

Razlika u imunofenotipskim i funkcionalnim karakteristikama limfocita limfnih čvorova stražara obolelih od melanoma kože u prvom i drugom stadijumu bolesti

Uvod

Melanom je najagresivniji tumor kože, koji nastaje malignom transformacijom pigmentnih ćelija melanocita. Poznato je da je on takozvani imunogeničan tumor jer ima veliku učestalost mutacija i samim tim je dobar izvor molekula koji mogu da aktiviraju ćelije imunskog odgovora i to pre svega urođenoubilačke ćelije (NK ćelije) i CD8⁺ citotoksične T limfocite (CTL) (1). Ove ćelije imaju ulogu da eliminišu ćelije melanoma kako različitim mehanizmima citotoksičnosti, tako i imunoregulatornom aktivnošću odnosno produkcijom brojnih citokina, pre svega interferona-gama (IFN- γ). Ipak, ćelije melanoma mogu da izbegnu imunski nadzor kroz brojne mehanizme inhibicije komponenti imunskog odgovora (1).

Tretman primarnog lokalizovanog melanoma kože podrazumeva hirurško lečenje u vidu širokog uklanjanja samog tumora uz proveru statusa regionalnih limfnih čvorova odstranjenjem limfnog čvora stražara (LČS). LČS su prvi limfni čvorovi koji se susreću sa ćelijama tumora koje počinju da se šire u organizmu. U rutinskoj kliničkoj praksi, biopsija LČS je važna za precizno određivanje stadijuma melanoma i prognoze bolesti (2-4). Takođe, ova procedura daje mogućnost da se proučava rani imunski odgovor u LČS na antigene primarnog tumora. Ovakva analiza od velike je važnosti jer nam može pružiti nova saznanja o mogućnostima stimulacije imunskog odgovora pacijenta u borbi protiv ćelija melanoma u ranoj fazi bolesti (5, 6). Međutim, pokazano je da imunske ćelije u LČS pacijenata obolelih od melanoma imaju izmenjene funkcije (7). Ćelije melanoma oslobađaju brojne inhibitorne faktore, kao što su transformišući faktor rasta beta, interleukin-6, vaskularni endotelni faktor rasta, indolamin 2,3-dioksigenaza. Ovi faktori imaju sposobnost da dovode do diferencijacije, proliferacije i aktivacije brojnih supresorskih ćelija imuniteta kao što su: mijeloidne supresorske ćelije, regulatorni T limfociti, makrofagi pridruženi tumoru, koji igraju važnu ulogu u rastu tumora i metastaziranju tako što inhibiraju aktivnost CD4⁺ pomoćničkih T ćelija, CTL, NK ćelija u borbi protiv tumora. Ovi faktori takođe menjaju funkcije dendritskih ćelija unutar LČS, što dovodi do poremećaja procesa prezentacije antigena tumora i funkcije T limfocita. Ovi procesi promovišu stvaranje supresornog mikrookruženja u LČS pre pojave metastaze u njemu i na taj način favorizuju širenje tumora (7, 8). Iz tog razloga, godinama unazad ispituje se efikasnost različitih oblika imunske terapije kod pacijenata obolelih od melanoma (9). Terapijska primena inhibitora takozvanih kontrolnih tačaka imunskog odgovora, odnosno monoklonskih antitela koja blokiraju inhibitorne molekule, pre svega citotoksični T-limfocitima-pridružen protein 4 (*engl. Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen-4*, CTLA-4), receptor programirane ćelijske smrti 1 (*engl. Programmed Death 1 receptor*, PD-1), ligand receptora programirane ćelijske smrti 1 (*engl. Programmed Death Ligand 1*, PD-L1), gen 3 aktivacije limfocita (*engl. Lymphocyte-Activation Gene 3*, LAG-3), dala je značajne rezultate u terapiji pacijenata obolelih od metastatskog melanoma kože, kao i kod pacijenata sa metastazama u limfnim čvorovima u III stadijumu bolesti u vidu adjuvantne terapije (9). Ovi inhibicioni molekuli su značajni regulatori funkcije T limfocita. Pod uticajem hronične stimulacije antigenima tumora i imunosupresornih faktora prisutnih u mikrosredini tumora povećano su ispoljeni na T limfocitima i dovode do smanjenja njihove funkcije. Iz tog razloga terapijskom blokadom ovih molekula aktivira se imunski odgovor pacijenata (9, 10).

