

УДК 617.723–006.81.04–085–036.8–084:612.017.11

## Прогнозирование эффективности органосохраняющего лечения больных увеальной меланомой при помощи молекулярных маркеров активации лимфоцитов

Л. Н. Величко, канд. мед. наук, А. П. Малецкий, докт. мед. наук., проф., В. В. Вит, докт. мед. наук, проф., А. В. Богданова, канд. биол. наук

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины»; Одесса (Украина)

E-mail: alex\_immun@mail.ru

**Вступ.** Одним з підходів до прогнозування результату органозберігаючого лікування є вивчення рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів. Зміна рівня експресії рецепторів на поверхні клітини відображає процеси, що відбуваються в організмі.

**Мета дослідження** — вивчення можливості прогнозування ефективності органозберігаючого лікування за допомогою молекулярних маркерів активації лімфоцитів.

**Матеріал і методи.** У 150 хворих увеальною меланомою проведено дослідження рівня експресії CD54+ та CD95+ на лімфоцитах периферичної крові гістоімуноцитохімічним методом. I група (116 пацієнтів) — хворі з регресією увеальної меланоми після фотокоагуляції та β-терапії; II група (34 пацієнта) — хворі з прогресивним ростом пухлини і подальшим видаленням ока.

**Результати дослідження.** Проведення ROC аналізу для оцінки інформативності предикторної можливості молекулярних маркерів CD54+ та CD95+ дозволило визначити рівні даних маркерів, за допомогою яких можливо прогнозування результату органозберігаючого лікування. Визначені порогові значення абсолютного рівня експресії CD54+ (вище 171 кл/мкл) та CD95+ (вище 282 кл/мкл), а також відносного рівня CD54+ (вище 19%) та CD95+ (вище 18%), які дозволяють прогнозувати регресію меланоми у 77,2% випадків. Експресія CD54+ та CD95+ нижче цього рівня дозволяє прогнозувати подальший рост пухлини у 70,5% випадків.

**Висновок.** Визначення рівня експресії молекулярних маркерів CD54+ та CD95+ в периферичній крові хворих на увеальну меланому може бути використано для прогнозування результату органозберігаючого лікування та життєвого прогнозу для таких хворих.

**Ключевые слова:** увеальная меланома, молекулярные маркеры активации лимфоцитов, прогнозирование результата лечения.

**Ключові слова:** увеальна меланома, молекулярні маркери активації лімфоцитів, прогнозування результату лікування.

## Prediction the results of ablative treatment in patients with uveal melanoma using molecular markers of lymphocyte activation

L. N. Velichko, A. P. Maletsky, V. V. Vit, A. V. Bogdanova

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

**Abstract.** One approach to predicting the outcome of ablative treatment is the study of the expression of molecular markers of lymphocyte activation. Changing the level of expression of receptors on the cell surface reflects the processes in the body. The purpose — to explore the possibility of predicting the results of ablative treatment using molecular markers of lymphocyte activation.

A comparative analysis of the expression of lymphocyte activation molecular markers was made in 150 patients with uveal melanoma. The expression level of molecular markers of lymphocyte activation CD54+ and CD95+ was studied using monoclonal antibodies by histoimmunocytochemical method on peripheral blood lymphocytes. I group (116 patients) — patients with uveal melanoma regression after photocoagulation and β-therapy; II group (34 patients) — patients with progressive tumor growth and subsequent removal of the eye.

© Л. Н. Величко, А. П. Малецкий, В. В. Вит, А. В. Богданова, 2015

*The study evaluated informative predictability of lymphocyte activation molecular markers CD54+ and CD95+ to assess possible to determine the level of markers for predicting success of ablative treatment. ROC-analysis (Receiver Operating Characteristic analysis) showed that molecular markers of lymphocyte activation CD54+ and CD95+ were the most informative. Thresholds expression level was defined on peripheral blood lymphocytes CD54+ (above 171 cells/ml — absolute level) and CD95+ (above 282 cells/ml — absolute level); CD54+ (above 19% — relative level) and CD95+ (above 18% — relative level), predicts regression of melanoma in 77,2% of cases. Expression lymphocyte activation molecular markers CD54+ and CD95+ below this level allows to predict subsequent tumor growth in 70,5% of cases.*

**Key words:** uveal melanoma, molecular markers of lymphocyte activation, prediction result of treatment

**Введение.** Исследования, посвященные изучению молекулярных механизмов противоопухолевой защиты организма, всегда были и остаются актуальными как с патогенетической, так и с клинической точек зрения. В последние годы появился ряд публикаций, касающихся новых представлений о патогенетических механизмах прогрессирования опухолевого процесса. Эти механизмы опосредованы взаимодействием иммунокомпетентных и опухолевых клеток [1, 4, 7, 11].

