

УДК 617.764.1-006:612.017.11

Уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов у больных увеальной меланомой с различными клеточными типами

Л. Н. Величко, канд. мед. наук, В. В. Вит, д-р мед. наук, проф., А. П. Малецкий, д-р мед. наук

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины»

Ключевые слова: увеальная меланома, клеточные типы, молекулярные маркеры активации лимфоцитов, прогнозирование

Ключові слова: увеальна меланома, клітинні типи, молекулярні маркери активації лімфоцитів, прогнозування

Проведено дослідження рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів при різних клітинних типах увеальної меланоми.

Встановлено, що епітеліоїдні клітини мають низькоімуногенні властивості і найменший рівень експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів порівняно з іншими клітинними типами увеальної меланоми.

Доведено, що рівень експресії CD7⁺, а також CD150⁺ може бути використаним в прогнозуванні епітеліоїдного клітинного типу увеальної меланоми.

The level of expression of molecular markers of lymphocyte activation in patients with uveal melanoma of different cellular type

L. N. Velichko, V. V. Vit, A. P. Maletskiy

The Filatov Institute of Eye diseases and Tissue Therapy of National Medical Sciences Academy, Odessa

Key words: uveal melanoma, cell types, molecular markers of lymphocyte activation, forecasting

There was made the investigation of the level of expression of molecular markers of lymphocyte activation in different cellular types.

It is established that epithelioid cells have low immunogenic properties and the smallest level of expression of molecular markers of lymphocyte activation in comparison with other cellular types of uveal melanoma. It was proved that the level of expression of CD7⁺ as well as CD150⁺ may be used in prediction of epithelioid cellular type of uveal melanoma.

Введение. Увеальная меланома представляет собой своеобразную по гистогенезу и клиническим проявлениям высокозлокачественную форму опухолевого процесса, отличающуюся неравномерным ростом и выраженным метастазированием.

Морфологические исследования показали, что в большом числе увеальных меланом обнаруживаются морфологические признаки иммунного ответа клеточного типа, заключающиеся в наличии различной степени выраженности лимфоплазмочеточной инфильтрации паренхимы опухоли, а также прилежащих к опухоли отделов сосудистой оболочки и склеры. Как правило, степень инфильтрации опухоли различная — от едва заметных диффузных инфильтратов до массивных фокальных скоплений.

Выявляемые лимфоидные элементы отличаются высокой функциональной активностью, о чем свидетельствует примесь определенного количества лимфоцитов с повышенным содержанием ДНК [3].

Существуют общие закономерности иммунных реакций на опухолевый процесс. Вместе с тем опу-

холи различного гистогенеза могут избирательно индуцировать тот или иной эффекторный механизм иммунного ответа [4, 7, 9]. Иммунная система способна распознавать злокачественные клетки и реагировать на такое распознавание активацией с последующими каскадами иммунных реакций [2].

Для клинической иммунологии наибольший интерес представляет изменение экспрессии гликопротеидных молекул, связанных с антигензависимой активацией Т-клетки. Изменение клеточного микроокружения приводит к изменению фенотипа дифференцированного лимфоцита путем модуляции обмена молекул, входящих в состав мембранного и цитоплазматического пулов. Изучение изменения антигенного профиля мембраны лимфоцита позволяет понять частные механизмы этого процесса и имеет прямое отношение к решению актуальнейших проблем практической медицины [1]. В этой связи нам представилось целесоо-

© Л. Н. Величко, В. В. Вит, А. П. Малецкий, 2013

бразным провести исследование, направленное на выявление возможности определения клеточного типа увеальной меланомы на основании определения уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови.

Целью настоящего исследования явилось изучение уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови у больных увеальной меланомой с различными клеточными типами и определение возможности прогнозирования клеточного типа увеальной меланомы.

Материал и методы исследования

Проведено исследование уровня экспрессии маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов периферической крови у 88 больных увеальной меланомой с различными клеточными типами. Для иммунофенотипирования использовали панель МкАТ, которая включала антитела, реагирующие с антигенами CD7⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD95⁺, CD150⁺.

