

Прогнозирование инвазии склеры увеальной меланомой при помощи молекулярных маркеров активации лимфоцитов

Л. Н. Величко, В. В. Вит, А. П. Малецкий, Е. И. Драгомирецкая

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

Ключевые слова: увеальная меланома, инвазия склеры, молекулярные маркеры активации лимфоцитов, ROC анализ, логистическая регрессия.

Ключові слова: увеальна меланома, інвазія склери, молекулярні маркери активації лімфоцитів, ROC аналіз, логістична регресія.

Мета дослідження. Вивчити можливість прогнозування інвазії склери увеальною меланомою за допомогою молекулярних маркерів активації лімфоцитів.

Матеріал та методи. Проведено порівняльний аналіз рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів у хворих на увеальну меланому з проростанням пухлини у склеру (84 хворих) та без інвазії склери (173 хворих). Рівень експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів визначали за допомогою моноклональних антитіл гістоімунохімічним методом.

Результати. Встановлено, що у хворих на увеальну меланому з інвазією склери відбувається порушення гематофтальмічного бар'єру, що призводить до активації імункомпетентних клітин та достовірного збільшення рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів CD7⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD95⁺, CD150⁺ у порівнянні з пацієнтами без інвазії. В дослідженні проведена оцінка предикторної можливості молекулярних маркерів активації лімфоцитів для прогнозування інвазії склери увеальною меланомою. Проведення ROC аналізу показало, що найбільш інформативними виявилися CD95⁺ та CD54⁺.

Висновок. Визначено порогові значення рівня експресії на лімфоцитах периферичної крові CD95⁺ >325 кл/мкл та CD54⁺ >19 % які дозволяють з вірогідністю 80 % прогнозувати проростання увеальної меланоми у склеру.

Prediction of invasion sclera uveal melanoma using molecular markers lymphocyte activation

L. Velichko, V. V. Vit, A. P. Malecki, E. Dragomiretskaya

SI «The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy NAMS of Ukraine»

Key words: uveal melanoma scleral invasion, molecular markers of lymphocyte activation, ROC analysis, logistic regression.

The purpose. To study the predictability of uveal melanoma scleral invasion with molecular markers of lymphocyte activation.

Material and methods. A comparative analysis of the expression of lymphocyte activation molecular markers was made in patients with uveal melanoma with tumor invasion into the sclera (84 patients) and without scleral invasion (173 patients). The level of expression of molecular markers of lymphocyte activation was determined using monoclonal antibodies by histoimmunochemical method.

Results. A study of the expression level of lymphocyte activation markers was made in patients with uveal melanoma with and without scleral invasion. Uveal melanoma patients with scleral invasion had a violation of hematoophthalmic barrier, which led to the activation of immune cells and significant increase in the expression of molecular markers of activated lymphocytes CD7 + CD25 + CD38 + CD45 + CD54 + CD95 + CD150 + in comparison to patients without invasion.

The study evaluated predictability of lymphocyte activation molecular markers for predicting uveal melanoma scleral invasion. ROC analysis showed that the most informative markers were CD95⁺ and CD54⁺. Thresholds expression level was defined on peripheral blood lymphocytes CD95⁺ > 325 cells / μ L and CD54⁺ > 19% enabling to predict (80%) germination of uveal melanoma in the sclera.

Введение. Распространение злокачественных меланом в средние слои склеры, особенно в эписклеру и орбиту значительно ухудшает прогноз.

При отсутствии инвазии выживаемость на протяжении пяти лет после энуклеации составляет 89,7 % (десятилетняя — 81,7 %), а при эписклеральном распространении меланомы — 42,5 % (десятилетняя — 23,8 %) [1].

Прогноз для жизни при злокачественных меланомах, прорастающих в зрительный нерв и его оболочку, зависит от наличия дальнейшего распространения опухоли в орбите, значительно ухудшающего прогноз. Выживание при наличии инвазии зрительного нерва и орбиты при пятилетнем наблюдении составляет всего 10 % [1, 2]. Возникновение вторичных злокачественных меланом в орбите связано с наличием интенсивной инвазии меланомой наружных слоев склеры, эписклеры и орбиты [2].