К середине 80-х годов XX века в литературе появилось описание большого количества феноменов, объяснение которых было возможно только с позиций прямого переноса информации в процессе непосредственного контакта между клетками. Изучение этих феноменов на молекулярном уровне привело к открытию и характеристике более 70 специфических рецепторов, которые в большей или меньшей степени представлены практически на всех клетках организма и обеспечивают различные формы взаимодействия этих клеток друг с другом и с компонентами экстраклеточного матрикса. Около 40% всех охарактеризованных к настоящему моменту поверхностных антигенов иммунокомпетентных клеток являются рецепторами контактно-го взаимодействия [3, 9, 12, 15].

Изменения экспрессии рецепторов отражают процессы, протекающие в организме. Иммунокомпетентные клетки реагируют на протекающие процессы путем изменения степени экспрессии, появления или исчезновения поверхностных или внутриклеточных функциональных молекул. Таким образом, клетка приспосабливается к сложившимся условиям, стремясь наиболее эффективно выполнять присущие ей регуляторные или эффекторные функции.

В связи с этим, представляет интерес поиск маркеров, которые могут отражать динамику опухолевого процесса. Изучение взаимосвязи между уровнем экспрессии молекулярных маркеров активации и прогрессированием опухолевого процесса позволит выделить данные молекулы в качестве маркеров прогрессирования опухолевого процесса. Исследование тонких молекулярных механизмов активации Т-лимфоцитов способствует расшире-

нию знаний об основах взаимодействия опухоли и иммунной системы.

**Целью** настоящего исследования явилось изучение возможности прогнозирования эффективности органосохраняющего лечения увеальной меланомы при помощи молекулярных маркеров активации лимфоцитов.

### Материал и методы

Изучался уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов у больных увеальной меланомой с различным исходом органосохраняющего лечения. Всем пациентам проводилось органосохраняющее лечение (фотокоагуляция + β-апликационная терапия).

Больные увеальной меланомой были разделены на две группы. Первую группу составили пациенты с регрессией увеальной меланомы и сохраненным глазом в течение трех лет наблюдения — 116 пациентов. Первичное среднее выстояние опухоли у пациентов этой группы составило 4,9 (2,8) мм. Во вторую группу вошли пациенты, у которых в процессе органосохраняющего лечения отмечался продолженный рост опухоли с последующей энуклеацией — 34 пациента. Первичное выстояние опухоли в данной группе составило 6,6 (4,5) мм.

Уровень активационных маркеров лимфоцитов периферической крови определялся гистоиммуноцитохимическим методом [2]. Для иммунофенотипирования лимфоцитов использовали панель моноклональных антител, которая включала антитела, реагирующие с антигенами CD7+, CD25+, CD38+, CD45+, CD54+, CD95+.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica 9.0 и MedCallc 9.1. Проведено построение характеристической кривой (ROC) по значениям чувствительности (sensitivity) и специфичности (specificity) для каждого значения маркера. Найдены оптимальные точки разделения для прогноза прогрессирующего течения, рассчитывалась площадь под характеристической кривой Receiver Operating Characteristic analysis (ROC-кривой).

### Результаты и их обсуждение

Сравнительный анализ уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов CD7+, CD25+, CD38+, CD45+, CD54+, CD95+ при различных исходах органосохраняющего лечения показал, что у больных с регрессией увеальной меланомы отмечен достоверно более высокий уровень экспрессии CD95+ и CD54+ — как абсолютное, так

и относительное значение по сравнению с больными, органосохраняющее лечение которых завершилось энуклеацией.

Так, абсолютное значение уровня экспрессии маркера CD95<sup>+</sup> на лимфоцитах периферической крови у больных увеальной меланомой с регрессией опухоли после органосохраняющего лечения составило 325,2 (206,3) кл/мкл, а относительное значение — 21,8 (9,6)% по отношению к абсолютному значению 218,6 (133,8) кл/мкл и относительному значению 16,2 (6,3)% уровня экспрессии маркера CD95<sup>+</sup> на лимфоцитах периферической крови у больных увеальной меланомой с прогрессирующим опухолем после органосохраняющего лечения ( $p_1=0,02$  и  $p_2=0,01$  соответственно).

