



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.12.4.014>



Жерко И.Ю.✉, Давыдов Д.А., Шупилова Е.П., Могиланчик А.Ф., Лаврович М.Г.,
Портянко А.С.

Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской
радиологии имени Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

Прогностическое значение экспрессии CD28 при первичной меланоме хориоидеи

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Жерко И.Ю. – концепция исследования, сбор и обработка материала, написание текста статьи, редактирование; Давыдов Д.А. – сбор и обработка материала, редактирование текста статьи; Шупилова Е.П. – сбор и обработка материала; Могиланчик А.Ф. – сбор и обработка материала; Лаврович М.Г. – сбор и обработка материала; Портянко А.С. – концепция исследования, написание текста статьи.

Подана: 25.06.2024

Принята: 21.10.2024

Контакты: zherko.irina@mail.ru

Резюме

Цель. Охарактеризовать экспрессию CD28 в иммунном инфильтрате первичной меланомы хориоидеи и определить ее прогностическое значение в отношении выживаемости без прогрессирования и скорректированной выживаемости.

Материалы и методы. В исследование включено 67 пациентов с первичной меланомой хориоидеи. Иммуногистохимическим методом изучены уровни и паттерны экспрессии CD28 в тканях опухоли. Проведен регрессионный анализ для выявления независимых факторов прогноза течения заболевания.

Результаты. Экспрессия CD28 регистрировалась на мембранах клеток иммунного инфильтрата в 36 (53,7%) случаях. Опухоли с наличием CD28-позитивного иммунного инфильтрата чаще характеризовались неблагоприятными признаками: отсутствием пигмента, фракцией Foxp3-позитивных клеток $>0,5$, наличием сосудистых арок, соотношением CD3/CD68 более 1. В случае когда содержание CD28-позитивных клеток превышало 1 в поле зрения, риск прогрессирования был выше в 4,9 раза (95% ДИ 1,9–12,5, $p<0,001$), риск смерти – в 3,1 раза (95% ДИ 1,3–7,2, $p=0,008$).

Заключение. Установлено, что наличие мембранной экспрессии CD28 ассоциировано с увеличением риска прогрессирования заболевания в 4,9 раза, смерти – в 3,1 раза.

Ключевые слова: меланома хориоидеи, иммунный инфильтрат, прогноз

Zherka I. ✉, Davydov D., Shupilova E., Mahilyanchyk A., Lavrovich M., Portyanko A.
N.N. Alexandrov National Cancer Centre, Minsk, Belarus

Evaluation of the Prognostic Value of CD28 Expression in Primary Choroidal Melanoma

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Iryna Y. Zherka – research concept, collection and processing of material, writing the text of the article; Denis A. Davydov – collection and processing of material, article editing; Ekaterina P. Shupilova – collection and processing of material; Aliaksandra F. Mahilyanchyk – collection and processing of material; Maxim G. Lavrovich – collection and processing of material; Anna S. Portyanko – research concept, article editing.

Submitted: 25.06.2024

Accepted: 21.10.2024

Contacts: zherko.irina@mail.ru

Abstract

Purpose. To examine CD28 expression in the immune infiltrate of primary choroidal melanoma and determine its prognostic value for progression-free survival and adjusted survival.

Materials and methods. 67 patients with primary choroidal melanoma were included. The levels and patterns of CD28 expression in tumor tissues were studied using immunohistochemical method. Regression analysis was performed to identify independent factors predicting the course of the disease.

Results. CD28 expression was recorded on the membranes of immune infiltrate cells in 36 (53.7%) cases. Tumors with the presence of a CD28-positive immune infiltrate were more often characterized by unfavorable signs: absence of pigment, fraction of Foxp3-positive cells >0.5 , presence of vascular arches, CD3/CD68 ratio more than 1. In the case when the content of CD28-positive cells exceeded 1 in the field of view, the risk of progression was 4.9 times higher (95% CI 1.9–12.5, $p<0.001$), the risk of death was 3.1 times higher (95% CI 1.3–7.2, $p=0.008$).

Conclusion. It was found that the presence of membrane expression of CD28 is associated with an increase in the risk of disease progression by 4.9 times, and death by 3.1 times.