Na osnovu novijih velikih studija koje su ispitivale efekat terapije inhibitorima kontrolnih tačaka imunskog odgovora i kod bolesnika kod kojih nije detektovana metastaza u LČS, ali zbog debljine melanoma imaju visok rizik za relaps (IIB i IIC stadijum), Američka asocijacija za hranu i lekove je kod ovih pacijenata odobrila primenu monoklonskih antitela koja blokiraju PD-1 inhibitorni molekul, Pembrolizumab ili Nivolumab kao adjuvantnu terapiju (11). Međutim, kod ove grupe pacijenata velika je potreba za iscrpnim istraživanjima koja bi pomogla u što preciznijem odabiru pacijenata kod kojih bi ova terapija dala najbolji klinički odgovor, a s obzirom na njene potencijalne neželjene efekte i rezistenciju (12, 13). Takođe, bilo bi potrebno kod ovih pacijenata detaljno ispitati, pored PD-1, značaj i drugih inhibitornih molekula, pre svega LAG-3 i T-ćelijskog receptora 3 koji sadrži imunoglobulin i mucin (*engl. T cell immunoglobulin and mucin domain containing-3*, TIM-3), čija blokada bi potencijalno mogla imati veliki terapijski značaj.

Radna hipoteza

U tkivu LČS bolesnika u II kliničkom stadijumu melanoma kože smanjena je zastupljenost i funkcija ukupnih CD3+ T limfocita, kao i zastupljenost citotoksičnih CD3+CD8+ T ćelija, a takođe je povećana ekspresija PD-1, LAG-3, TIM-3 molekula na ukupnim CD3+ T limfocitima u odnosu na pacijente u I kliničkom stadijumu.

Ciljevi istraživanja

1. Odrediti i uporediti zastupljenost ukupnih CD3+ T limfocita i njihovih subpopulacija (CD3+CD4+ pomoćnički, CD3+CD8+ citotoksični, CD25+Foxp3+CD4+ regulatorni T limfociti), kao i CD3-CD56+ NK ćelija, u tkivu LČS pacijenata obolelih od melanoma kože u I i II kliničkom stadijumu.
2. Odrediti i uporediti funkciju ukupnih CD3+ T limfocita u tkivu LČS pacijenata obolelih od melanoma kože u I i II kliničkom stadijumu, merenjem ekspresije sintetisanog IFN- γ u njima.
3. Odrediti i uporediti ekspresiju PD-1, LAG-3 i TIM-3 molekula na površini ukupnih CD3+ T limfocita u tkivu LČS pacijenata obolelih od melanoma kože u I i II kliničkom stadijumu.
4. Odrediti i uporediti povezanost procenta CD3+CD8+ i CD3+PD-1+ T limfocita u tkivu LČS pacijenata obolelih od melanoma kože u I i II kliničkom stadijumu sa patohistološkim karakteristikama primarnog tumora (histološki tip, debljina tumora (Breslow)).

Materijal i metode

Pacijenti

U ovoj retrospektivno-prospektivnoj studiji koristiće se uzorci tkiva LČS 60 pacijenata sa kožnim, lokalizovanim melanomom, koji će biti podvrgnuti biopsiji LČS u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS). Planirani period istraživanja je 18 meseci, od aprila 2024. godine do oktobra 2025.

LČS se u dijagnostici rutinski analiziraju na prisustvo ćelija melanoma u njima kod pacijenata koji imaju melanome debljine po Breslou $\geq 0,8$ mm ili tanje ali sa prisutnom ulceracijom

(stadijum T1b i viši prema TNM klasifikaciji tumora), a nemaju klinički i dijagnostički uočene znakove patološke limfadenopatije i/ili metastatskih promena (2-4,14).

Uključujući kriterijumi:

- postavljena dijagnoza melanoma kože (pT1b i viši stadijumi), bez limfadenopatije i/ili metastatskih promena,
- starost pacijenta preko 18 godina,
- bilo koja rasa, pol ili etničko poreklo pacijenta.

Isključujući kriterijumi:

- starost pacijenta ispod 18 godina,
- prisustvo infektivnih oboljenja, autoimunskih bolesti, akutne ili hronične inflamacije drugog porekla i/ili maligniteta krvi i koštane srži.

