

## Ангиогенез в увеальной меланоме

В.Г. Лихванцева<sup>1,2</sup>О.А. Анурова<sup>3</sup>М.В. Верещагина<sup>4</sup>В.Э. Ованесян<sup>5</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ ГНЦ РФ — «Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства  
ул. Гамалеи, 15, Москва, 123098, Российская Федерация

<sup>2</sup> Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»  
Волоколамское шоссе, 91, Москва, 125310, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
ул. Академика Опарина, 4, Москва, 117997, Российская Федерация

<sup>4</sup> ГБУ «Детская городская поликлиника № 15» Департамента здравоохранения г. Москвы  
Коптевский бульвар, 18, корп. 1, Москва, 125239, Российская Федерация

<sup>5</sup> ГБУЗ МО «Егорьевская центральная районная больница»  
Жукова гора, 19, Егорьевск, Московская область, 140304, Российская Федерация

### РЕЗЮМЕ

### Офтальмология. 2021;18(3):495-502

Увеальная меланوما (УМ) составляет менее 0,5 % в спектре опухолей человека и менее 5 % среди всех типов меланомы, поэтому по праву считается редкой. При этом УМ признана наиболее частой внутриглазной злокачественной неоплазией. Доля ее среди всех внутриглазных опухолей составляет 60 %. Радикальные местные методы лечения УМ признаны эффективными, но частота дистантных метастазов недопустимо высока. Показатели выживаемости остаются стабильными в течение последних 40 лет, что отражает отсутствие тонущих эффективных системных стратегий. Опухоль метастазирует гематогенным путем, поэтому неудивительно, что ангиогенез постоянно находится в фокусе научных разработок. Важность изучения ангиогенеза при УМ обусловлена также возможностями прогнозирования на основе количественных показателей сосудов внутри опухоли и поиском потенциальных мишеней антиангиогенной терапии в будущем. Авторы использовали два метода изучения ангиогенеза в УМ: морфологический с количественным подсчетом сосудов и иммуногистохимический (ИГХ) с маркерами эндотелиальных клеток CD34 и CD31, VIII фактора, молекул VEGF, bFGF, тромбоспондина и других. ИГХ-окрашивание сосудов в УМ позволяло визуализировать сосуды, которые не просматривались из-за интенсивной пигментации опухоли или компрессии сосудов опухолевыми клетками. Сопоставление данных, полученных двумя методами, продемонстрировало преимущества ИГХ-анализа перед классическими морфологическими методами. Было установлено, что УМ как злокачественная солидная опухоль отличается высокими средними показателями сосудов на единицу площади в зоне просмотра (медиана = 8). Наиболее высокие показатели зафиксированы при эпителиоидной меланоме, что ассоциируется с большей скоростью ее роста в соответствии с собственными клиническими и литературными данными, а также более частым метастазированием по сравнению с аналогичными показателями, характерными для веретенноклеточной меланомы. Показано, что с возрастом количество сосудов на единицу площади в зоне просмотра у больных в УМ снижается, что объясняет развитие метастазов в более отдаленные после энуклеации сроки у пожилых пациентов. Выявлены и описаны различия в показателях плотности сосудов при опухолях различной локализации: максимальными они оказались в презваториальных опухолях, а минимальными — в опухолях радужки.

**Ключевые слова:** увеальная меланомы, ангиогенез, маркеры эндотелиальных клеток, иммуногистохимический анализ, прогноз

**Для цитирования:** Лихванцева В.Г., Анурова О.А., Верещагина М.В., Ованесян В.Э. Ангиогенез в увеальной меланоме. *Офтальмология*. 2021;18(3):495-502. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2021-3-495-502>

**Прозрачность финансовой деятельности:** Никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах

**Конфликт интересов отсутствует**



# Angiogenesis in Uveal Melanoma

V.G. Likhvantseva<sup>1,2</sup>, O.A. Anurova<sup>3</sup>, M.V. Vereshchagina<sup>4</sup>, V.E. Ovanesyan<sup>5</sup>

<sup>1</sup> The Federal Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of FMBA of Russia  
Gamalei str., 15, Moscow, 123098, Russian Federation

<sup>2</sup> Academy of postgraduate education under FSBU FSCC of FMBA of Russia  
Volokolamskoe highway, 91, Moscow, 125371, Russian Federation

<sup>3</sup> National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov  
Academician Oparin str., 4, Moscow, 117997, Russian Federation

<sup>4</sup> Children's City Polyclinic No. 15  
Koptev ave., 18/1, Moscow, 125239, Russian Federation

<sup>5</sup> Yegoryev Central District Hospital  
Zhukova mountain, 19, Yegoryevsk, Moscow region, 140304, Russian Federation