Характеристики МкАТ по структуре, экспрессии и функции антигенов [6, 8]:

- CD7⁺ — индуктор секреции цитокинов;
- CD25⁺ — рецептор интерлейкина;
- CD38⁺ — регулятор активации и пролиферации;
- CD45⁺ — участвует в рецептор-опосредуемой активации лимфоцитов;
- CD54⁺ — молекула межклеточной адгезии;
- CD95⁺ — индуктор апоптоза;
- CD150⁺ — усиливает пролиферацию и выработку иммуноглобулинов, активированных В- клетками.

Определение уровня экспрессии маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов проводилось гистоиммуноцитохимическим методом [5] у больных увеальной ме-

ланомой в возрасте 63,4 (SD 5,7) с установленным клеточным типом опухоли после проведения энуклеации. Первую группу составляли больные с веретеноклеточным Б типом опухоли — 6 больных. Вторая группа с веретеноклеточным типом А-Б состояла из 25 больных. Третья группа со смешанным клеточным типом — 42 человека. Четвертую группу составили больные с эпителиоидным клеточным типом в количестве 15 человек.

Для оценки полученных результатов использовался дисперсионный однофакторный анализ (ANOVA). Уровень различий сравниваемых групп проводился по критерию множественного сравнения Ньюмана-Кейлса. Средние значения указаны со среднеквадратическими отклонениями, представленными в скобках.

Также проведен ROC анализ с помощью биомедицинского пакета MedCalc 9.1. Проведено построение характеристической кривой (ROC), которая строилась по значению чувствительности (sensitivity) и специфичности (1 — specificity). Найдена оптимальная точка разделения, рассчитана площадь под характеристической кривой Receiver Operating Characteristic analysis (ROC-кривой).

Статистический анализ проведен с использованием лицензионного пакета «Statistica 9.0».

Полученные результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования проведен дисперсионный анализ для определения диагностической ценности панели маркеров активации лимфоцитов (CD7⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD95⁺, CD150⁺) с целью прогнозирования клеточного типа увеальной меланомы.

Выявлены информативные показатели на высоком уровне статистической значимости CD150⁺ (p=0,013) и CD7⁺ (p=0,0021) (табл. 1).

Таблица 1. Средние значения M(SD) абсолютного и относительного уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови больных увеальной меланомой при различных клеточных типах

Маркеры активации лимфоцитов	Клеточный тип увеальной меланомы M(SD)				F	p
	Веретеноклеточный Б n=6	Веретеноклеточный А-Б n=28	Смешанный n=47	Эпителиоидный n=15		
CD95 а	232,5 (103,2)	277,9 (158,8)	296,5 (194,8)	282,5 (275,1)	0,209	0,890
CD95 о	18,5 (4,2)	19,1 (7,2)	20,5 (9,0)	18,6 (12,6)	0,284	0,837
CD25 а	276,0 (140,7)	283,0 (188,1)	268,5 (169,7)	210,5 (152,1)	0,616	0,606
CD25 о	22,7 (7,8)	19,0 (7,3)	18,8 (7,6)	16,0 (9,1)	1,124	0,344
CD38 а	219,2 (105,4)	292,6 (202,0)	293,0 (229,8)	254,7 (252,1)	0,298	0,827
CD38 о	19,2 (10,40)	20,0 (9,71)	20,1 (10,14)	15,0 (7,75)	1,143	0,336
CD54 а	203,0 (103,4)	221,7 (145,4)	257,5 (170,9)	243,9 (250,5)	0,345	0,792
CD54 о	17,00 (5,8)	15,32 (5,8)	19,02 (9,3)	13,33 (6,4)	2,563	0,060
CD150 а	240,3 (86,8)	267,6 (176,4)	262,9 (136,7)	207,0 (161,7)	0,616	0,607
CD150 о	19,7 (3,9)	18,4 (7,5)	19,3 (7,2)	12,5 (5,7)	3,801	0,013
CD45 а	311,7 (231,5)	231,1 (126,7)	270,9 (194,2)	263,7 (205,2)	0,452	0,717
CD45 о	24,7 (12,6)	16,3 (6,5)	19,0 (8,7)	15,4 (6,6)	2,256	0,088
CD7 а	214,0 (54,3)	281,7 (161,0)	237,0 (150,6)	227,9 (169,2)	0,620	0,604
CD7 о	18,0 (3,10)	18,8 (7,36)	16,7 (6,70)	9,1 (2,14)	7,236	0,0002

Примечание: а — абсолютное содержание (кл/мкл), о — относительное содержание (%); F — критерий Фишера; p — уровень значимости по критерию множественного сравнения Ньюмана-Кейлса.

