Экспрессия фактора роста сосудистого эндотелия в увеальной меланоме

В.Г. Лихванцева^{1,2} О.А. Анурова³ С.Е. Астахова² М.В. Верещагина⁴В.Э. Ованесян⁵Е.В. Степанова⁶

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

² 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

³ 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

⁴ ГБУ «Детская городская поликлиника № 15» Департамента здравоохранения г. Москвы, Амбулаторно-поликлинический центр
Коптевский бульвар, 18, корп. 1, Москва, 125239, Российская Федерация

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

⁶ Научно-исследовательский институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
Наширское шоссе, 23, Москва, 23115478, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2021;18(4):914–921

Необходимым условием для роста, прогрессирования и метастазирования злокачественных опухолей любой локализации является развитие собственной сети сосудов. Новообразованные сосуды не только питают первичную опухоль, но и создают условия для распространения опухолевых клеток по кровеносной системе и формирования дистантных метастазов. Ангиогенез способна запустить небольшая популяция из опухолевых 100–300 клеток, накопивших генетические aberrации и начавших экспрессировать проангиогенные молекулы. Феномен известен как «трансформация опухолевых клеток в ангиогенный фенотип». Опухоль с ангиогенным фенотипом несет высокий потенциал пролиферации и малигнизации. Эта закономерность выявлена при многих типах рака, но мало изучена при увеальной меланоме (УМ). Между тем в этом аспекте увеальная меланнома, метастазирующая исключительно гематогенным путем, с ее избирательным, органотропным характером метастазирования, становится привлекательной моделью для изучения молекулярного «сценария» опухолевого ангиогенеза. Проведенные исследования позволяют говорить, что УМ подчиняется общим закономерностям развития злокачественных опухолей. Как и для многих типов опухолей, VEGF является облигатным условием развития и прогрессирования УМ. Продукентами молекулы VEGF в УМ являются две популяции клеток: эндотелиальные клетки (ЭК) сосудов и опухолевые клетки. Экспрессия VEGF в УМ носит циклический характер. Цикл реиницируется, по-видимому, повышением плотности клеток в опухолевом пролиферате и развитием зон гипоксии. Мы не обнаружили корреляционной связи между интенсивностью пигментации, наличием некрозов, кровоизлияний, прорастанием в угол передней камеры, офтальмогипертензией, с одной стороны, и экспрессией VEGF в клетках УМ — с другой. Вместе с тем выявлена прямая связь умеренной силы между экспрессией VEGF в опухолевых клетках и ЭК сосудов, с одной стороны, и толщиной, диаметром основания, а также локализацией УМ — с другой. Дополнительно, экспрессия VEGF в опухолевых клетках тесно коррелировала с гистологическим строением УМ, а экспрессия VEGF в ЭК коррелировала со стадией заболевания. Таким образом, авторы показали, что УМ, как и другие злокачественные солидные опухоли, склонна к трансформации в ангиогенный фенотип и экспрессии VEGF.

Ключевые слова: увеальная меланнома, ангиогенез, экспрессия сосудистого эндотелиального фактора роста, иммуногистохимический анализ

Для цитирования: Лихванцева В.Г., Анурова О.А., Астахова С.Е., Верещагина М.В., Ованесян В.Э., Степанова Е.В. Экспрессия фактора роста сосудистого эндотелия в увеальной меланоме. *Офтальмология*. 2021;18(4):914–921. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2021-4-914-921>

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

Конфликт интересов отсутствует

В.Г. Лихванцева, О.А. Анурова, С.Е. Астахова, М.В. Верещагина, В.Э. Ованесян, Е.В. Степанова

Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Uveal Melanoma

V.G. Likhvantseva¹, O.A. Anurova³, S.E. Astakhova², M.V. Vereshchagina⁴, V.E. Ovanesyan⁵, E.V. Stepanova⁶

¹A.I. Burnazyan Federal Biophysical Center of FMBA of Russia
Gamalei str., 15, Moscow, 123098, Russian Federation