## ABSTRACT

## Ophthalmology in Russia. 2021;18(3):495–502

Uveal melanoma (UM) is less than 0.5 % in the spectrum of human tumors, and less than 5 % among all types of melanoma, therefore, it is considered to be rare. At the same time, UM is recognized as the most common intraocular malignant neoplasm. Its share among all intraocular tumors is 60 %. Radical local treatments are considered effective, but the frequency of distant metastases is unacceptably high, and the life expectancy of patients with metastatic stage of the disease is short and on average is 4–5 months. Survival rates have remained stable for the past 40 years, reflecting the lack of current effective system strategies. The tumor metastasizes in a haematogenic way, so it is not surprising that angiogenesis is constantly in the focus of scientific developments. The importance of studying angiogenesis in UM is due to the ability to predict based on the quantitative indicators of vessels inside the tumor and to search for potential targets of antiangiogenic therapy in the future. The authors used two methods of studying angiogenesis in UM: morphological with quantitative vascular counting and immunohistochemical method (IHC) with markers of endothelial cells CD34 and CD31, VIII factor, VEGF molecules, bFGF, thrombospondin and others. IHC-staining of vessels in UM allowed to visualize vessels that were not visible due to intense pigmentation of tumors or compression of vessels by tumor cells. Comparison of data obtained by the two methods demonstrated the advantages of IHS analysis over classical morphological methods. It was found that UM, as a malignant solid tumor, differs high averages of vessels per unit area. The highest rates are recorded in epitheloid melanoma, which is associated with a higher rate of growth, and more frequent metastasis, compared to similar rates in revere cell melanoma. The number of vessels per unit area in the viewing area in UM decreases with age, which explained the development of metastases in more distant after enucleation time in elderly patients. Differences in vascular density in tumors of different localization were revealed and described: they were the maximum in pre-equatorial tumors, and minimal — in iris tumors.

**Keywords:** uveal melanoma, angiogenesis, markers of endothelial cells, immunohistochemical analysis, prognosis

**For citation:** Likhvantseva V.G., Anurova O.A., Vereshchagina M.V., Ovanesyan V.E. Angiogenesis in Uveal Melanoma. *Ophthalmology in Russia*. 2021;18(3):495–502. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2021-3-495-502>

**Financial Disclosure:** No author has a financial or property interest in any material or method mentioned

**There is no conflict of interests**

Рост, прогрессирующее и метастазирование любой злокачественной опухоли зависят от развития микрососудов в малигнизированной ткани [1–5]. Доказано в эксперименте *in vivo*, что высокоангиогенные опухоли отличаются большей скоростью метастазирования по сравнению с опухолями с низкой ангиогенной активностью [1, 2, 4].

В этом аспекте увеальная меланома (УМ) скорее эталон закономерности, чем исключение из правила [6–9]. Поэтому неудивительно, что показатели ангиогенеза пристально рассматривают в качестве маркеров витального прогноза [6–10]. С этой целью используют иммуногистохимические (ИГХ) маркеры тканедифференциального типа, окрашивающие клетки, участвующие в построении сосудистой стенки [11], или молекулярные маркеры, участвующие в молекулярном «сценарии» ангиогенеза [8].

Как известно, в опухолевом ангиогенезе участвуют 3 основных типа клеток: эндотелиоциты (эндотелиальные клетки, ЭК), выстилающие трубчатую структуру

кровеносного сосуда; гладкомышечные клетки, регулирующие внутрисосудистое давление и просвет сосудов, и перициты — сателлитные клетки, поддерживающие жизнеспособность ЭК. Маркером ЭК служит CD34, экспрессируемый мембраной гематопоэтических стволовых клеток, эндотелия, интерстициальных клеток Кахаля. CD34 не окрашивает стромальные клетки хориоидеи или цилиарного тела, но окрашивает ЭК нормальных хориоидальных сосудов, прилежащих к опухоли, и ЭК внутриопухолевых сосудов [12, 13]. Таким образом, с помощью этого маркера можно оценить степень васкуляризации опухоли, которая косвенно отражает опухолевую активность и риск метастазирования.

Другим маркером ЭК является CD31, окрашивающий ЭК. CD31 экспрессируется на мегакариоцитах, тромбоцитах, миелоидных клетках. CD31 экспрессируется непрерывным эндотелием сосудов, включая эндотелий артерий, артериол, венул, вен, и не экспрессируется прерывистым эндотелием. CD31 выполняет роль адгезивного фактора между ЭК, а также между ЭК и лейкоцитами,

принимает участие в миграции моноцитов через базальную мембрану сосудов. CD31 пригоден для визуализации сосудов при изучении ангиогенеза в различных опухолях [12–15].

Сведений о полезности изучения экспрессии CD31 и CD34 в УМ в литературе практически недостаточно. Прогностическая роль этих маркеров до конца не ясна. Есть работы, указывающие на его высокую информативность [6, 7], а есть опровергающие этот факт [12].