Informisani pismeni pristanak će biti tražen od svakog pacijenata na osnovu protokola koji je odobrio Etički odbor IORS-a (br.14/2024/1081). Radi hirurške intervencije koja ima za cilj proveru LČS, preoperativno na dan operacije, intradermalno u regiju ožiljka od uklonjenog melanoma, biće ubrizgan marker, radioaktivni izotop (Tc99m), a neposredno preoperativno i drugi marker, vitalna boja (metilen plava), na isti način. U toku hirurške intervencije će iz regionalnog limfnog bazena biti odstranjen limfni nodus koji je primio jedan ili oba markera, čime se smatra da je on LČS. LČS su ili pozitivni ili negativni na ćelije melanoma na osnovu patohistološke analize serijskih preseka bojenjem hematoxilinom i eozinom (H&E) i imunohistohemijskim bojenjem. U slučaju pozitivnog LČS, pacijenti se svrstavaju u III stadijum bolesti, a u slučaju negativnog LČS u I ili II stadijum u zavisnosti od debljine primarnog melanoma i prisutne ulceracije. Nasumični deo LČS (1 mm najveće debljine preseka) od svakog pacijenta, dobijen svež od strane patologa u toku ili odmah nakon operacije, će biti prebačen u kriovajle i krioprezerviran na -150°C radi skladištenja i kasnije obrade. Za potrebe ovog istraživanja isključivo će se analizirati LČS negativni na ćelije melanoma (klinički stadijum I i II). Analiza imunofenotipskih i funkcionalnih karakteristika limfocita iz dobijenog uzorka LČS vršiće se u Odseku laboratorije za imunologiju Službe za naučnoistraživačku i obrazovnu delatnost IORS.

Eksperimentalne metode

Izolacija mononuklearnih ćelija (MNC) iz tkiva LČS obolelih od melanoma kože

Tkivo LČS će biti u RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Nemačka) hranljivoj podlozi za ćelijsku kulturu mehanički isitnjeno, a zatim potiskivanjem kroz mrežicu biće dobijena jednoćelijska suspenzija. Iz dobijene suspenzije ćelija biće izolovane MNC nakon 30 minuta centrifugiranja na 1600 obrtaja u minutu (rpm) na gustinskom gradijentu Histopaque (Sigma-Aldrich). Dobijeni talog MNC će zatim 2 puta biti ispiran u po 2 ml hranljive podloge centrifugiranjem na 1600 rpm u trajanju od 10 minuta.

Protočna citometrija

Procentualna zastupljenost ukupnih T limfocita i njihovih različitih subpopulacija, kao i procenat NK ćelija i inhibitornih receptora, PD-1, LAG-3, TIM-3, na površini ukupnih T ćelija u populaciji limfocita u sveže izolovanim MNC poreklom iz LČS obolelih od melanoma kože određivaće se metodom direktne trokolorne imunofluorescencije na protočnom citometru, FACSCalibur, (Becton Dickinson, San Jose, SAD) korišćenjem monoklonskih antitela obeleženih fluorescentnim bojama. Uzorci za analizu će biti pripremani po metodi Jacson-a i saradnika (15). Naime, 5×10^5 sveže izolovanih MNC u suspenziji od 100 μ L (koncentracija 5×10^6 ćelija/ml) će biti inkubirano 30 minuta na 4°C sa 10 μ L odgovarajuće kombinacije monoklonskih antitela i nakon toga ispirano dva puta centrifugiranjem na 1600 rpm u hladnom rastvoru fosfatnog pufera (CellWASH) (Becton Dickinson) i za analizu na protočnom citometru resuspendovano u 1% paraformaldehidu (CellFIX) (Becton Dickinson).

Limfociti će se detektovati u suspenziji MNC prema svojoj veličini i granularnosti u CellQuest programu pri čemu će biti sakupljano oko 20000 događaja (ćelija po uzorku), a stepen nespecifične imunofluorescencije određivaće se korišćenjem izotipski identičnih, irelevantnih, kontrolnih monoklonskih antitela i oduzimati od fluorescencije uzorka. U radu će biti korišćene sledeće kombinacije monoklonskih antitela koja su obeležena fluorescentnim bojama: CD8FITC/CD4PE/CD3APC, CD56FITC/PD-1PE/CD3APC, LAG-3FITC/TIM-3PE/CD3APC, CD25FITC/Foxp3PE/CD4PerCP (Becton Dickinson). Ukupni T limfociti će biti detektovani i analizirani kao CD3+ limfociti, pomoćnički T limfociti kao CD3+CD4+, citotoksični T limfociti kao CD3+CD8+, a NK ćelije kao CD3-CD56+ limfociti. Ekspresija PD-1, LAG-3 i TIM-3 molekula će biti određivana na površini ukupnih CD3+ T limfocita.