²Academy of Postgraduate Education of the Federal Scientific and Clinical Center
for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of FMBA of Russia
Volokolamsk highway, 91, Moscow, 125371, Russian Federation

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

⁴Children's City Polyclinic No. 15, Ambulatory and Polyclinic Center
Koptev ave., 18/1, Moscow, 125239, Russian Federation

⁵Yegoryev Central District Hospital
Zhukova Mountain, 19, Yegoryevsk, Moscow Region, 140304, Russian Federation

⁶Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors
of National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin
Kashirskoye highway, 23, Moscow, 115478, Russian Federation

ABSTRACT

Ophthalmology in Russia. 2021;18(4):914-921

A prerequisite for the growth, progression and metastasis of malignant tumors of any localization is the development of its own vascular network. Newly formed vessels not only nourish the primary tumor, but also create conditions for the spread of tumor cells through the circulatory system and the formation of distant metastases. Angiogenesis is able to launch a small population of tumors from 100–300 cells that have accumulated genetic aberrations and have begun to express proangiogenic molecules. The phenomenon is known as “transformation of tumor cells into angiogenic phenotype”. A tumor with angiogenic phenotype carries a high potential for proliferation and malignization. This pattern has been found in many types of cancer, but studied less in uveal melanoma. Meanwhile, in this aspect, uveal melanoma, metastasizing exclusively in a hematogenic way, with its selective, organotropic nature of metastasis, becomes an attractive model for the study of the molecular “scenario” of tumor angiogenesis studies allow us to say that, UM is subject to the general patterns of the development of malignant tumors. As with many types of tumors, VEGF is an obligate condition for the development and progression of UM. The VEGF molecule's producers in UM are two cell populations: endothelial vascular cells and tumor cells. VEGF's expression in UM is cyclical. The cycle is re-initiated, apparently, by increasing cell density in tumor proliferate and the development of hypoxia zones. We found no correlation between the intensity of pigmentation, necrosis, hemorrhage, germination in the corner of the front chamber, ophthalmohypertension on the one hand, and expression of VEGF in UM cells on the other. At the same time, a direct link between the expression of VEGF in tumor cells and EC vessels on the one hand and the thickness, base diameter, as well as the localization of UM, on the other hand, has been revealed. Additionally, VEGF expression in tumor cells was closely correlated with the histological structure of UM, and VEGF expression in EC correlated with the stage of the disease. Thus, the authors showed that UM, like other malignant solid tumors, is prone to transformation into angiogenic phenotype and expression of VEGF.

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., Stepanova E.V. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Uveal Melanoma. *Ophthalmology in Russia*. 2021;18(4):914-921. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2021-4-914-921>

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

There is no conflict of interests

За последние 50 лет благодаря инновационным молекулярным технологиям наши знания о патогенезе неопластического процесса существенно обогатились. Мы стали лучше понимать процессы пролиферации и метастазирования. Предпринимаются попытки контроля роста некоторых типов рака [1–5]. Так, было доказано, что необходимым условием для роста, прогрессирования и метастазирования злокачественных опухолей любой локализации, включая опухоли сосудистого тракта глаза, является развитие собственной сети сосудов. Экспериментально установлено, что в отсутствие кровоснабжения опухоль не растет, не метастазирует и даже может регрессировать. Аvascularная опухоль сохраняет жизнеспособность в течение многих лет, хотя роста ее не наблюдается [6–13]. Однако все быстро меняется в условиях стимуляции ангиогенеза факторами роста [14]. В этом аспекте увеальная меланома (УМ),

метастазирующая исключительно гематогенным путем, с ее избирательным, органотропным характером метастазирования, становится привлекательной моделью для изучения молекулярного «сценария» опухолевого ангиогенеза. Описаны случаи развития дистантных метастазов спустя 40 лет после энуклеации глаза с УМ [3].