**Цель работы:** изучить ангиогенез в УМ с помощью иммуногистохимического анализа и маркеров эндотелиальных клеток CD31 и CD34 и дать оценку его практическому потенциалу.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование носило ретроспективный характер, включало 78 пациентов с УМ. Возраст пациентов колебался от 30 до 84 лет (медиана:  $55,1 \pm 1,7$  года). Среди них мужчин было 36 (46 %), женщин — 42 (54 %). Срок наблюдения за пациентами варьировал от 8,5 до 20 лет.

Всем пациентам после полного обследования, исключения дистантных метастазов было проведено хирургическое лечение, объем которого определялся в соответствии с локализацией и размерами опухоли. В 3 случаях была проведена блокэксцизия опухоли в объеме иридэктомии, в 6 случаях — иридоциклэктомия, в 1 случае — иридоциклохориосклерэктомия. У 66 человек из-за больших размеров опухоли органосохраняющее лечение выполнить не представлялось возможным, проводили энуклеацию; еще в 1 случае из-за прорастания опухоли за пределы оболочек глаза и инфильтрации опухолевыми клетками тканей орбиты была выполнена экзентерация (табл. 1).

Стадию заболевания определяли в соответствии с рекомендациями 8 редакции Американского объединенно-

го комитета по раку (AJCC) по классификации опухолей (TNM) (2017 г.) [14, 15].

Морфологическую верификацию УМ проводили согласно международным стандартам диагностики опухолей человека, использовали классификацию ВОЗ, 4-е издание, 2018 г. В сложных случаях подтверждали иммуногистохимическими маркерами меланоцитарного ряда [16, 17].

После верификации УМ на срезах с парафиновых блоков опухолей, предназначенных для стандартного морфологического исследования, проводили подсчет сосудов.

В работе использовали первичные антитела (АТ) и их разведения, представленные в таблице 2.

Парафиновые срезы помещали в термостат при 37 °С на 40 минут, после этого депарафинировали в ксилоле дважды по 10 минут, регидратировали в 96° спирте 3 раза по 3 минуты, затем срезы промывали в дистиллированной воде трижды по 1 минуте и в 3 % перекиси водорода в течение 10 минут. Для «демаскировки» АГ срезы прогревали в течение 45 минут на водяной бане в предварительно нагретом до 95–99 °С цитратном буфере. Затем стекла охлаждали при комнатной температуре в течение 20 минут, промывали в дистиллированной воде 5 минут и фосфатном буфере TRIS-HCL 2 раза по 5 минут. Раскапывали первые АТ автоматическими дозированными пипетками объемом 40 мкл. Инкубация с первыми АТ длилась 40 минут во влажной среде. Затем срезы промывали трижды в TRIS-HCL буфере в течение 5 минут.

Инкубацию со вторыми АТ [LSAB<sup>+</sup>kit, DAKO] проводили при комнатной температуре в течение 30 минут, затем срезы промывали 3 раза по 5 минут в TRIS-HCL буфере. Инкубацию с АТ, меченными стрептавидином [LSAB<sup>+</sup>kit, DAKO], выполняли при комнатной температуре в течение 20 минут и затем срезы промывали 3 раза

**Таблица 1.** Объем оперативного вмешательства у пациентов с УМ

**Table 1.** The volume of surgical intervention in patients with UM

Вид оперативного вмешательства / Type of surgery	Количество больных / Number of patients	
	абс. число / abs. number	процент / percent
Иридэктомия / Iridectomy	3	3,8
Иридоциклэктомия / Iridocyclectomy	6	7,7
Иридоциклохориоидэктомия / Iridocyclochoroidectomy	1	1,3
Энуклеация / Enucleation	66	84,6
Экзентерация / Exenteration	1	1,3
Всего: / Total:	78	100,0

**Таблица 2.** Панель использованных антител

**Table 2.** A panel of used antibodies

Антитела / Antibodies	Экспрессирующие клетки / Expressing cells	Клон / Clone	Разведение / Dilution	Фирма-производитель / Manufacturer
CD31	Мегакариоциты, тромбоциты, миелоидные клетки, <b>непрерывный эндотелий сосудов</b>	JC70A	1:40	DAKO
CD34	Гематопозитические стволовые клетки, <b>эндотелиальные клетки</b> , интерстициальные клетки Кахала	QVEnd 10	1:50	DAKO

по 5 минут. Для визуализации ИГХ-реакции использовали DAB+ систему [ДАКО]. Реакцию проводили в темноте в течение 2 минут. После этого их промывали в 3 сменах дистиллированной воды. Срезы докрашивали гематоксилином Майера, промывали под проточной водой 3 минуты, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, затем помещали в ксилол. Промывали трижды по 5 минут, после этого заключали в канадский бальзам под покровные стекла. Негативным контролем служила ИГХ-реакция без добавления первичных АТ. Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа Carl Zeiss axiolab E-re (Германия) под увеличением  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$ . Оценивали локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана).

Изучено 78 парафиновых блоков УМ. Состояние сосудистой сети в 59 УМ оценивали в опухолях дважды: гистологическим и иммуногистохимическим методом.