На следующем этапе исследования для молекулярных маркеров активации лимфоцитов, имеющих различия в группах с разным клеточным типом по данным дисперсионного анализа на уровне $p < 0,05$, был проведен post-hoc анализ с использованием критерия множественного сравнения Ньюмана-Кейлса. Анализ показал, что у пациентов с эпителиоидным клеточным типом уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов CD150⁺ и CD7⁺ достоверно ниже, чем при любых других гистологических типах.

Из рисунка 1 видно, что уровень экспрессии молекулярного маркера активации CD150⁺ при эпителиоидном клеточном типе достоверно ниже относительно всех других клеточных типов увеальной меланомы. Из представленных в таблице 1 данных видно, что при веретенноклеточном Б типе уровень экспрессии CD150⁺ составил 19,7 % (SD 3,8) %, $p = 0,042$ в сравнении с эпителиоидным клеточным типом, при веретенноклеточном А-Б типе 18,4 % (SD 7,4) %, $p = 0,029$ в сравнении с эпителиоидным клеточным типом, при смешанном клеточном типе 19,3 % (SD 7,2) %, $p = 0,033$ в сравнении с эпителиоидным клеточным типом, при эпителиоидном 12,5 % (SD 5,6) %.

Для молекулярного маркера активации CD7⁺ (рис. 2) уровень различий в зависимости от клеточного типа более значительный. При веретенноклеточном клеточном типе уровень экспрессии CD7⁺ наиболее высокий, при эпителиоидном клеточном типе значительно ниже. При веретенноклеточном Б типе уровень экспрессии CD7⁺ составил 18,0 % (SD 3,1) %, при веретенноклеточном А-Б типе 18,8 % (SD 7,36) %, при смешанном клеточном типе 16,7 % (SD 6,7) %, при эпителиоидном клеточном типе 9,1 % (SD 2,14) %.

Найденные достоверные различия по двум маркерам активации лимфоцитов периферической крови больных увеальной меланомой с различными клеточными типами дают основание определить возможность прогнозирования наиболее злокачественного клеточного типа меланомы. Для выполнения этой задачи были сформированы две группы: первая группа — эпителиоидные клеточные типы, вторая группа — смешанные, веретенноклеточные Б и веретенноклеточные А-Б типы.

При анализе результатов отмечено, что уровень экспрессии молекулярного маркера активации лимфоцитов CD54⁺ при эпителиоидном клеточном типе составил 13,3 % (SD 6,40) %, при других клеточных типах — вторая группа — 17,6 % (SD 8,15) %, $p = 0,05$. Активационный маркер CD150⁺ при эпителиоидном клеточном типе составил 12,5 % (SD 5,67) %, при других клеточных типах 19,0 % (SD 7,02) %, $p = 0,001$. Аналогичная картина отмечена при изучении уровня экспрессии CD7⁺, который достоверно ниже при эпителиоидном клеточном типе 9,1 % (SD 2,14) %, при других клеточных типах 17,5 % (SD 6,72) %, $p = 0,00003$.

Полученные результаты показывают, что эпителиоидный клеточный тип является низкоиммунногенным, при веретенноклеточных и смешанных клеточных типах отмечается более высокий уровень активации лимфоцитов.

Низкая иммуногенность эпителиоидного клеточного типа в некоторой степени объясняет тот факт, что данный клеточный тип является наиболее злокачественным и более часто метастазирует [4]. Различный характер иммунного ответа на разные гистотипы увеальной меланомы определяется антигенными особенностями опухолевой клетки.