Абсолютное значение уровня экспрессии маркера CD54<sup>+</sup> на лимфоцитах периферической крови у больных увеальной меланомой с регрессией опухоли после органосохраняющего лечения составило 278,3 (183,9) кл/мкл, а относительное значение — 19,2 (9,2) % по отношению к абсолютному значению 190,0 (129,5) кл/мкл и относительному значению 14,9 (7,1) % уровня экспрессии маркера CD54<sup>+</sup> на лимфоцитах периферической крови у больных увеальной меланомой с прогрессирующим опухолем после органосохраняющего лечения ( $p_1=0,03$  и  $p_2=0,04$  соответственно).

Проведенный ROC-анализ позволил получить пороговые абсолютные и относительные значения уровня экспрессии маркеров активации лимфоцитов CD95<sup>+</sup> и CD54<sup>+</sup> на лимфоцитах крови больных увеальной меланомой, которые могут быть использованы в качестве предикторов прогноза исхода органосохраняющего лечения увеальной меланомы (табл. 1). Таким образом, абсолютные значения

CD54<sup>+</sup>  $\geq 171$  кл/мкл и CD95<sup>+</sup>  $\geq 282$  кл/мкл и относительные значения CD54<sup>+</sup>  $> 19\%$  и CD95<sup>+</sup>  $> 18\%$  являются показателями благоприятного исхода органосохраняющего лечения увеальной меланомы.

На рисунке 1 приведены ROC кривые информативности маркеров CD54<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup> в крови больных увеальной меланомой для прогнозирования исхода органосохраняющего лечения.

Как видно из данных таблицы 1 и рисунка 1, чувствительность и специфичность теста прогнозирования исхода органосохраняющего лечения по значениям уровня экспрессии маркера CD54<sup>+</sup> на лимфоцитах у больных увеальной меланомой является достаточно высокой (чувствительность теста для относительного значения 81,8%, специфичность 43,0%; чувствительность для абсолютного значения 65,2%, специфичность 70,1%). Молекулярный маркер CD95<sup>+</sup> обладает более высокой чувствительностью, чем специфичностью (для абсолютного значения чувствительность 86,4%, специфичность 53,3%; для относительного значения чувствительность 77,3%, специфичность 59,7%).

Для расчета вероятности благоприятного и неблагоприятного исходов органосохраняющего лечения больные увеальной меланомой были разделены на 5 групп в зависимости от относительного и абсолютного значения маркеров CD54<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup> и их сочетания у каждого больного (табл. 2):

1. « — — — — » все абсолютные и относительные значения маркеров выше порогового;
2. « + » абсолютные и относительные значения одного из маркеров ниже порогового уровня;
3. « + + » два абсолютных или относительных значения любого из маркеров ниже порогового уровня;

**Таблица 1.** Пороговые значения и сравнительная оценка предикторной способности молекулярных маркеров активации лимфоцитов CD95<sup>+</sup> и CD54<sup>+</sup> в прогнозировании органосохраняющего лечения

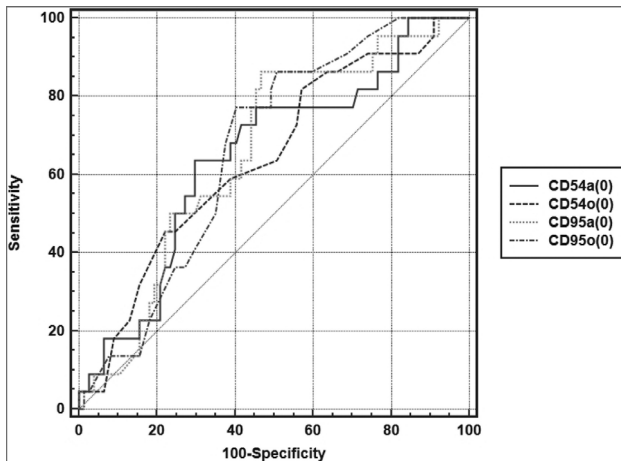
Молекулярные маркеры	Площадь под ROC-кривой	p	Точка разделения для (+) значения теста	Чувстви-тельность %	Специфи-чность %
CD54 <sup>+</sup> (а)	0,66	0,007	$\leq 171$ кл/мкл	65,2	70,0
CD54 <sup>+</sup> (о)	0,66	0,025	$\leq 19\%$	81,8	43,0
CD95 <sup>+</sup> (а)	0,66	0,011	$\leq 282$ кл/мкл	86,4	53,3
CD95 <sup>+</sup> (о)	0,66	0,007	$\leq 18\%$	77,3	59,7

Примечание: а — абсолютное содержание (кл/мкл); о — относительное содержание (%); p — уровень значимости различий по критерию Ньюмена-Кейлса  $< 0,05$ .