Для этого в морфологическую оценку ввели градации васкуляризации I–III степени по нарастанию количества сосудов. I степень васкуляризации присваивали опухоли с 1–2 сосудами в поле зрения при увеличении  $\times 40$ ; II степень — для опухоли с 3–9 сосудами; III степень — для УМ с 9 и более сосудами в поле зрения.

Ангиогенный ИГХ-паттерн оценивали после ИГХ-реакции с антителами к CD34 или CD31. ИГХ-паттерн также градируют на 3 типа:

ИГХ-паттерн 1-го типа присваивали УМ при малом количестве окрашенных антителами сосудов: 1–2 сосуда в 10 полях зрения;

ИГХ-паттерн 2-го типа присваивали УМ при окрашивании 3–9 сосудов в 10 полях зрения;

ИГХ-паттерн 3-го типа присваивали УМ при окрашивании  $\geq 9$  сосудов в 10 полях зрения (при увеличении  $\times 400$ ).

Единый принцип классифицирования васкуляризации в УМ на морфологическом и ИГХ-уровне позволил сопоставить информативность и надежность выявления сосудов этими двумя методами исследования. Морфологические данные сравнивали с результатами ИГХ-анализа.

ИГХ-исследования проведены на базе патанатомического отделения № 3 отдела онкопатологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава Российской Федерации с привлечением трех независимых экспертов-морфологов.

## СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Анализ данных проводили с помощью пакета прикладных статистических программ SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., США). Для показателей, измеренных по интервальной (количественной) шкале (возраст, диаметр и высота опухоли, сроки выживания и т.п.), рассчитывали среднее значение, среднеквадратичное отклонение и ошибку среднего. Для оценки значений отрезных точек использовали процедуру UNIVARIATE. Процедура позволяет определить 95% доверительные интервалы, медиану, моду, размах. Определяли частоту выявления качественных показателей (наличие митозов, лимфоидную инфильтрацию, некрозы, кровоизлияния, отек) в процентах (процедура FREQ). При анализе межгрупповых различий показателей, измеренных по интервальной шкале, рассчитывали значения *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок по соответствующим стандартным формулам (процедура MEANS).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Подавляющее большинство пациентов с УМ (67,1%), вошедших в исследование, находились на стадии T3N0M0. С начальными стадиями заболевания (T1–2N0M0) было 15,8%. У 13 человек (17,1%) опухоль вышла за пределы фиброзной капсулы глаза (стадия T4N0M0).

Макроскопически в 32 случаях опухоль располагалась в хориоиде, в 9 — в иридоцилиарной зоне; 32 пациента имели новообразование цилиохориоидальной локализации. В 5 случаях присутствовала изолированная опухоль радужки (табл. 3).

Было установлено, что УМ как злокачественная солидная опухоль отличается высокими средними показателями сосудов на единицу площади в зоне просмотра (медиана = 8) (табл. 4).

Наиболее высокие показатели зафиксированы при эпителиоидной меланоме, что ассоциируется с большей скоростью ее роста по собственным клиническим и литературным данным и более частым метастазированием по сравнению с аналогичными показателями при веретенноклеточной меланоме.

Показано, что с возрастом количество сосудов на единицу площади в зоне просмотра у больных в УМ снижается, что объясняет развитие метастазов в более отдаленные после энуклеации сроки у пожилых пациентов.

**Таблица 3.** Распределение пациентов в зависимости от локализации опухоли

**Table 3.** Distribution of patients depending on tumor location

Локализация опухоли / Tumor localization	Количество больных / Number of patients	Процент / Percent
Радужка / Iris	5	6,4
Радужка + цилиарное тело / Iris + ciliar body	9	11,6
Цилиарное тело + хориоидея / Ciliar body + choroid	32	41,0
Хориоидея / Choroid	32	41,0
Всего / Total	78	100

**Таблица 4.** Взаимосвязь показателей ангиогенеза и клеточного строения увеальной меланомы**Table 4.** The relationship between the indicators of angiogenesis and the cellular structure of uveal melanoma

Морфологический тип васкуляризации / Morphological type of vascularization	Эпителиоидная УМ / Epithelioid UM	Смешанно-клеточная УМ / Mixed cell UM	Веретенноклеточная УМ / Spindle cell UM	Всего / Total
III	11*	3	2	16
II	18*	8	5	31
I	2	6	4	12

Примечание: \* p (степень достоверности) < 0,05 по сравнению с группой веретенноклеточных меланом.  
Note: \* p (confidence level) < 0.05 compared to the spindle cell melanoma group.