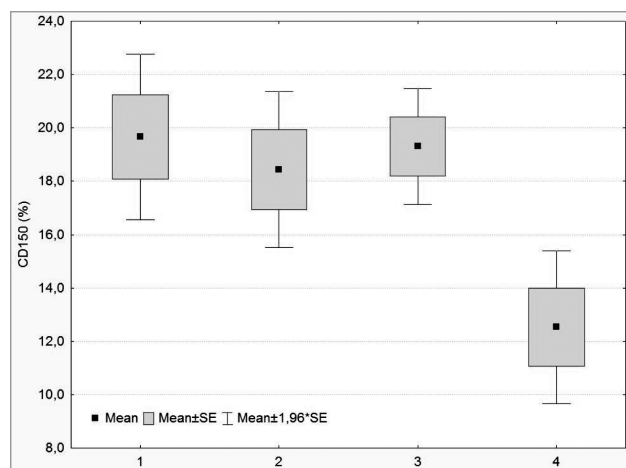


Рис. 1. Средние значения и разброс относительных показателей (%) уровня экспрессии CD150⁺ в зависимости от клеточного типа увеальной меланомы (1 — веретенноклеточный Б тип, 2 — веретенноклеточный А-Б тип, 3 — смешанный тип, 4 — эпителиоидный клеточный тип).

Примечание: $p_{4-1} = 0,002$; $p_{4-2} = 0,001$; $p_{4-3} = 0,003$.

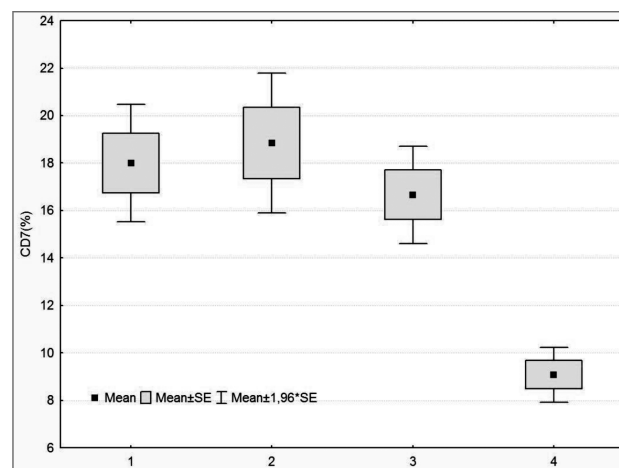


Рис. 2. Средние значения и разброс относительных показателей (%) уровня экспрессии CD7⁺ в зависимости от клеточного типа увеальной меланомы (1 — веретенноклеточный Б тип, 2 — веретенноклеточный А-Б тип, 3 — смешанный тип, 4 — эпителиоидный клеточный тип).

Примечание: $p_{4-1} = 0,002$; $p_{4-2} = 0,001$; $p_{4-3} = 0,003$.

Изучение особенностей активации лимфоцитов при различных клеточных типах увеальной меланомы может иметь практическое значение, заключающееся в возможности прогнозирования эпителиоидного клеточного типа, являющегося наиболее злокачественным.

Для выявления наиболее информативного из трех маркеров активации CD7⁺, CD150⁺ и CD54⁺ был проведен ROC анализ. Проведение ROC анализа позволило определить оптимальные точки разделения, при которых достигаются наиболее высокие значения чувствительности и специфичности.

Из представленных в таблице 2 результатов видно, что наиболее высокой прогнозирующей ценностью обладает маркер активации лимфоцитов CD7⁺. Оптимальная точка разделения, при которой достигаются наиболее высокие значения чувствительности и специфичности для CD7⁺, составила $\leq 12\%$. Указанной линии раздела соответствуют чувствительность теста — 100 % и специфичность 74,6 %. Несколько меньшей прогнозирующей ценностью обладает маркер активации лимфоцитов CD150⁺, оптимальная точка разделения для которого составила $\leq 14\%$. Указанной линии раздела соответствует чувствительность 66,7 % и специфичность 73,9 %. Наименьшей прогнозирующей ценностью обладает маркер активации лимфоцитов CD54⁺, оптимальная точка разделения для которого составила $\leq 8\%$, чувствительность — 33,3 %, специфичность 92,5 %.

Из рисунков 1–3 видны основные характеристики диагностической возможности трех молекулярных маркеров активации лимфоцитов. Так, наибольшая площадь под ROC кривой отмечена для CD7⁺, она составляет 0,88; для CD150⁺ эта площадь меньше и составляет 0,76; наиболее низкая диагностическая возможность у CD54⁺, площадь под кривой составляет 0,67.