Keywords: choroidal melanoma, immune infiltrate, prognosis

■ ВВЕДЕНИЕ

Меланома хориоидеи (МХ) – наиболее часто встречающаяся внутриглазная опухоль у взрослых [1]. Инцидентность МХ составляет от 1 до 9 на 100 000 населения в год [2]. Традиционно к клиническим факторам неблагоприятного течения МХ относят: возраст, мужской пол, большие размеры опухоли, вовлечение цилиарного тела, ассоциацию с окулярным и параокулярным меланозом, распространенную стадию согласно классификации AJCC (American Joint Committee on Cancer) [3]. Более высокая степень злокачественности опухоли также ассоциирована с эпителиоидным гистологическим типом, высокой митотической активностью, высокой плотностью опухолевых сосудов, наличием участков некроза [4], кровоизлияний [5], опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и макрофагов.



Высокая плотность микрососудов в опухоли является независимым фактором риска развития метастазов МХ [6]. Инфильтрация опухоли Т-лимфоцитами и макрофагами также была ассоциирована с худшим прогнозом [7–9]. Показатели 15-летней выживаемости составили 37% и 70% для группы с высоким и низким содержанием опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов соответственно [10].

Изучение биологии МХ, в том числе ее иммунного микроокружения, потенциально имеет значение не только для прогноза течения заболевания, но и для понимания механизмов избегания опухолью иммунного ответа, поиска новых терапевтических мишеней, предсказания вероятности и степени ответа опухоли на иммунотерапию.

CD28 – молекула-костимулятор Т-клеточного рецептора, обеспечивающая активацию Т-лимфоцитов после связывания с CD80, экспрессируемым антигенпрезентирующими клетками [11]. CD28 в норме экспрессируется примерно 80% CD4-позитивных Т-лимфоцитов и примерно 50% CD8-позитивных Т-лимфоцитов [12].

После связывания CD28 с CD80 активируется экспрессия CTLA4, который в свою очередь связывается с CD80 с большей аффинностью, приводит к эндоцитозу CD28 [13], прерывая тем самым активирующее влияние CD28 [14]. Экспрессия CD28 на мембране CD8 Т-лимфоцитов также снижается в условиях хронической антигенной стимуляции (при опухолях или хронических инфекционных процессах) [15]. При этом снижение экспрессии CD28 ассоциировано с более низкой эффективностью анти-PD1-терапии [16].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить экспрессию CD28 в иммунном инфильтрате первичной меланомы хориоидеи и определить ее прогностическое значение в отношении выживаемости без прогрессирования и скорректированной выживаемости.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оценка экспрессии CD28 выполнена в образцах опухолевой ткани 67 пациентов с первичной меланомой хориоидеи, радикально пролеченных в ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» с 2009 по 2014 г., для которых энуклеация была первым методом лечения.

Включение в ретроспективную когорту для исследования осуществлялось по следующим критериям:

- энуклеация как единственный метод лечения;
- доступность медицинской документации;
- надлежащее качество биопсийного материала (парафиновых блоков).

Критерии исключения:

- первично множественное метакхронное или синхронное заболевание;
- комплексное или комбинированное лечение первичной опухоли;
- наличие отдаленных метастазов на момент хирургического лечения.

Патогистологическое исследование образцов включало в себя определение гистологического типа опухоли, интенсивности пигментации, распространенности некроза, наличия инвазии опухоли в цилиарное тело и диск зрительного нерва, категории pT.

С помощью иммуногистохимического исследования с антителом к CD34 определялся паттерн микрососудистого русла в опухоли согласно Folberg R. et al. [17]. Также

проводилась оценка расположения антигенпрезентирующих клеток иммунного инфильтрата относительно опухолевых сосудов с помощью иммуногистохимического окрашивания срезов с использованием антител к CD68 [18]. Иммуногистохимическое исследование с антителом к CD28 выполнено на тканевых микрочипах (Tissue Microarray) с диаметром столбика каждого образца 3 мм. Для иммуногистохимического исследования использовались первичные антитела к CD28 (recombinant rabbit, разведение 1 : 300) с хромогеном диаминобензидином, гематоксилином Майера для контрокрашивания. Оценка окрашивания выполнялась двумя независимыми исследователями с подсчетом количества полиизивных клеток в 5 непересекающихся полях зрения ($\times 40$).

Для оценки совместного влияния потенциальных факторов риска на выживаемость использовался регрессионный анализ. В анализе применялась непараметрическая модель пропорциональных рисков Кокса. Вычислялись величины относительного риска (ОР), их 95% ДИ и статистические значимости. Переменные со значением $p < 0,1$ включались в многофакторный анализ. Переменные с коэффициентом корреляции более 0,7 по результатам корреляционного анализа Спирмена исключались из многофакторного регрессионного анализа. Для определения наличия статистически значимых различий в несвязанных группах использовали критерий хи-квадрат Пирсона.

Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Обработка данных и расчет статистических параметров проводились с использованием IBM SPSS Statistics 20.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинико-демографическая характеристика пациентов, включенных в исследование, приведена в табл. 1.

Медиана наблюдения – 74 (95% ДИ 38–105) месяца. Средний возраст пациентов, вошедших в когорту, составил $62,5 \pm 11,9$ года. Средняя толщина опухоли – $7,4 \pm 3,1$ мм, основание опухоли – $11,9 \pm 3,7$ мм.

Экспрессия CD28 регистрировалась на мембранах клеток иммунного инфильтрата в 36 (53,7%) случаях (см. рисунок).

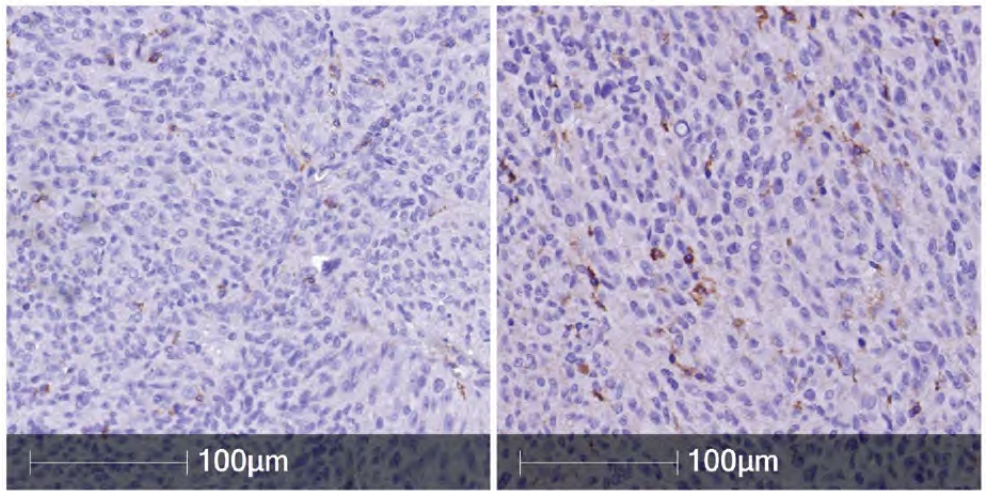
Была выявлена сильная корреляционная связь между количеством CD28+ и CD3+ клеток (коэффициент корреляции – 0,8, $p < 0,001$). Опухоли с наличием CD28-позитивного иммунного инфильтрата чаще характеризовались неблагоприятными признаками: отсутствием пигмента, фракцией Foxp3-позитивных клеток $> 0,5$, наличием сосудистых арок, соотношением CD3/CD68 более 1 (табл. 2).

При этом не было выявлено взаимосвязи между наличием CD28-позитивных клеток в составе иммунного инфильтрата, показателями выживаемости без прогрессирования (ОР 1,5, 95% ДИ 0,6–4,0, $p = 0,3$) и скорректированной выживаемости (ОР 1,2, 95% ДИ 0,5–2,9, $p = 0,6$) по данным однофакторного регрессионного анализа. В то же время показатели выживаемости были статистически значимо ассоциированы с фактором CD28+ > 1 клетки в поле зрения. В случае когда содержание CD28+ превышало 1 в поле зрения, риск прогрессирования был выше в 4,9 раза (95% ДИ 1,9–12,5, $p < 0,001$), риск смерти – в 3,1 раза (95% ДИ 1,3–7,2, $p = 0,008$). Показатели выживаемости в зависимости от количества CD28-позитивных клеток приведены в табл. 3 и 4.



Таблица 1
Клинико-демографическая характеристика пациентов, включенных в исследование, n=67
Table 1
Clinical and demographic characteristics of the patients included in the study, n=67

Признак	n (%)
Пол:	
– мужской	23 (34,3)
– женский	44 (65,7)
Категория pT:	
– pT1	5 (7,5)
– pT2	25 (37,3)
– pT3	25 (37,3)
– pT4	12 (17,9)
Наличие эпителиоидных клеток в опухоли	27 (40,3)
Наличие сосудистых арок или петель	15 (22,4)
Паттерн расположения клеток иммунного инфильтрата:	
– периваскулярный	21 (31,3)
– смешанный	31 (46,3)
– диффузный	15 (22,4)
Наличие пигмента в опухоли	46 (68,7)
Наличие инвазии в зрительный нерв	6 (9,0)
Наличие инвазии в склеру	24 (35,8)
Наличие инвазии в цилиарное тело	12 (17,9)
Метастазирование за период наблюдения	20 (29,9)