Za analizu procenta regulatornih T (Treg) limfocita unutar populacije limfocita LČS metodom protočne citometrije, biće pripreman uzorak od 1×10^6 MNC izolovanih iz LČS bolesnika sa melanomom koje će biti resuspendovane u 100 μ L hranljive podloge. Spoljašnji antigeni koji određuju imunofenotip Treg ćelija biće obeleženi sa po 10 μ L monoklonskih antitela konjugovanih fluorescentnim bojama, CD25FITC i CD4PerCP (Becton Dickinson) i inkubirani 30 minuta na 4°C. Nakon toga uzorci će biti po dva puta ispirani centrifugiranjem na 1600 rpm u hladnom rastvoru fosfatnog pufera. Posle bojenja spoljašnjih antigena, prema standardnom postupku za permeabilizaciju, talog MNC će biti izlagan dejstvu komercijalnog BD FACS rastvora 2 za permeabilizaciju ćelija koji sadrži deterdžent saponin (Perm 2) (BD Biosciences) i nakon toga za obeležavanje unutarćelijskog Foxp3 svakom uzorku će biti dodavano po 10 μ L anti-Foxp3 PE monoklonskog antitela (Becton Dickinson). Nakon dva ispiranja u hladnom rastvoru fosfatnog pufera, za analizu na protočnom citometru uzorci će biti rastvoreni u 1% paraformaldehidu. U populaciji limfocita LČS procenat Treg će biti analiziran kao procenat CD4+CD25+ T ćelija koje sadrže FoxP3.

Određivanje IFN- γ u T limfocitima

Za određivanje prisustva sintetisanog IFN- γ u CD3+ T ćelijama koristiće se metoda protočne citometrije. Biće pripremljen uzorak od 5×10^5 MNC izolovanih iz LČS bolesnika sa melanomom koje će biti resuspendovane u 500 μ L medijuma. Ovako pripremljene MNC će se kultivisati na temperaturi od 37°C u polistirenskim epruvetama za protočnu citometriju sa 50 ng/ml forbol-12-miristat-13-acetata (PMA) (Sigma-Aldrich) i 500 ng/ml jonomicina (Sigma-Aldrich) koji imaju ulogu da stimulišu sintezu IFN- γ . Nakon 1 sat inkubacije sa PMA i jonomicinom dodaće se 10 g/ml brefeldina A (Sigma-Aldrich) da bi se sprečio transport sintetisanih proteina iz ćelija u

spoljašnju sredinu. Nakon dodatnih 3 sata (ukupno 4 sata tretmana), MNČ će biti dodato 10 μ l monoklonskog antitela konjugovanog sa fluorescentnom bojom, CD3FITC (Becton Dickinson) koje vezuje spoljašnji antigen koji određuje imunofenotip ukupnih T limfocita i obeležene MNČ će biti inkubirane 30 minuta na 4°C. Nakon toga uzorci će biti po dva puta ispirani centrifugiranjem na 1600 rpm u hladnom rastvoru fosfatnog pufera. Nakon bojenja spoljašnjeg antigena prema standardnom postupku za permeabilizaciju, talog MNČ će biti izlagan dejstvu Perm 2 rastvora i nakon toga za obeležavanje unutarćelijskog IFN- γ svakom uzorku će biti dodavano po 10 μ l anti-IFN- γ PE monoklonskog antitela (Becton Dickinson). Nakon dva ispiranja u hladnom rastvoru fosfatnog pufera, uzorci će biti rastvoreni u 1% paraformaldehidu. U populaciji limfocita LČS, određivaće se procenat CD3+ T ćelija koje sadrže IFN- γ .

Statistička analiza

U ovom istraživanju potrebna veličina uzorka za detekciju veličine efekta od 0.41 u analizi varijanse sa dve grupe za numeričke varijable: procenat CD3+ T limfocita, procenat CD3+CD8+ citotoksičnih T limfocita, procenat CD3+PD-1+ ćelija, za nivo statističke značajnosti od 0.05 i statističku snagu od 0.8 iznosi 50. Veličina efekta dobijena je na osnovu pretpostavljenih odnosa vrednosti objašnjene i rezidualne varijanse od 0.15 prema 0.9. Izračunavanje veličine uzorke urađeno je pomoću programa G-power 3.1.6.

Dobijeni rezultati će se analizirati primenom parametarskog T testa za nezavisne uzorke, *Unpaired T test*, i neparametarskog testa, *Mann-Whitney exact test of unpaired data* korišćenjem *GraphPad Prism* programa. Korelacije između podataka određivaće se *Spearman* rangovnom korelacijom. Razlike između upoređivanih grupa biće statistički značajne odnosno postojaće korelacija ukoliko će izračunata p vrednost biti manja ili jednaka 0,05.