Ключевым фактором по запуску ангиогенеза в опухолях признан фактор роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) [6, 7, 13]. VEGF стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток (ЭК), активизирует гены протеолиза межклеточного матрикса в опухоли. Современные стратегии противораковой терапии рассматривают злокачественные опухоли как своеобразный симбиоз двух клеточных популяций — опухолевой популяции и популяции эндотелиальных клеток. Поэтому наряду с препаратами, действие которых направлено на разрушение опухолевых клеток, используют

антиангиогенную терапию, направленную на блокирование активности VEGF. В связи с этим особенности экспрессии этой молекулы в УМ представляют несомненный научно-практический интерес.

Цель работы: изучить экспрессию VEGF в увеальной меланоме.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование носило ретроспективный характер и включало 98 пациентов с УМ (46 мужчин, 52 женщины). Возраст пациентов колебался от 30 до 84 лет.

Большим УМ после полного обследования, исключения дистантных метастазов проводили хирургическое лечение [14, 15]. В 15,4 % случаев пациентам было выполнено хирургическое лечение в виде блокэксцизии опухоли, и у 84,6 % больных из-за больших размеров опухоли органосохраняющее лечение выполнить не представлялось возможным, поэтому проводили энуклеацию или экзентерацию.

Больных наблюдали от 5 до 20 лет или до появления метастазов. Продолжительность их жизни, факт смерти от метастатического процесса и дата смерти подтверждены запросами ЦАБ.

Стадию заболевания выставляли в соответствии с рекомендациями 8-й редакции Американского объединенного 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 (ИГХ) маркерами меланокитарного ряда [16, 17].

Материалом для иммуногистохимических исследований служил архивный материал в виде парафиновых блоков ($n = 98$) энуклеированных глаз с УМ.

Парафиновые срезы помещали в термостат при 37 °C 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. «Демаскировку» антигенов (АГ) осуществляли, прогревая срезы в течение 45 минут на водяной бане в нагретом до 95–99 °C цитратном буфере. Охлаждали стекла в течение 20 минут при комнатной температуре, затем промывали в дистиллированной воде и дважды в фосфатном буфере TRIS-HCL. Дозированными пипетками объемом 40 мкл раскапывали первые антитела (АТ). 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⁺kit, DAKO] проводили в течение 30 минут при комнатной температуре, затем срезы промывали трижды по 5 минут в TRIS-HCL буфере. Инкубацию с АТ, меченными стрептавидином [LSAB⁺kit, DAKO], осуществляли

при комнатной температуре в течение 20 минут, отмывали срезы трижды по 5 минут. ИГХ-реакцию визуализировали с помощью DAB+ системы [DAKO]. Реакцию проводили в темноте в течение 2 минут. После этого срезы заново промывали в 3 сменах дистиллированной воды и докрашивали гематоксилином Майера, промывая в проточной воде и обезжиривая в спиртах возрастающей концентрации. Помещали в ксилон. Промывали трижды по 5 минут, заключали в канадский бальзам под покровные стекла. В качестве первичных антител использовали АТ к VEGF (клон С-1, разведение 1: 100, Santa Cruz Biotech). Негативным контролем служила ИГХ-реакция без добавления первичных АТ.

Результаты ИГХ-реакции оценивали с помощью светового микроскопа Leica (Германия, увеличение $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$) по ряду критериев: интенсивности и локализации окрашивания (ядро, цитоплазма, мембрана), количеству позитивных клеток в максимально содержащих зонах, интенсивности окраски. Использовали 3 градации окрашивания: слабую, умеренную и интенсивную [17, 18].

ИГХ-реакцию оценивали в двух популяциях клеток: в опухолевых клетках и эндотелиальных клетках сосудов УМ. Каждый из феноменов рассматривали как самостоятельный и независимый фактор и анализировали отдельно.

Гистологические и иммуногистохимические исследования ткани УМ проводили на базе отдела патологической анатомии № 3 (онкопатология) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава Российской Федерации (к.м.н. О.А. Анурова) и лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза (д.б.н. Е.В. Степанова).

Оценку результатов, их интерпретацию и корреляционный анализ показателей выполняли на кафедре офтальмологии Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.