А **В**

Экспрессия CD28 в клетках иммунного инфильтрата меланомы хориоидеи, ИГХ-окрашивание с АТ к CD28, контрокрашивание гематоксилином Майера: А – отсутствие экспрессии CD28, В – экспрессия CD28 в клетках иммунного инфильтрата
CD28 expression in choroid melanoma immune infiltrate cells, IHC staining with AT to CD28, Mayer hematoxylin staining: A – absence of CD28 expression, B – CD28 expression in immune infiltrate cells

Таблица 2
Характеристика CD28+ и CD28– опухолей
Table 2
Characteristics of CD28+ and CD28– tumors

Показатель	CD28– (%)	CD28+ (%)	p
n	31	36	
pT1	3 (9,6)	2 (5,6)	0,025
pT2	11 (35,5)	14 (38,9)	0,022
pT3	13 (41,9)	12 (33,3)	0,03
pT4	4 (12,9)	8 (22,2)	0,022
Наличие пигмента в опухоли	26 (83,9)	20 (55,6)	0,001
Наличие эпителиоидных клеток в опухоли	11 (35,5)	16 (44,4)	0,1
Фракция Foxp3-позитивных клеток >0,5	2 (6,5)	4 (11,1)	0,001
Наличие сосудистых арок и петель	6 (19,4)	9 (25,0)	0,001
CD3/CD68 >1	8 (25,8)	11 (30,6)	0,04

Таблица 3
Показатели выживаемости без прогрессирования в зависимости от количества CD28-позитивных клеток в иммунном инфильтрате
Table 3
Progression-free survival rates depending on the number of CD28-positive cells in the immune infiltrate

Группа	Показатель выживаемости, %			p
	1-летняя	3-летняя	5-летняя	
CD28+ <1 клетки в поле зрения	100	90,2±4,6	84,7±5,8	<0,001
CD28+ >1 клетки в поле зрения	86,4±7,3	53,1±10,9	47,8±11,0	

Таблица 4
Показатели скорректированной выживаемости в зависимости от количества CD28-позитивных клеток в иммунном инфильтрате
Table 4
Adjusted survival rates depending on the number of CD28-positive cells in the immune infiltrate

Группа	Показатель выживаемости, %			p
	1-летняя	3-летняя	5-летняя	
CD28+ <1 клетки в поле зрения	95,6±3,1	86,3±5,2	78,7±6,3	0,005
CD28+ >1 клетки в поле зрения	86,4±7,3	53,1±10,9	47,8±11,0	

■ ОБСУЖДЕНИЕ

CD28 является молекулой-коактиватором Т-клеточного рецептора, которая экспрессируется на Т-лимфоцитах всех типов и при связывании с CD80 обеспечивает их активацию [12]. В настоящем исследовании количество CD28-позитивных клеток предсказуемо позитивно коррелировало с количеством CD3-позитивных лимфоцитов.

CD28 играет ключевую роль в функционировании Т-клеток, включая процессы ремоделирования цитоскелета, продукцию цитокинов, дифференцировку [19]. Блокирование связывания CD28 с CD80 и CD86 приводит к иммуносупрессии за счет снижения активности эффекторных Т-лимфоцитов [19]. В частности, данный



механизм реализуется при участии CTLA4, который не только имеет большую, чем CD28, аффинность к CD80 и CD86, но и при связывании с ними приводит к интернализации CD28 [14].

Несмотря на широкое использование CTLA4-ингибиторов в лечении злокачественных опухолей различных локализаций, прогностическая роль CD28 в течении опухолевого процесса остается малоизученной.

Опубликовано несколько исследований, посвященных роли данной молекулы при аденокарциноме легкого. В частности, Sun et al. показали, что при высоком уровне экспрессии CD28 в инфильтрате первичной опухоли отмечается повышенный риск рецидива заболевания, но более низкий риск смерти. При этом первичные опухоли характеризовались более высоким уровнем экспрессии CD28 по сравнению с метастазами [20].

В другом исследовании была показана благоприятная роль высокого уровня CD28+CD8+ Т-лимфоцитов в периферической крови в отношении безрецидивной и общей выживаемости пациентов с аденокарциномой легкого после химиолучевого лечения или химиотерапии [21].