Поскольку глаз является забарьерным органом, то при прорастании увеальной меланомы в слои склеры происходит нарушение гистогематических барьеров. В настоящее время известно, что гомеостаз в глазу поддерживается при помощи ряда молекулярных механизмов, ограничивающих иммунный ответ в тканях глаза. Структуры глаза имеют крайне ограниченную способность к регенерации и могут быть полностью разрушены в результате клеточного иммунного ответа, который сопровождается местной продукцией TNF- α и IFN- γ [3]. В связи с этим для активной супрессии клеточно-опосредованного иммунного ответа ткани глаза используют два основных механизма:

- экспрессию эпителиальными клетками, выстилающими переднюю камеру глаза, лиганда Fas (Fas L);

- содержание в жидкости передней камеры цитокина TGF- β [4, 5].

Fas L на эпителиальных клетках взаимодействует с Fas (CD95⁺), которые несут проникающие в глаз Т-лимфоциты, что вызывает апоптоз Т-клеток. TGF- β ограничивает пролиферацию Т-клеток и может индуцировать Th2-ответ, а также, возможно, появление Treg. Кроме того, экспрессия Fas L благоприятствует переключению иммунного ответа на Th2-тип, так как Fas L легче индуцирует апоптоз Th1-клеток по сравнению с Th2-клетками [6].

Наша гипотеза заключалась в том, что при прорастании меланомы в слои склеры происходит нарушение гистогематических барьеров с последующим нарушением гомеостаза глаза и активацией Т-клеток. Для подтверждения этой гипотезы нами был изучен уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов, отражающий разные этапы активации Т-лимфоцитов.

Цель исследования: изучить возможность прогнозирования инвазии склеры увеальной мелано-

мой при помощи молекулярных маркеров активации лимфоцитов.

Материал и методы

В исследование было включено 257 пациентов увеальной меланомой. Забор крови осуществлялся до проведения энуклеации. После проведения энуклеации гистологическое исследование позволяло определить наличие инвазии склеры меланомой.

Все пациенты были разделены на две группы. В первую группу вошли пациенты с увеальной меланомой без инвазии склеры — 173 пациента. Вторую группу составили пациенты с инвазией склеры — 84 пациента.

Уровень экспрессии активационных маркеров лимфоцитов периферической крови определялся гистоиммуноцитохимическим методом [3] с использованием MkAT.

Для иммунофенотипирования использовали панель MkAT, которая включала антитела, реагирующие с антигенами CD7⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD95⁺, CD150⁺.

CD7⁺ — член молекулярного семейства IgSF с молекулярной массой 40 кД. Экспрессирован на тимоцитах, зрелых Т-клетках, НК-клетках, полипотентных гемопоэтических стволовых клетках, кроветворных и лимфоидных клетках-предшественниках. Функционирует как костимуляторная молекула, индуктор секреции цитокинов, модификатор адгезии клеток.

CD25⁺ — Тас-антиген-высоко O- N-гликозирированная молекула типа I. Молекулярная масса 55 кД. Выраженная экспрессия в Т-клетках, стимулированных ФГА, в В-клетках, стимулированных анти-IgM-антителами, моноцитах и макрофагах, активированных ЛПС. Функционирует как рецептор ИЛ-2, лигандами которого являются ИЛ-2, CD122⁺ (ИЛ-2R β) и CD132⁺ (ИЛ-2R γ).

CD38⁺ — одноцепочечная трансмембранная молекула типа II (АДФ-рибозилциклаза). Молекулярная масса 45 кД. Экспрессируется на большинстве гемопоэтических клеток, преимущественно на ранних стадиях дифференцировки и при активации. Высокий уровень экспрессии на плазматических клетках. Выявляется в ткани головного мозга, почках, мышцах. Функционирует как регулятор активации и пролиферации, зависящий от клеточного микроокружения, участвует в адгезии лимфоцитов и эндотелиальных клеток. Используется для мониторинга при ВИЧ-инфекции и иммунофенотипировании лейкозов и лимфом.

CD45⁺ — рецептор протенирозинфосфатазы — длинная одноцепочечная трансмембранная молекула типа I. Молекулярная масса изоформ CD45⁺ — 180, 200, 210, 220 кД. Общий лейкоцитарный антиген (LCA). Высокий уровень экспрессии на всех гемопоэтических клетках. Особенно высокая плотность экспрессии на лимфоцитах (10 % их поверхности приходится на CD45⁺). Для различных субпопуляций кроветворных клеток характерна экспрессия разных изоформ: CD 45RO на кортикальных тимоцитах, активированных Т-клетках, Т-клетках памяти; CD 45RA на медуллярных тимоцитах, покоящихся Т-клетках и т.д. Может наблюдаться экспрессия многих изоформ на одном типе клеток. Лиганды — галектин-1, CD2⁺, CD3⁺, CD4⁺, ассоциированный с фосфатазой лимфоцитов фосфопротеин (LPAP). CD45⁺ участвует в активации лимфоцитов через TCR и BCR, в рецептор-опосредуемой активации других типов лейкоцитов.