Procena kandidata o potencijalnom naučnom doprinosu

U literaturi je malo podataka o imunofenotipskim i funkcionalnim karakteristikama ćelija imunskog odgovora u još uvek intaktnom, nemetastatskom LČS bolesnika sa kožnim, lokalizovanim melanomom. Iz tog razloga bi ovo istraživanje trebalo da da sasvim nove podatke vezane za potencijalnu razliku u procentu i funkciji T limfocita, kao i ekspresiji inhibitornih molekula, kontrolnih tačaka imunskog odgovora, PD-1, LAG-3, TIM-3 na njihovoj površini između bolesnika u kliničkom stadijumu II sa lošijom prognozom i većom mogućnošću metastaziranja u odnosu na pacijente u kliničkom stadijumu I. Iako je nekoliko godina unazad odobrena primena monoklonskih antitela koja blokiraju PD-1 molekul u visokorizičnim podgrupama pacijenata u II stadijumu bolesti (IIB/C), u vidu adjuvantne terapije, ostaje otvoreno pitanje da li su svi ovi pacijenti kandidati za lečenje ovom terapijom, s obzirom na njene potencijalne neželjene efekte i moguću rezistenciju. Rezultati ovog istraživanja mogli bi da doprinesu preciznijem odabiru pacijenata kod kojih bi ova terapija dala najbolji klinički odgovor, a takođe bi rezultati koji se odnose na ispoljavanje ne samo PD-1, već i manje analiziranih LAG-3 i TIM-3 inhibitornih molekula na površini limfocita LČS mogli da pokažu njihov značaj u smanjenju funkcije T limfocita, kao i potencijalno veliki značaj njihove terapijske blokade kod pacijenata sa visokim rizikom metastaziranja u II stadijumu bolesti.

Reference

1. Passarelli A, Mannavola F, Stucci LS, Tucci M, Silvestris F. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget*. 2017;8:106132-106142.
2. Melanom: prevencija, dijagnostika i lečenje: nacionalni vodič. Radna grupa Ministarstva zdravlja za izradu vodiča dobre kliničke prakse za melanom; urednici Novaković M i dr. Akademija medicinskih nauka Srpskog lekarskog društva: Intereskijski odbor za melanom Srpskog lekarskog društva. 2019.
3. Michielin O, van Akkooi ACJ, Ascierto PA, Dummer R, Keilholz U. ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2019;30:1884-1901.
4. Pathak S, Zito PM. Clinical Guidelines for the Staging, Diagnosis, and Management of Cutaneous Malignant Melanoma. [Updated 2023 Jun 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-.
5. Lund AW. Lymph node metastasis: An immunological burden. *J Exp Med*. 2023;220:e20230904.
6. Delclaux I, Ventre KS, Jones D, Lund AW. The tumor-draining lymph node as a reservoir for systemic immune surveillance. *Trends Cancer*. 2024;10:28-37.
7. du Bois H, Heim TA, Lund AW. Tumor-draining lymph nodes: At the crossroads of metastasis and immunity. *Sci Immunol*. 2021;6:eabg3551.
8. Suman S, Markovic SN. Melanoma-derived mediators can foster the premetastatic niche: crossroad to lymphatic metastasis. *Trends Immunol*. 2023;44:724-743.
9. Dhanyamraju PK, Patel TN. Melanoma therapeutics: a literature review. *J Biomed Res*. 2022;36:77-97.
10. Shah V, Panchal V, Shah A, Vyas B, Agrawal S, Bharadwaj S. Immune checkpoint inhibitors in metastatic melanoma therapy (Review). *Med Int (Lond)*. 2024;4:13.
11. Amaral T et al. ESMO Guidelines Committee. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up☆. *Annals of Oncology*. 2025;36:10-30.
12. Lund AW. Immune Potential Untapped: Leveraging the Lymphatic System for Cancer Immunotherapy. *Cancer Immunol Res*. 2022;10:1042-1046.
13. Lee R, Mandala M, Long GV, Eggermont AMM, van Akkooi ACJ, Sandhu S, Garbe C, Lorigan P. Adjuvant therapy for stage II melanoma: the need for further studies. *Eur J Cancer*. 2023;189:112914.
14. Keung EZ, Gershenwald JE. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018;18:775-784.
15. Jackson A, Warner N. Preparation, staining and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes, 3 edition.. In : Rose N., Friedmah H., Fahey J. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington DC : American Society for Microbiology, 1986 .