**Таблица 5.** Сопоставление между морфологическим типом васкуляризации и ИГХ-паттерном с маркерами CD34 и CD31 в увеальной меланоме**Table 5.** Comparison between morphological type of vascularization and IHC pattern with CD34 and CD31 markers in uveal melanoma

Морфологический тип васкуляризации / Morphological type of vascularization	Слабая экспрессия CD34 / Weak CD34 expression	Умеренная экспрессия CD34 / Moderate CD34 expression	Выраженная экспрессия CD34 / Strong CD34 expression	Слабая экспрессия CD31 / Weak CD31 expression	Умеренная экспрессия CD31 / Moderate CD31 expression	Выраженная экспрессия CD31 / Strong CD31 expression
	ИГХ-паттерн 1 тип / IHC-pattern 1 type	ИГХ-паттерн 2 тип / IHC-pattern 2 type	ИГХ-паттерн 3 тип / IHC-pattern 3 type	ИГХ-паттерн 1 тип / IHC-pattern 1 type	ИГХ-паттерн 2 тип / IHC-pattern 2 type	ИГХ-паттерн 3 тип / IHC-pattern 3 type
I	8 66,6 %	3 25,0 %	1 8,4 %	6 50,0 %	4 33,4 %	2 16,6 %
II	4 12,9 %	22 70,9 %	5 16,2 %	4 13,0 %	20 64,5 %	7 22,5 %
III	0 0,0 %	6 37,5 %	10 62,5 %	1 6,2 %	2 12,5 %	13 81,3 %
Всего: 59	12	31	16	11	26	22

Коэффициент корреляции между плотностью сосудов на единицу площади и возрастом составил  $k = 0,7856$  ( $p < 0,001$ ).

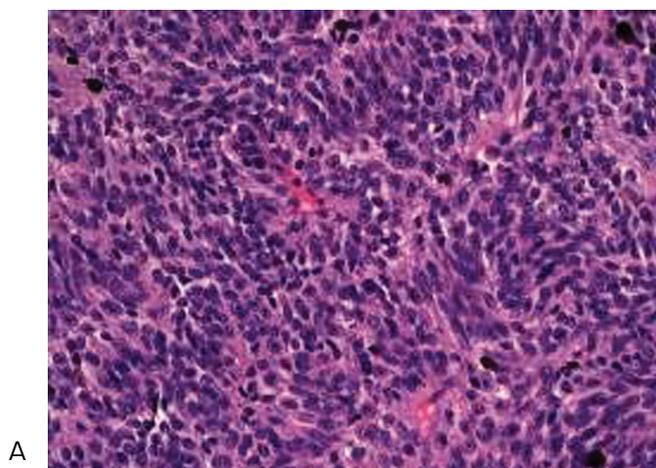
Выявлены и описаны различия в показателях плотности сосудов при опухолях различной локализации: максимальными они оказались в преэкваториальных опухолях (медиана 11,2), а минимальными — в опухолях радужки (медиана 3,0). Плотность сосудов в цилиарной меланоме имела средние значения (медиана = 6,0) Коэффициент корреляции плотности сосудов на единицу площади с локализацией УМ был равен  $k = 0,5346$  ( $p < 0,01$ ).

Для уточнения сравнительной информативности и точности количественной оценки экспрессии этого маркера мы сопоставили васкуляризацию УМ на гистологическом уровне (тип васкуляризации I–III) и ИГХ-уровне (ИГХ-паттерн) (табл. 5). Сопоставление морфологического типа васкуляризации (I–III) с ангиогенным ИГХ-паттерном (1–3-й тип) показало, что на световом уровне в каждой третьей опухоли идентифицировать и/или подсчитать точно не представляется возможным.

Для уточнения сравнительной информативности, надежности и точности маркеров эндотелиальных клеток CD31 и CD34 в количественной оценке ангиогенеза УМ мы сопоставили васкуляризацию УМ, оцененную на гистологическом уровне с присвоением типа васкуляризации от I до III, с ИГХ-оценкой и уточнением градации ИГХ-паттерна от 1 до 3 (табл. 5). Сопоставление гистологических и иммуногистохимических данных

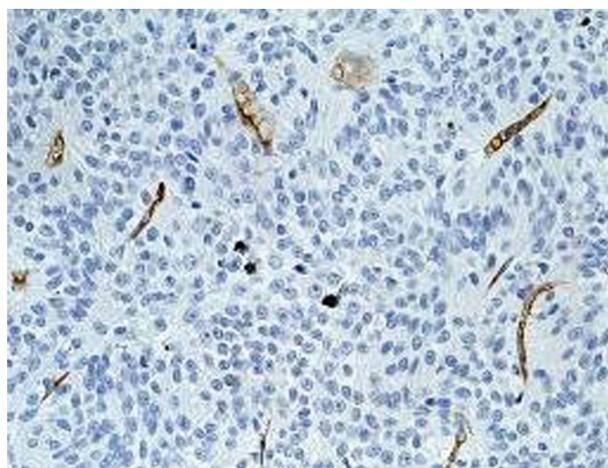
показало, что на световом уровне в каждой третьей опухоли (33,4 %) идентифицировать и/или подсчитать точно количество сосудов на срезе не удается по причине того, что сосуды в опухоли компрессированы опухолевыми клетками или находятся в начальной стадии ангиогенеза и не видны. В этом случае благодаря ИГХ-окрашиванию ЭК маркеры CD34 и CD31 оказывают незаменимую услугу в отношении визуализации сосудов, включая скрытые и компрессированные, а также понимания полноты картины ангиогенеза конкретной УМ (рис. 1А, Б). Такой подход в 8,4 % случаев с I типом васкуляризации позволил выявить невидимые на световом уровне сосуды и отнести УМ к 3-му типу ИГХ-паттерна, а еще 25 % — ко 2-му типу ИГХ-паттерна по CD31: процент повышения градации ИГХ-паттерна с маркером CD34 составил 16,6 % и 33,4 % соответственно. Иначе говоря, в реалиях количество интратуморальных сосудов на единицу площади в зоне просмотра ИГХ-реакции оказалось выше, чем это можно было выявить на световом уровне. При III типе васкуляризации данные гистологии и ИГХ совпали только в 81,3 % УМ по данным CD31 и 62,5 % по данным CD34, что в целом говорило о хорошей чувствительности и специфичности маркеров ЭК и их высоком потенциале в отношении визуализации скрытых сосудов в опухоли.