CD54⁺ — молекула межклеточной адгезии — 1 (ICAM-1), член семейства IgSF. Молекулярная масса 90 кД. Вы-

сокий уровень экспрессии на активированных эндотелиальных клетках, клетках некоторых солидных опухолей, умеренный — на активированных Т-лимфоцитах, активированных В-лимфоцитах и моноцитах. Экспрессия CD54⁺ индуцируется на эпителиальных, эндотелиальных клетках и фибробластах при действии цитокинов (ФНО, ИЛ-1, ИФγ). Взаимодействие с CD11a/CD18 (LFA-1) или CD11b/CD18 (Mac-1) приводит к развитию иммунных реакций и/или воспаления. Является рецептором риновируса и эритроцитов, инфицированных малярийными паразитами.

CD95⁺ — антиген апоптоза 1 (АРТ1), или Fas-антиген с молекулярной массой 45 кД. Трансмембранная молекула типа I, относящаяся к суперсемейству рецепторов ФНО. Высокий уровень экспрессии на активированных Т- и В-клетках. Опосредует сигналы, индуцирующие апоптоз.

CD150⁺ — одноцепочечная трансмембранная молекула типа I (SLAM, IPO-3) с молекулярной массой 65–85 кД. Экспрессируется на тимоцитах, субпопуляции CD45RO Т-лимфоцитов, В-лимфоцитах, дендритических клетках, эндотелиальных клетках. Выполняет функции костимулирующей молекулы на В-лимфоцитах и дендритических клетках. Связывание с лигандами (тирозин и серин/треонин-киназой, тирозинфосфатазой CD45⁺) усиливает пролиферацию и выработку иммуноглобулинов активированными В-клетками.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica 10.0 и MedCalc 9.0

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования проводилось изучение уровня различий между средними показателями экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов CD7⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD95⁺, CD150⁺ у больных с инвазией увеальной меланомы в слои склеры и без инвазии.

У больных с инвазией склеры уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов достоверно выше, чем у больных без инвазии. Данные различия связаны с тем, что при прорастании увеальной меланомы в слои склеры происходит нарушение гематоофтальмического барьера. Это приводит к активации лимфоцитов периферической крови. Уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов CD7⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD95⁺, CD150⁺ достоверно увеличивается по сравнению с пациентами без инвазии.

Высокий уровень различий в показателях экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов у больных с прорастанием опухоли и без прорастания (табл. 1) дает основание использовать их для получения математической модели вероятности прорастания увеальной меланомы в зависимости от значений исследуемых маркеров.

На первом этапе создания прогностической модели были получены количественные значения маркеров, которые наилучшим образом разделяют группы больных с прорастанием и без прорастания опухоли. В табл. 2 показаны результаты ROC (Receiver Operating Characteristic) анализа для оцен-

ки информативности маркеров, обладающих наибольшей дискриминирующей способностью.

По представленным в таблице 2 оптимальным точкам разделения были созданы бинарные переменные, на основе которых, с использованием логистической регрессии, была получена математическая модель, имеющая достаточную статистическую оценку ($\chi^2=50,6$; $p=0,000001$), и точность предсказания наличия или отсутствия инвазии составила 76,5 %.

В результате проведенного ROC анализа для всех исследуемых маркеров наибольшая площадь под ROC кривой была получена для CD95⁺, она составляет 0,84, для CD54⁺ эта площадь меньше и составляет 0,71. Абсолютное значение CD 95⁺ обладает большей чувствительностью, которая составляет 75,0 %, по сравнению с относительным значением CD 54⁺, чувствительность которого составила 58,3 %. Специфичность этих маркеров, как следует из данных таблицы 2 одинакова.