Таким образом, проведенный ROC анализ показал, что наиболее информативными в прогнозировании эпителиоидного клеточного типа являются два маркера активации лимфоцитов: CD7⁺, который обладает высокой чувствительностью и несколько меньшей специфичностью, и CD150⁺, у которого специфичность и чувствительность несколько ниже. Данные молекулы экспрессируются при антигензависимой активации лимфоцита

Таблица 2. Сравнение и оценка предикторной способности молекулярных маркеров активации CD7⁺, CD150⁺ и CD54⁺ в прогнозировании эпителиоидного клеточного типа меланомы по данным ROC анализа

МАРКЕРЫ АКТИВАЦИИ	Площадь ROC кривой	P	Точки РАЗДЕЛЕНИЯ (%)	Чувствительность (%)	Специфичность (%)
CD7	0,877	0,0001	≤ 12	100,0	74,65
CD150	0,764	0,0001	≤ 14	66,67	73,97
CD54	0,667	0,01	≤ 8	33,33	92,59

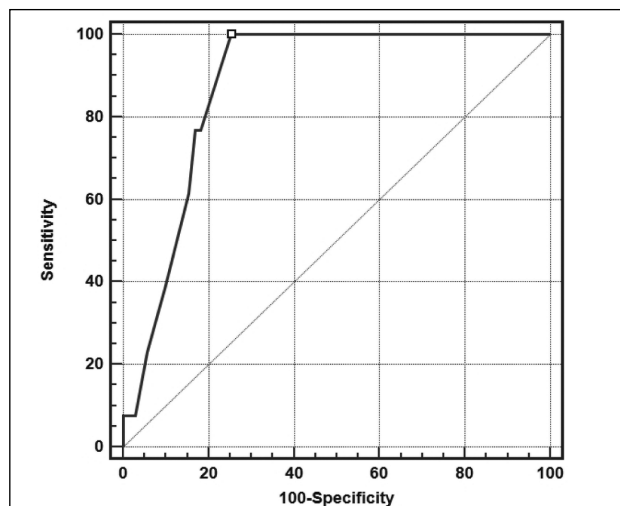


Рис. 3. Характеристическая кривая зависимости чувствительности от 1- специфичности для CD7⁺.

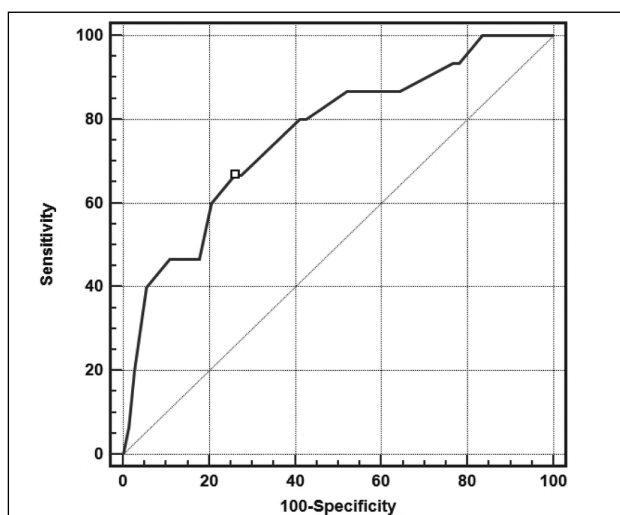


Рис. 4. Характеристическая кривая зависимости чувствительности от 1-специфичности для CD150⁺

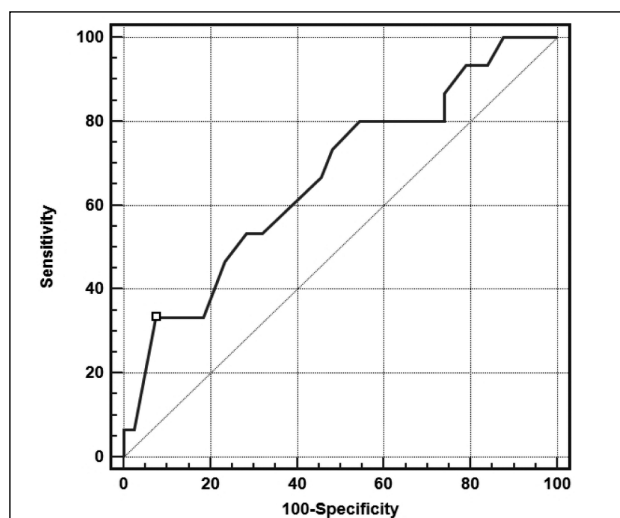


Рис. 5. Характеристическая кривая зависимости чувствительности от 1- специфичности для CD54⁺.

