4a and other loci. *Melanoma Research*, 1999; 9: 421-32.
59. Maelandsmo G. M., Florenes V. A., Hovig E., et al. Involvement of the pRb/p16/cdk4/cyclin D1 pathway in the tumorigenesis of sporadic malignant melanomas. *British Journal of Cancer*, 1996; 73: 909-16.
60. Bartkova J., Lukas J., Guldberg P., et al. The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. *Cancer Research*, 1996; 56: 5475-83.
61. Carlson J. A., Slominski A., Linette G., et al. Biomarkers in melanoma: predisposition, screening and diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2003; 3: 89-110.
62. Straume O., Smeds J., Kumar R., et al. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *American Journal of Pathology*, 2002; 161: 229-37.
63. Crotty K. A., Scolyer R. A., Li L., et al. Spitz naevus versus spitzoid melanoma: when and how can they be distinguished? *Pathology*, 2002; 34: 6-12.
64. Li L. X., Crotty K. A., McCarthy S. W., et al. A zonal comparison of MIB1-Ki67 immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. [American Journal of Dermatopathology](#), 2000; 22: 489-95.



65. Bergman R., Malkin L., Sabo E., et al. MIB-1 monoclonal antibody to determine proliferative activity of Ki-67 antigen as an adjunct to the histopathologic differential diagnosis of Spitz nevi. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2001; 44: 500-4.
66. McNutt N. S., Urmacher C., Hakimian J., et al. Nevoid malignant melanoma: morphologic patterns and immunohistochemical reactivity. *Journal of Cutaneous Pathology*, 1995; 22: 502-17.
67. Frahm S., Schubert C., Parwaresch R., et al. High proliferative activity may predict early metastasis of thin melanomas. *Human Pathology*, 2001; 32: 1376-81.
68. Boon T., Cerottini J.C., Van den Eynde B. et al. Tumor Antigens Recognized by T Lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.*, 1994; 12: 337–365.
69. Van der Eynde B., Van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.*, 1997; 9: 684–693.
70. Boon T., Coulie P.G., Van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol. Today*, 1997;18: 267–268.
71. Kawakami Y., Rosenberg S.A. Immunobiology of human melanoma antigens MART21 and gp100 and their use for immuno2gene therapy. *Int. Rev. Immunol.*, 1997; 14: 173.
72. Phillips J.H., Gumperz J.E., Parham P., Lenier L.L. Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes. *Science*, 1995; 268:403–405.
73. Characterization of HLA class I altered phenotypes in a panel of human melanoma cell lines Méndez R., Rodríguez T., Campo A., et al. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2008; 57: 719-729.

74. Coulie P.G., Ikeda H., Baurain J.F., et al. *Advances in Cancer Research*, 1999.
75. Nestle F. O., Burg G., Dummer R. New perspectives on immunobiology and immunotherapy of melanoma. *Immunology Today*, 1999; 20(1): 5-7.
76. Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M., et al. Identification and functional characterization of human CD4 CD25 T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med.*, 2001; 193: 1285-1294.
77. Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25 CD4 regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.*, 2000; 192: 303-310.
78. Baecher-Allan C., Viglietta V., Hafler D.A. Human CD4 CD25 regulatory T cells. *Semin Immunol.*, 2004; 16: 89-98.
79. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S.. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003; 299: 1057-1061.
80. Fontenot J.D., Rasmussen J.P., Williams L.M. Et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*, 2005; 22: 329-341.
81. Ahmadzadeh M., Rosenberg S.A.. IL-2 administration increases CD4 CD25hi Foxp3 regulatory T cells in cancer patients *Blood*, 2006; 107: 6.
82. Fearon D. T., Carr J. M., Telaranta A., et al. The rationale for the IL-2-independent generation of the self-renewing central memory CD8+ T cells. *Immunology Rev.* 2006; 211: 104-18.