Следовательно, абсолютное значение CD 95⁺, превышающее 325 кл/мл, является положительным

Таблица 1. Уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов у больных увеальной меланомой с инвазией и без инвазии (M (SD))

| Молекулярные маркеры | Без инвазии | С инвазией | p* | p** |
|-----------------------------------|-------------|------------|--------|-------|
| CD 95 ⁺ абсолютное | 217 (124) | 468 (218) | 0,000 | 0,000 |
| CD 95 ⁺ относительное | 17 (8) | 26 (8) | 0,000 | 0,000 |
| CD 25 ⁺ абсолютное | 216 (130) | 373 (193) | 0,000 | 0,000 |
| CD 25 ⁺ относительное | 17 (7) | 20 (7) | 0,0035 | 0,002 |
| CD 38 ⁺ абсолютное | 217 (161) | 397 (234) | 0,000 | 0,000 |
| CD 38 ⁺ относительное | 16 (8) | 22 (9) | 0,0001 | 0,000 |
| CD 54 ⁺ абсолютное | 199 (141) | 375 (196) | 0,000 | 0,000 |
| CD 54 ⁺ относительное | 16 (8) | 21 (7) | 0,000 | 0,000 |
| CD 150 ⁺ абсолютное | 206 (122) | 350 (159) | 0,0000 | 0,000 |
| CD 150 ⁺ относительное | 16 (7) | 20 (5) | 0,0033 | 0,000 |
| CD 45 ⁺ абсолютное | 223 (153) | 369 (221) | 0,0000 | 0,000 |
| CD 45 ⁺ относительное | 17 (8) | 21 (8) | 0,01 | 0,004 |
| CD 7 ⁺ абсолютное | 197 (112) | 317 (172) | 0,0002 | 0,000 |
| CD 7 ⁺ относительное | 15 (6) | 17 (7) | 0,036 | 0,031 |

Примечание: * — уровень значимости различий по критерию Стьюдента, ** — уровень значимости различий по критерию Манна-Уитни.

Таблица 2. Сравнение и оценка предикторной способности молекулярных маркеров активации лимфоцитов CD95⁺ и CD54⁺ для прогнозирования прорастания увеальной меланомы в слои склеры по данным ROC анализа

| Молекулярные маркеры активации лимфоцитов | Площадь под ROC кривой | p | Точки разделения (%) | Чувствительность (%) | Специфичность (%) |
|---|------------------------|--------|----------------------|----------------------|-------------------|
| CD 95 ⁺ абсолютное | 0,84 | 0,0001 | > 325 кл/мл | 75,0 | 77,7 |
| CD 54 ⁺ относительное | 0,71 | 0,0001 | > 19 % | 58,3 | 77,7 |

Таблица 3

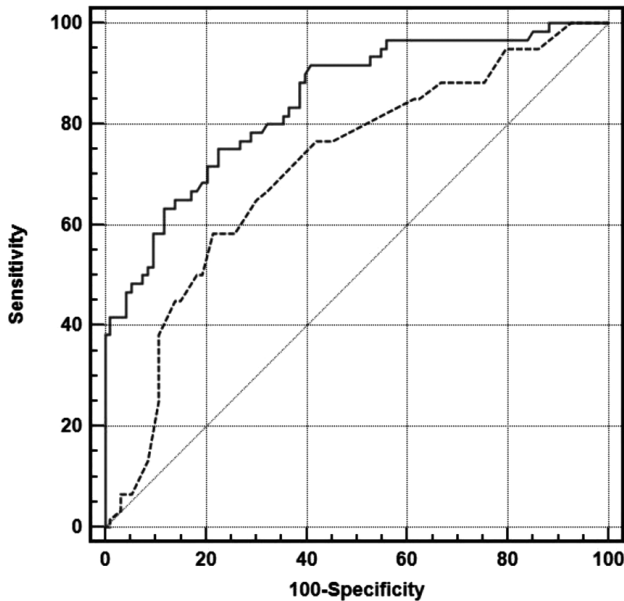


Рис. 1. Характеристические кривые для маркеров CD 95⁺ (сплошная линия) и CD 54⁺ (пунктирная линия).

тестом относительно прорастания опухоли, превышение относительного значения CD 54⁺ выше 19 % также может рассматриваться как положительный тест инвазии.

Таким образом, инвазия склеры увеальной меланомой приводит к достоверному по сравнению с больными без инвазии склеры увеличению уровня экспрессии молекулы межклеточной активации и адгезии CD54⁺ (ICAM). Увеличение уровня экспрессии CD54⁺ (ICAM) при прорастании меланомы в слой склеры свидетельствует об активации кооперативного взаимодействия иммунокомпетентных клеток в ответ на антигенный стимул при нарушении гематоофтальмического барьера.