В этом аспекте маркер ЭК CD31 демонстрировал несколько меньшую чувствительность при окраске скрытых или компрессированных опухолевых сосудов. Заметим, в ИГХ-реакциях зафиксированы случаи как повышения градации васкуляризации в сторону



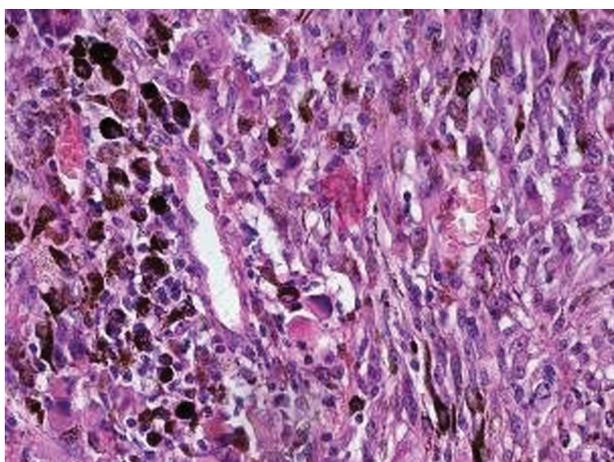
А: Гематоксилин-эозин, слабая васкуляризация УМ, I тип васкуляризации,  $\times 400$

A: Hematoxylin-eosine, type I vascularization of UM,  $\times 400$



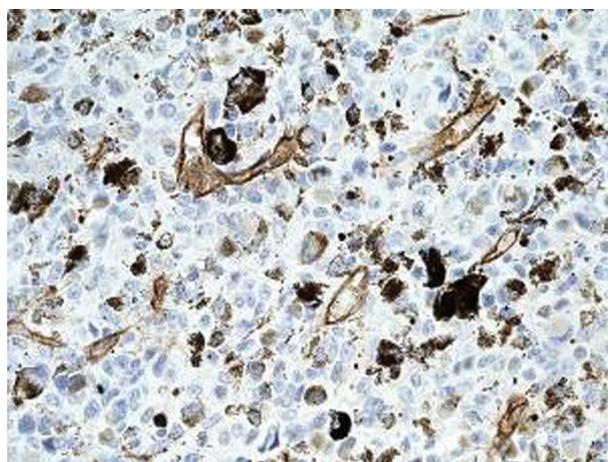
Б: ИГХ-реакция с CD34 (++) в УМ, представленной на рис. 1А,  $\times 400$ ; соответствует 2-му типу ангиогенного ИГХ-паттерна

Б: IHC-reaction with CD34 (++) in UM, presented in Fig. 1A,  $\times 400$ , corresponds to 2 type of angiogenic ICH pattern



В: Гематоксилин-эозин, II тип васкуляризации,  $\times 400$

B: Hematoxylin-eosine, type II vascularization of UM,  $\times 400$



Г: ИГХ-реакция с CD34 (+++) в УМ, представленной на рис. 1В,  $\times 400$ , соответствует 3-му типу ангиогенного ИГХ паттерна

Г: IHC-reaction with CD34 (+++) in UM, presented in Fig. 1B,  $\times 400$ , corresponds to 3 type of angiogenic ICH pattern

**Рис. 1.** Сопоставление морфологических типов васкуляризации ангиогенным ИГХ-паттернам в УМ

**Fig. 1.** Comparison of morphological types of vascularization of angiogenic IHC patterns in UM

более высокого ИГХ-паттерна по обоим маркерам (50,0 % по CD31 и 34,6 % по CD34), так и в сторону их понижения. В 13,0 % УМ из-за слабой экспрессии CD31 произошло снижение градации и перевод со II типа васкуляризации на I-й тип ИГХ-паттерна и в 18,7 % с III типа на 2-й тип ИГХ паттерна. При III типе васкуляризации совпадение с 3-м типом ИГХ-паттерна по CD34 имело место в 81,3 % УМ, а по CD31 — в 62,5 %.