83. Statholopoulos G. P., Baxevanis C. N., Papadopoulos N. G. et al. Local immunotherapy with interferon-alfa in metastatic pleural and peritoneal effusions: correlation with immunologic parameters. *Anticancer Research*, 1996; 16: 3855-3860.
84. Batliwalla F. M., Bateman B. A., Serrano D., et al. A 15-year follow-up of AJCC stage III malignant melanoma patients treated postsurgically with Newcastle disease virus(NDV) oncolysate and determination of alterations in the CD8 T cell repertoire. *Molecular Medicine*, 1998; 4: 783-94.
85. Characiejus D., Pašukonienė V., Jonušauskaitė R., et al. Peripheral blood CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> lymphocyte levels may predict outcome in melanoma patients treated with adjuvant interferon-alpha. *Anticancer Research*, 2008; 28: 1139-42.
86. Raitakari M., Brown R. D., Sze D., et al. T-cell expansions in patients with multiple myeloma have a phenotype of cytotoxic T cells. *British Journal of Haematology*, 2000; 110: 203-9.
87. Villegas F. R., Coca S., Villarrubia V. G., et al. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cell subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2002; 35: 23-8.
88. Characiejus D., Pašukonienė V., Kazlauskaitė N., et al. Predictive value of CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> lymphocyte subset in interferon therapy of patients with renal cell carcinoma. *Anticancer Research*, 2002; 22: 3679-83.
89. Verma S., Quirt I., McCready D., Bake K. et al. Systematic review of systemic adjuvant therapy for patients at high risk for recurrent melanoma. *Cancer*, 2006; 10: 1431-42.

90. Gogas H. J., Kirkwood J. M., Sondak V. K. Chemotherapy for metastatic melanoma. *Cancer*, 2007; 3: 210-9.
91. Rosenberg S. Principles of cancer management: biologic therapy. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 1997; 18: 349-373.
92. Biragyn A., Kwak LW. Designer cancer vaccines are still in fashion. *Nat Med* 2000; 6 (9): 966-8.
93. Finn OJ. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immun* 2003; 3: 630-41.
94. Lengyel P. Tumor-suppressor genes: News about the interferon connection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 5893-5.
95. Kefford R. F. Adjuvant therapy of cutaneous melanoma: the interferon debate. *Annals of Oncology*, 2003; 14: 358-65.
96. Kleeberg U. R., Suciú S., Bröcker E. B., et al. Final results of the EORTC 18871/DKG 80-1 randomised phase III trial. rIFN- $\alpha$ 2b versus rIFN- $\gamma$  versus ISCADOR M versus observation after surgery in melanoma. *European Journal of Cancer*, 2004; 40: 390-420.
97. Kirkwood J. M., Strawderman M. H., Ernstoff M. S., et al. Interferon  $\alpha$ -2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group trial. *Journal of Clinical Oncology*, 1996; 14: 7-17.
98. Wheatley K., Ives N., Hancock B., et al. Does adjuvant interferon- $\alpha$  for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials. *Cancer Treatment Reviews*, 2003; 29: 241-52.

99. Eggermont A. EORTC melanoma group trial experience with more than 2000 patients, evaluating adjuvant treatment with low or intermediate doses of interferon alpha-2b. ASCO, 2001. San Francisco: Ed. Book, 2001: 88-94.
100. Middleton M. R., Thatcher N. Adjuvant interferon in melanoma –a resurrection? *British Journal of Cancer*, 2001; 84: 1141-2.
101. Kirkwood J. M., Ibrahim J. G., Sondak V. K., et al. Interferon alfa-2a for melanoma metastases. *Lancet*, 2002; 359: 978-9.
102. Kirkwood J. M., Ibrahim J. G., Sondak V. K., et al. High and low-dose interferon alfa-2b in high risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J. Clin Oncol.*, 2000; 18: 2444-59.
103. Cregan E. T., Dalton R. J., Ahmann D. L., et al. Randomized, surgical adjuvant clinical trial of recombinant interferon alfa 2a in selected patients with malignant melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 1995; 13: 2776-83.
104. Pehamberg H., Soer P., Steiner A., et al. Adjuvant interferon alfa-2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 1998; 16: 1425-9.
105. Eggermont A. M. The role interferon-alpha in malignant melanoma remains to be defined. *European Journal of Cancer*, 2001; 37: 2147-53.
106. Morgan D. A., Ruscetti F. W., Galo R. Selective in vitro growth of T-lymphocytes from normal bone marrow. *Science*, 1976; 193: 1007-8.
107. Sparano J. A., Fisher R. I., Sunderland M., et al. Randomized phase III trial of treatment with high-dose interleukin-2 either alone or in combination with interferon alfa-2a in patients with advanced melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 1993; 11: 1969-77.