После высокого уровня антигенной стимуляции лимфоциты подвергаются апоптозу. Следует отметить, что CD95⁺ является FAS лигандом апоптоза, и у больных с инвазией склеры увеальной меланомой он достоверно выше, чем у пациентов без инвазии. Апоптоз обеспечивает делецию клеток с высокой авидностью к антигену, а также гибель лимфоцитов, не способных к иммунному ответу после завершения их функции. При длительной антигенной стимуляции клетки подвергаются гибели через так называемый «рецептор гибели». Наиболее важный — рецептор FAS, который при перекрестном связывании со своим лигандом

Группы риска прорастания увеальной меланомы в зависимости от уровня экспрессии CD95⁺ и CD54⁺ и их сочетания

| Группы риска прорастания | CD95 ⁺ кл/мкл | CD54 ⁺ % | p | n | % |
|--------------------------|--------------------------|---------------------|------|----|------|
| I группа риска | – | – | 0,13 | 76 | 43,8 |
| II группа риска | – | + | 0,32 | 20 | 13,1 |
| III группа риска | + | – | 0,55 | 30 | 19,6 |
| IV группа риска | + | + | 0,78 | 36 | 23,5 |

Примечание: p — расчетное значение вероятности прорастания меланомы по результатам логистической регрессии; n — число пациентов с увеальной меланомой, имеющих представленные сочетания факторов риска.

(FAS L) приводит к активации каспазного каскада через каспазу-8 и, в итоге, к гибели клетки через апоптоз.

В таблице 3 представлена рассчитанная с помощью модели вероятность прорастания опухоли при различном сочетании двух молекулярных маркеров CD95⁺ и CD54⁺.

Таким образом, относительно инвазии, I группу риска составили пациенты, у которых оба теста отрицательны (значения двух маркеров не превышают пороговые), при этом вероятность прорастания наиболее низкая — 13 %. У пациентов II группы риска положительный только тест по значению CD54⁺, при этом вероятность прорастания составляет 32 %. У пациентов III группы положительный тест по абсолютному значению CD95⁺ свидетельствует о вероятности прорастания в 55 % случаев. Сочетание двух положительных тестов у пациентов IV группы риска приводит к повышению вероятности инвазии до 78 % (табл. 3).

Заключение

Исследован уровень абсолютных и относительных значений маркеров активации лимфоцитов у больных с увеальной меланомой с прорастанием и без прорастания опухоли в склеру. При прорастании опухоли отмечается статистически значимое повышение уровней CD7⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD95⁺, CD150⁺.

Определены пороговые значения уровня экспрессии на лимфоцитах периферической крови CD95⁺ >325 кл/мкл и CD54⁺ >19 %, которые с точностью 76,5 % позволяют прогнозировать прорастание увеальной меланомы в слой склеры.

Литература

1. **Вит В. В.** Опухолевая патология органа зрения / В. В. Вит. — Одесса: Астропринт, 2009. — Т. 1. — 610 с.
2. **Вит В. В.** Патологическая анатомия и лечебный патоморфоз пигментных новообразований увеально-го тракта глаза человека: Автореф. дис... д-ра мед. наук: спец. 14.03.02 «Патологическая анатомия» / В. В. Вит. — Одесса. — 1987. — 30 с.
3. **Мейл Д.** Иммунология / Д. Мейл, Д. Бростофф, Д. Б. Ройт. — М.: Логосфера, 2007. — 555 с.
4. **Engelhardt B.** The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms / B. Engelhardt, R. M. Ransohoff // Trends Immunol. — 2005. — V. 26. — P. 485–495.
5. **Greenwood J.** New Concepts of a blood-brain barrier / J. Greenwood, D. J. Begley, M. B. Segal. — New York, London: Plenum Press, 1995. — 331 p.
6. **Zhang X.** Unequal death in T-helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis / X. Zhang, T. Brunner, L. Carter et al. // J. Exp. Med. — 1997. — V. 185. — № 10. — P. 1837–1849.

References

1. **Vit VV.** Tumor pathology of the vision. Odessa: Astroprint; 2009. 610 p.
2. **Vit VV.** Pathological anatomy and medical pathomorphosis of pigmented neoplasms of human eye uveal tract: author's abstract. Doctor of Med. Sc. Pathologic Anatomy. Odessa; 1987. 30 p.
3. **Male D, Brostoff J, Dig DB.** Immunology. M.: Logosfera; 2007. 555 p.
4. **Engelhardt B, Ransohoff RM.** The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. Trends Immunol. 2005; 26: 485–95.
5. **Greenwood J, Begley DJ.** New Concepts of a blood-brain. New York, London: Plenum Press; 1995. 331 p.
6. **Zhang X, Brunner T, Carter L et al.** Unequal death in T-helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. J. Exp. Med. 1997; 185(10): 1837–49.