на этапе костимуляции. Молекула CD7⁺ функционирует как костимуляторная молекула, которая является индуктором секреции цитокинов и экспрессируется на самых ранних этапах активации лимфоцитов. Молекула CD150⁺ также является костимулирующей и участвует в пролиферации и выработке иммуноглобулинов.

Маркер активации лимфоцитов CD54⁺ несмотря на высокую специфичность обладает низкой чувствительностью. Это обуславливает его низкую предикторную способность в прогнозировании эпителиоидного клеточного типа увеальной меланомы. Молекула межклеточной адгезии CD54⁺ (ICAM) является показателем кооперативного взаимодействия в ответ на антигенный стимул.

Выводы

1. Эпителиоидный клеточный тип увеальной меланомы является низкоиммуногенным, уровень

экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови CD7⁺, CD150⁺ и CD54⁺ при данном клеточном типе достоверно ниже, чем при смешанном и веретенноклеточных типах опухоли.

2. Высокой предикторной способностью в прогнозировании эпителиоидного клеточного типа увеальной меланомы обладают костимуляторные молекулы CD7⁺ (точка раздела $\leq 12\%$, чувствительность 100%, специфичность 74,6%) и CD150⁺ (точка раздела $\leq 14\%$, чувствительность 66,67%, специфичность 73,97%). Маркер активации CD54⁺ обладает меньшей предикторной способностью в прогнозировании эпителиоидного клеточного типа увеальной меланомы (точка раздела $\leq 8\%$, чувствительность 33,33%, специфичность 92,59%).

Авторы статьи выражают искреннюю благодарность Е. И. Драгомирецкой за помощь в статистической обработке данных.

Литература

1. **Бережная Н. М.** Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. II. Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения / Н. М. Бережная // Онкология. — 2009. — Т. 11. — № 2. — С. 86–93.
2. **Бережной А. Е.** Молекулярные механизмы взаимодействия опухоли и иммунной системы / А. Е. Бережной, Н. В. Гнучев, Г. П. Георгиев, А. М. Козлов, С. С. Ларин // Вопросы онкологии. — 2008. — № 6. — С. 669–683.
3. **Вит В. В.** Патологическая анатомия и лечебный патоморфоз пигментных новообразований увеального тракта глаза человека: Автореф. дис... д-ра мед. наук: спец. 14.03.02 «Патологическая анатомия» / В. В. Вит. — Одесса. — 1987. — 30 с.
4. **Вит В. В.** Опухолевая патология органа зрения / В. В. Вит. — Одесса: Астропринт, 2009. — Т. 1. — 610 с.
5. **Глузман Д. Ф.** Диагностическая иммуноцитохимия опухолей / Д. Ф. Глузман, Л. М. Склярченко, В. А. Надгорная, И. А. Крячок. — Киев: Морион, 2003. — С. 6–15.
6. **Глузман Д. Ф.** Классификация лейкоцитов человека (система CD) / Д. Ф. Глузман, Л. М. Склярченко, В. А. Надгорная. — Семинары по гематологии (выпуск 10). — Киев, 2003. — 40 с.
7. **Зиангирова Г. Г.** Опухоли сосудистого тракта глаза / Г. Г. Зиангирова, В. Г. Лихванцева. — Москва: Последнее слово, 2003. — 456 с.
8. Моноклональні антитіла для медико-біологічних досліджень. Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. — Київ, 2003. — 16 с.
9. **Kilis E.** Clinical and cytogenetic analyses in uveal melanoma / E. Kilis // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2006. — V. 47. — P. 3703–3707.

Авторы статьи выражают искреннюю благодарность Е. И. Драгомирецкой за помощь в статистической обработке данных.

Поступила 18.03.2013