Полагаем, что менее высокая по сравнению с CD34 чувствительность CD31 по выявлению компрессированных интратуморальных сосудов объясняется несколькими причинами. Одна из них: повышенная специфичность маркера к непрерывному эндотелию. Известно, что ангиогенез в опухоли — непрерывный циклический

процесс, во время которого зрелые интратуморальные сосуды сосуществуют с незрелыми сосудами, характеризующимися неполной выстилкой стенки ЭК, пребывающим на стадии «сборки». На этом этапе CD31 может демонстрировать ложнонегативные результаты ИГХ-окрашивания. Кроме того, как известно, сосуды в УМ могут иметь фенестры, что также снижает чувствительность ИГХ-окрашивания антителами к CD31.

Справедливости ради следует отметить, что при использовании маркера ЭК CD34 в 11,9 % УМ также произошло снижение ранга васкуляризации с большего по гистологическому типу на меньший по ИГХ-паттерну. Однако в случае CD34 этот феномен был связан с формированием сосудистой мимикрии,

при которой опухолевые сосуды не имеют эндотелиальной выстилки, а ее функции выполняют базальные мембраны опухолевых клеток [10]. Такие сосуды развиваются чаще при опухолях больших размеров или цилиарной локализации. Эти сосуды иммунонегативны по CD34, CD31.

Кроме того, эмпирически было установлено, что ИГХ-возможности CD34 по визуализации сосудов намного шире. Маркер CD34 окрашивает практически все структуры сосудистой стенки, включая не только эндотелиальный пласт, но и базальную мембрану. Сосуды визуализировались более контрастно, и появлялась возможность изучить форму и строение сосуда внутри опухоли, его контакты с прилежащими сосудами.

Ключевым отличием маркера эндотелиальных клеток CD31 от CD34 является также тот факт, что CD31 не окрашивает предшествующие ЭК, фенестрированный ЭК, но окрашивает непрерывный монослой ЭК сосудистой стенки.

Корреляционный анализ выявил высокую прямую коррелятивную связь экспрессии маркеров эндотелия сосудов CD34 и CD31 с количеством сосудов в опухоли, выявленных на световом уровне ( $r = 0,7834$ ;  $p = 0,003$  и  $p = 0,034$  соответственно).

## ВЫВОДЫ

Уvealная меланома отличается высокими показателями плотности микрососудов на единицу плотности (медиана = 8).

Плотность сосудов в УМ зависит от клеточного строения опухоли: максимальные показатели зафиксированы в эпителиоидной УМ.

Степень васкуляризации УМ снижается с возрастом пациента, что объясняет более редкие случаи метастазирования в отдаленные после энуклеации сроки у пожилых больных.

Плотность сосудов зависит от локализации УМ: минимальное количество сосудов зафиксировано в радужке, максимальное — при преэкваториальном расположении УМ.

Маркеры эндотелиальных клеток CD34 и CD31 позволяют визуализировать скрытые, компрессированные сосуды УМ, что способствует точному подсчету плотности сосудов на единицу площади и изучению их архитектоники.

## УЧАСТИЕ АВТОРОВ:

Лихванцева В.Г. — научное редактирование;

Анурова О.А. — выполнение исследований, интерпретация результатов, написание текста;

Верещагина М.В. — сбор клинического материала, техническое редактирование, оформление библиографии;