108. Hauschild A., Weichenthal M., Balda B.-R., et al. Prospective Randomized trial of interferon alfa-2b and interleukin-2 as adjuvant treatment for resected intermediate — and high-risk primary melanoma without clinically detectable node metastasis. *Journal of Clinical Oncology*, 2003; 21: 2883-8.
109. J. Weber. Overcoming Immunologic Tolerance to Melanoma: Targeting CTLA-4 with Ipilimumab (MDX-010). *The Oncologist*, 2008; 13: 16–25.
110. Hsueh E.C., Famatiga E., Gupta R.K. et al. Enhancement of complement2 dependent cytotoxicity by polyvalent melanoma cell vaccine (CancerVax): correlation with survival. *Ann. Surg. Oncol.*, 1998; 5: 595.
111. Dranoff G., Jaffee E., Lazenby A. et al. Vaccination with irradiated tumour cell engineered to secrete murine gnanulocyte-makrophage colony-stimulating faktor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumour immunity. *Proc Nat Acad Sci.*, 1993; 90: 3539-3543.
112. Zhang S., Cordon-Cardo C., Zhang H.S. et al. Selection of tumour antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: I. Focus on gangliosides. *Int. J. Cancer*, 1997; 73: 42-49.
113. Helling F., Zhang S., Shang A. et al. GM22KLH conjugate vaccine: increased immunogenicity in melanoma patients after administration with immunological adjuvant QS221. *Cancer Res.*, 1995; 55: 2783–2788.
114. Nestle F.O., Alijagic S., Gilliet M. et al. Vaccination of melanoma patients with peptide2 or tumour lysate2 pulsed dendritic cells. *Nat. Med.*, 1998; 4: 328–332.

115. Nestle F.O., Burg G., Dummer R. New perspectives on immunobiology and immunotherapy of melanoma. *Immunol Today*, 1999; 20: 5–7.
116. Wolchok J.D., Livingston P.O. Vaccines for melanoma: translating basic immunology into new therapies. *The Lancet Oncology*, 2001; 2: 205–211.
117. Henrique R., Azevedo R., Bento M. J., et al. Prognostic value of Ki-67 expression in localized cutaneous malignant melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2000; 43: 991-1000.
118. Tran T. A., Ross J. S., Carlson J. A., et al. Mitotic cyclins and cyclin-dependent kinases in melanocytic lesions. *Human Pathology*, 1998; 29: 1085-90.
119. Beyer M., Shultze J. L. Regulatory T cells in cancer. *Blood*, 2006; 108(3): 804-11.
120. Wolf A. M., Wolf D., Steurer M., et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 2003; 9(2): 606-12.
121. Speiser D. E., Pittet M. J., Valmori D., et al. *In vivo* expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 1999; 190(6): 775-82.
122. Le Priol Y., Puthier D., Lécureuil C., et al. High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> cells in HIV-infected and uninfected individuals. *Journal of Immunology*, 2006; 177: 5145-54.
123. Scotto L., Naiyer A. J., Galluzzo S., et al. Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and

antigen specific CD4+CD25+ and CD8+CD28- T suppressor cells. Human Immunology, 2004; 65: 1297-1306.

124. Frassanito M. A., Silvestris F., Cafforio P., Dammacco F. CD8+/CD57 cells and apoptosis suppress T-cell functions in multiple myeloma. British Journal of Haematology, 1998; 100(3): 469-77.

125. Merino J., Martinez-Gonzalez M. A., Rubio M., et al. Progressive decrease of CD8high+ CD28+ CD57- cells with ageing. Clinical and Experimental Immunology, 1998; 112: 48-51.

126. Blish C. A., Dillon S. R., Farr A. G., Fink P. J. Anergic CD8+ T cells can persist and function *in vivo*. Journal of Immunology, 1999; 163: 155-64.