Нами было установлено неблагоприятное прогностическое значение высокого уровня экспрессии CD28 в иммунном микроокружении первичной МХ. Показатели выживаемости без прогрессирования и скорректированной выживаемости были практически в 2 раза выше при содержании CD28-позитивных клеток менее 1 в поле зрения.

Выявленная взаимосвязь объясняется тем, что более иммуногенные опухоли, характеризующиеся, как правило, более неблагоприятным прогнозом, содержат большое количество Т-лимфоцитов в иммунном инфильтрате, что коррелирует с большим количеством CD28-позитивных клеток. В то же время полезным было бы дополнительное изучение характера экспрессии CTLA4 в тканях первичной МХ, а также пространственных взаимоотношений CD28- и FoxP3-позитивных клеток для оценки фракции CD28-позитивных регуляторных Т-лимфоцитов.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были определены особенности и паттерны экспрессии CD28 в первичной меланоме хориоидеи. Установлено, что наличие мембранной экспрессии CD28 ассоциировано с увеличением риска прогрессирования заболевания в 4,9 раза, смерти – в 3,1 раза.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Singh A.D. et al. Uveal melanoma: epidemiologic aspects. *Ophthalmol. Clin. of North Am.*, 2005;18(1):75–84.
2. Singh A.D. et al. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology*, 2011;118(9):1881–1885.
3. Kaliki S. et al. Uveal melanoma: estimating prognosis. *Indian J. of Ophthalmol.*, 2015;63(2):93–102.
4. Shields C.L. et al. American joint committee on cancer classification of uveal melanoma (anatomic stage) predicts prognosis in 7,731 patients: the 2013 Zimmerman lecture. *Ophthalmology*, 2015;122(6):1180–1186.
5. Damato B. et al. Estimating prognosis for survival after treatment of choroidal melanoma. *Prog. in Retin. and Eye Res.*, 2011;30(5):285–295.
6. Mäkitie T. et al. Microvascular density in predicting survival of patients with choroidal and ciliary body melanoma. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.*, 1999;40(11):2471–2480.
7. Bronkhorst I.H. et al. Different subsets of tumor-infiltrating lymphocytes correlate with macrophage influx and monosomy 3 in uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.*, 2012;53(9):5370–5378.
8. Bronkhorst I.H. et al. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.* 2011;52(2): 643–650.

9. Luo H., Ma C. Identification of prognostic genes in uveal melanoma microenvironment. *PLoS One*. 2020;15(11):1242–1263.
10. De la Cruz P.O. Jr, Specht C.S., McLean I.W. Lymphocytic infiltration in uveal malignant melanoma. *Cancer*. 1990;65(1):112–115.
11. Sakamoto Y., Ishida T., Masaki A., et al. Clinicopathological significance of CD28 overexpression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci*. 2022;113:349–361. doi: 10.1111/cas.15191
12. Esensten J.H., Helou Y.A., Chopra G., et al. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity*. 2016;44:973–988.
13. Rudd C.E., Taylor A., Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev*. 2009;229:12–26.
14. Chen L., Flies D.B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:227–242.
15. Strioga M., Pasukoniene V., Characiejus D. CD8+ CD28– and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology*. 2011;134:17–32.
16. Kamphorst A.O., Wieland A., Nasti T., et al. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science*. 2017;355:1423–1427.
17. Folberg R. et al. Microcirculation patterns other than loops and networks in choroidal and ciliary body melanomas. *Ophthalmology*. 2001;108:996–1001.
18. Zherko I.Yu., Gulenko O.V., Ruksha K.G. et al. Analysis of the relationship between the characteristics of tumor immune infiltration and survival rates of patients with choroidal melanoma. *Eurasian Journal of Oncology*, 2023;11(1):47–59. (in Russ.)
19. Esensten J.H., Helou Y.A., Chopra G., et al. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity*. 2016 May 17;44(5):973–88. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.020
20. Sun D., Tian L., Bian T., et al. The role of CD28 in the prognosis of young lung adenocarcinoma patients. *BMC Cancer*. 2020 Sep 23;20(1):910. doi: 10.1186/s12885-020-07412-0
21. Liu C., Jing W., An N., et al. Prognostic significance of peripheral CD8+CD28+ and CD8+CD28– T cells in advanced non-small cell lung cancer patients treated with chemo(radio)therapy. *J Transl Med*. 2019 Oct 17;17(1):344. doi: 10.1186/s12967-019-2097-7