**Таблица 2.** Совместная оценка риска неудачного исхода органосохраняющего лечения в зависимости от уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов CD95<sup>+</sup> и CD54<sup>+</sup> и их сочетания

Исходы органосохраняющего лечения	Сочетание значений маркеров					Всего
	----	+	++	+++	++++	
Положительный исход органосохраняющего лечения, глаз сохранен n (%)	18 (23,1 %)	20 (25,6 %)	17 (21,8 %)	11 (14,1 %)	12 (15,4 %)	78
Энуклеация после неудачного органосохраняющего лечения, n (%)	2 (9,1 %)	1 (4,5 %)	2 (9,1 %)	5 (22,7 %)	12 (54,5 %)	22
$\chi^2=18,5; p=0,00097$						

Примечание: n — количество больных;  $\chi^2$  — коэффициент сопряженности Пирсона.



**Рис. 1.** Характеристические кривые для молекулярных маркеров CD95<sup>+</sup> и CD54<sup>+</sup>. Соотношения чувствительности (sensitivity) и специфичности (specificity) (a — абсолютные значения, o — относительные значения).

4. « + + + » три абсолютных или относительных значения любого из маркеров ниже порогового уровня;

5. « + + + + » все четыре значения любого из маркеров ниже порогового уровня.

Из данных, приведенных в таблице 2, видно, что все значения маркеров CD54<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup> в группе больных с положительным исходом органосохраняющего лечения были достоверно чаще выше (23,1% случаев), чем в группе больных с неудачным исходом органосохраняющего лечения (9,1% случаев). В то же время, снижение трех и четырех значений маркеров CD54<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup> ниже порогового уровня наблюдалось достоверно значительно чаще

в группе больных с неудачным исходом органосохраняющего лечения (77,2% случаев), чем в группе больных с положительным исходом органосохраняющего лечения (29,5% случаев).

Таким образом, определение уровня экспрессии маркеров CD54<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup> в периферической крови больных увеальной меланомой может быть использовано для прогноза исхода органосохраняющего лечения у больных увеальной меланомой и жизненного прогноза для таких больных.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы [6, 8, 13], которые свидетельствуют о влиянии иммунных механизмов на развитие и прогрессирование опухолевого процесса. Ряд исследований указывает на наличие связи между уровнем активации иммунной системы и прогрессированием внутриглазной меланомы [5, 10, 14].

**Закключение.** Исследование панели молекулярных маркеров активации лимфоцитов (CD7<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>, CD150<sup>+</sup>) показало, что наиболее высокой предикторной способностью в прогнозировании исхода органосохраняющего лечения обладают маркеры CD54<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup>. Уровень экспрессии данных маркеров значимо выше у больных с регрессией меланомы, чем у пациентов с прогрессирующим ростом опухоли.

Получены пороговые значения молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови CD54<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup>, позволяющие прогнозировать положительный исход органосохраняющего лечения у больных увеальной меланомой в 70,5% случаев и в 77,2% — прогнозировать дальнейший рост опухоли.

### 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. **Глузман Д. Ф.** Диагностическая иммуноцитохимия опухолей / Д. Ф. Глузман, Л. М. Скляренко, В. А. Надгорная, И. А. Крячок. — Киев: Морион, 2003. — С. 6–15.
3. **Козлов И. Г.** Рецепторы контактного взаимодействия / И. Г. Козлов, Н. К. Горлина, А. Н. Череева // Иммунология. — 1995. — № 4. — С.14–26.
4. **Blank С.** Blockade of PD — L1 (B7 — H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro / С. Blank, J. Kuball, S. Voelkl, et al. // Int. J. Cancer. — 2006. — V.119. — № 2. — P. 317–327.
5. **Blom D. J.** Human leukocyte antigen class I expression. Marker of poor prognosis in uveal melanoma / D. J. Blom, G. P. Luyten, C. Mooy et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 1997. — V. 38. — № 9. — P. 1865–1872.
6. **De Waard-Siebinga I.** HLA expression and tumor — infiltrating immune cells in uveal melanoma / I. de Waard-Siebinga, C. G. Hilders, B. E. Hansen // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. — 1996. — V. 234. — № 1. — P. 34–42.
7. **Fidler I. J.** The «seed and soil» hypothesis revisited / I. J. Fidler, G. Poste // Lancet Oncol. — 2008. — № 9(8). — P. 808.
8. **Fridman W. H.** Prognostic and predictive impact of intra and peritumoral immune infiltrates / W. H. Fridman, J. Galon, F. Pages et al. // Cancer Res. — 2011. — V. 71. — № 17. — P.5601–5605.
9. **Jameson S. C.** T cell receptor antagonists and partial agonists / S. C. Jameson, M. J. Bevan // Immunity. — 1995. — № 2(1). — P. 1–11.
10. **Makitie T.** Tumor-infiltrating macrophages (CD68(+) cells) and prognosis in malignant uveal melanoma / T. Makitie, P. Summanen, A. Tarkkanen, T. Kivela // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2001. — V. 42. — № 7. — P.1414–1421.
11. **Mantovani A.** Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment / A. Mantovani, P. Romero, A. K. Palucka, F. M. Marincola // Lancet. — 2008. — V. 371. — P. 771–783.