Ованесян В.Э. — подготовка иллюстраций, сбор материала, статистический анализ данных.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Барышников А.Ю., Степанова Е.В., Личиницер М.Р. Оценка ангиогенеза опухолей человека. Успехи современной биологии. 2000;120(6):599–604. [Baryshnikov A.Yu., Stepanova E.V., Lichinitser M.R. Assessment of angiogenesis of human tumors. Advances in modern biology = *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2000;120(6):599–604 (In Russ.).]
2. Карамышева А.Ф. Ангиогенез опухоли: механизмы, новые подходы. В кн. Канцерогенез. Под ред. Д.Г. Заридзе. М.: Научный мир, 2000. [Karamyshva A.F. Tumor angiogenesis: mechanisms, new approaches. In the book *Carcinogenesis*. Ed. by D.G. Zaridze. Moscow: Scientific World, 2000 (In Russ.).]
3. Зиангирова Г.Г., Лихванцева В.Г. Опухоли сосудистого тракта глаза. М.: Последнее слово, 2003. 456 с. [Ziangirova G.G., Likhvantseva V.G. Tumors of the eye vascular tract. Moscow: The Last Word, 2003. 456 p. (In Russ.).]
4. Лихтенштейн А.В., Шапот В.С. Опухолевый рост: ткани, клетки, молекулы. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1998;3:25–44. [Lihentshtejn A.V., SHapot V.S. Tumor growth: tissues, cells, molecules. Pathological physiology and experimental therapy = *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 1998;3:25–44 (In Russ.).]
5. De Jong J.S., Van Diest P.J., Van der Valk P., Baak J.P.A. Expression of growth factors, growth inhibiting factors and their receptors in invasive breast cancer. I and II. *J. Pathol.* 1998;184:44–57. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199801)184:1<53::AID-PATH6>3.0.CO;2-7
6. Folberg R., Pe'er J., Gruman L.M. The morfologic characteristics of tumor blood vessels as a marker of tumor progression in primary human uveal melanoma^ a matched case-control study. *Hum Pathol.* 1992;23:1298–1305. DOI: 10.1016/0046-8177(92)90299-i
7. Folberg R., Rummelt V., Parys-Van Ginderdeuren R., Hwan T. The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma. *Ophthalmology.* 1993;100:1389–1398. DOI: 10.1016/s0161-6420(93)31470-3
8. Folberg R. Tumor progression in ocular melanomas. *J. Invest Dermatol.* 1993;100:326S–333S. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12470222
9. Folberg R.t, Menaffey M., Lynn M. Gardner The microcirculation of choroidal and ciliary body melanomas. *Eye.* 1997;11:227–238. DOI: 10.1038/eye.1997.57
10. Folberg R., Hendrix M.J. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am. J. Pathology.* 2000;156(2):361–371.
11. Srivastava A., Laidler P. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76–4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am. J. Pathol.* 1988;133:419–423.
12. Chen X., Maniatis A.J., Majumdar D., Pe'er J., Folberg R. Uveal melanoma cell staining for CD34 and assessment of tumor vascularity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;42(8):2533–2539.
13. Van de Rijn M., Rouse R. CD34: a review. *Appl Immunohistochem.* 1994;1:2:71.
14. Brierley J., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. (eds.): TNM classification of malignant tumours, Eighth edition edn. Oxford, UK; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2017.
15. Клинические рекомендации «Уvealная меланома», утвержденные Минздравом РФ 2020 [Clinical guidelines “Uveal melanoma”, 2020 (In Russ.)]. <https://legalacts.ru/doc/klinicheskie-rekomendatsii-uevalnaja-melanoma-utv-minzdravom-rossii/>
16. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Под ред. С.В. Петрова и Н.Т. Райхлина. Казань: Титул, 2004. 451 с. [Guidelines for the immunohistochemical diagnosis of human tumors. Ed. S.V. Petrov and N.T. Raikhlina. Kazan: Titul, 2004. 451 p. (In Russ.)].
17. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry. Churchill Livingstone: Philadelphia, 2002, 641 p.
18. Самкович Е.В., Панова И.Е. Возможности идентификации сосудистой сети меланомы хориоидеи. *Офтальмология.* 2020;17(2):172–180. [Samkovich E.V., Panova I.E. Possibilities of identification of vasculature of choroidal melanoma *Ophthalmology in Russia = Oftal'mologiya.* 2020;17(2):172–180 (In Russ.)].

**СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ**

ФГБУ ГНЦ РФ — «Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»  
Лихванцева Вера Геннадьевна  
доктор медицинских наук, профессор, кафедра офтальмологии  
ул. Гамалеи, 15, Москва, 123098, Российская Федерация  
Волоколамское шоссе, 91, Москва, 125310, Российская Федерация  
<https://orcid.org/0000-0002-3175-9592>

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации»  
ул. Академика Опарина, 4, Москва, 117997, Российская Федерация  
Анурова Ольга Александровна  
кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом патолого-анатомического отделения № 3 (онкопатология)

ГБУ «Детская городская поликлиника № 15» Департамента здравоохранения г. Москвы  
Верещагина Марина Владимировна  
кандидат медицинских наук, врач  
Коптевский бульвар, 18, корп. 1, Москва, 125239, Российская Федерация

ГБУЗ МО «Егорьевская центральная районная больница»  
Ованесян Владимир Эдуардович  
заведующий отделением офтальмологии  
Жукова гора, 19, Егорьевск, Московская область, 140304, Российская Федерация

**ABOUT THE AUTHORS**

Federal Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of FMBA of Russia  
Academy of postgraduate education under FSBU FSCC of FMBA of Russia  
Likhvantseva Vera G.  
MD, Professor, Department of Ophthalmology  
Gamalei str., 15, Moscow, 123098, Russian Federation  
Volokolamskoe highway, 91, Moscow, 125371, Russian Federation  
<https://orcid.org/0000-0002-3175-9592>

National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov  
Anurova Olga A.  
PhD, pathologist of the pathology department No. 3 (oncopathology)  
Academician Oparin str., 4, Moscow, 117997, Russian Federation

Children's City Polyclinic No. 15  
Vereshchagina Marina V.  
PhD, doctor  
Koptev ave., 18/1, Moscow, 125239, Russian Federation

Yegoryev Central District Hospital  
Ovanesian Vladimir E.  
head of the of Ophthalmology Department  
Zhukova mountain, 19, Yegoryevsk Moscow Region, 140304, Russian Federation