12. **Shaw A. S.** Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation / A. S. Shaw, M. L. Dustin // *Immunity*. — 1997. — № 6. — P. 361–369.
13. **Singh A. D.** Prognostic factors in uveal melanoma / A. D. Singh, C. L. Shields, J. A. Shields // *Melanoma Res.* — 2001. — V. 11. — P. 255–263.
14. **Vetter C. S.** Loss of nonclassical MHC molecules MIC — A/B expression during progression of uveal melanoma / C. S. Vetter, W. Lieb, E. B. Brocker, J. C. Becker // *Br. J. Cancer*. — 2004. — V. 91. — № 8. — P. 1495–1499.
15. **Wulfing, C.** Kinetics and extent of T cell activation as measured with the calcium signal / C. Wulfing, J. D. Rabinowitz, C. Beeson et al. // *J. Exp. Med.* — 1997. — V. 185. — P. 1815–1825.

Поступила 26.11.2014

### References

1. **Bereznaia NM.** The role of immune system cells in the tumor microenvironment. II. The interaction of cells of the immune system with the other components of the microenvironment. *Onkologiya*. 2009;11(2):86–93/ In Russian.
2. **Gluzman DF, Sklyarenko LM, Nadgoraia VA, Kryachok IA.** Diagnostic immunocytochemistry of tumors. Kiev: Morion; 2003. 6–15.
3. **Kozlov IG, Gorlina NK, Cheredyeyeva AN.** Receptors of contact interaction. *Immunologiya*. 1995;4:14–26. In Russian.
4. **Blank C, Kuball J, Voelkl S et al.** Blockade of PD — L1 (B7 — H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int. J. Cancer*. 2006;119(2):317–27.
5. **Blom DJ, Luyten GP, Mooy C et al.** Human leukocyte antigen class I expression. Marker of poor prognosis in uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1997; 38(9):1865–72.
6. **De Waard-Siebinga I, Hilders CG, Hansen B E.** HLA expression and tumor — infiltrating immune cells in uveal melanoma. *Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1996; 234(1):34–42.
7. **Fidler IJ, Poste G.** The «seed and soil» hypothesis revisited. *Lancet Oncol.* 2008;9(8):808.
8. **Fridman WH, Galon J, Pages F et al.** Prognostic and predictive impact of intra and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res.* 2011; 71(17):5601–5.
9. **Jameson SC, Bevan MJ.** T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity*. 1995;2(1):1–11.
10. **Makitie T, Summanen P, Tarkkanen A, Kivela T.** Tumor-infiltrating macrophages (CD68(+) cells) and prognosis in malignant uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001; 42(7):1414–21.
11. **Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM.** Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet.* 2008; 371:771–83.
12. **Shaw A S.** Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation / A. S. Shaw, M. L. Dustin // *Immunity*. — 1997;6. — P. 361–369.
13. **Singh AD, Shields CL, Shields JA.** Prognostic factors in uveal melanoma. *Melanoma Res.* 2001;11:255–63.
14. **Vetter CS, Lieb W, Brocker EB, Becker JC.** Loss of nonclassical MHC molecules MIC — A/B expression during progression of uveal melanoma. *Br. J. Cancer.* 2004;91(8):1495–9.
15. **Wulfing C, Rabinowitz JD, Beeson C et al.** Kinetics and extent of T cell activation as measured with the calcium signal. *J. Exp. Med.* 1997; 185:1815–25.

Received 26.11.2014