Результаты анализировали с помощью программы SAS (Statistical Analysis System, version 6.09, США). Рассчитывали среднее групповое значение, среднее квадратическое отклонение, стандартную ошибку среднего; по номинальной (ранговой) шкале оценивали частоту выявления показателей в процентах. Высчитывали корреляционную связь между показателями. Достоверность различий между количественными показателями в группах больных высчитывали с помощью t -критерия Стьюдента, а различия ранговых показателей — по χ^2 -критерию Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Обнаружено, что увеальная меланома имеет «высокоангиогенный фенотип». Поддерживается этот фенотип двумя популяциями клеток: опухолевыми и эндотелиальными (рис. 1).

При этом опухолевые клетки (ОК) приступают к экспрессии VEGF, не достигая толщины 2 мм, в то время как эндотелиальные клетки (ЭК) начинают экспрессировать только по достижении увеальной меланомой толщины ≥ 2 мм. С целью изучения роли феномена

мы рассматривали эти события как две различные характеристики одного процесса.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКЦИИ VEGF В КЛЕТКАХ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ

Экспрессия VEGF в опухолевых клетках обнаружена в 63,0 % тестируемых УМ. В таблице 1 представлены основные характеристики этого процесса. Количество VEGF-позитивных опухолевых клеток в поле зрения варьировало от опухоли к опухоли в широком коридоре значений: от 0 до 70. Наибольшая численность популяции VEGF-позитивных опухолевых клеток зафиксирована на начальных стадиях роста УМ — T_1 : 70,0 %. По мере прогрессирования неопластического процесса от $T_1 \rightarrow T_4$ количество опухолевых клеток с VEGF-экспрессией сокращалось практически вдвое — до 36 % (рис. 2). Высокодостоверна разница в показателях на ранних и поздних стадиях ($p < 0,001$).

ЭКСПРЕССИЯ VEGF В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ СОСУДОВ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ

Экспрессия VEGF в ЭК сосудов УМ имела место в 32,3 % УМ, причем в половине VEGF⁺ срезов все эндотелиальные клетки продуцировали VEGF (рис. 1).

Таблица 1. Показатели экспрессии VEGF в увеальной меланоме

Table 1. VEGF expression in uveal melanoma

Показатель / Index	Экспрессия VEGF в клетках УМ / VEGF expression in UM cells		Экспрессия VEGF в ЭК УМ / VEGF expression at EC UM	
Всего: $n = 98$ / Total: $n = 98$	% VEGF-позитивных клеток / % VEGF positive cells	Средняя градация интенсивности экспрессии / Average gradation of expression intensity	% VEGF-позитивных клеток / % VEGF positive cells	Ср. градация интенсивности экспрессии / Average gradation of expression intensity
Слабая экспрессия градация I / Weak expression of Grade I	61,7%	2,5±0,7	4,3%	1,4±0,7
Умеренная экспрессия градация II / Moderate Expression Grade II	18,8%		9,4%	
Гиперэкспрессия градация III / Hyperexpression Grade III	19,5%		17,7%	
Стадия заболевания: T ₁				
Слабая экспрессия градация I / Weak expression of Grade I	25,0%	2,3 ±0,6	0,0%	0,0%
Умеренная экспрессия градация II / Moderate Expression Grade II	35,0%		0,0%	
Гиперэкспрессия градация III / Hyperexpression Grade III	45,0%		0,0%	
Стадия заболевания: T ₂				
Слабая экспрессия градация I / Weak expression of Grade I	33,4%	1,3±0,5	5,3%	1,0
Умеренная экспрессия градация II / Moderate Expression Grade II	33,3		0,0%	
Гиперэкспрессия градация III / Hyperexpression Grade III	33,3%		0,0%	
Стадия заболевания: T ₃				
Слабая экспрессия градация I / Weak expression of Grade I	64,8%	1,7±0,2	88,2	0,8±0,5
Умеренная экспрессия градация II / Moderate Expression Grade II	17,2%		10,2%	
Гиперэкспрессия градация III / Hyperexpression Grade III	18,0%			
Стадия заболевания: T ₄				
Слабая экспрессия градация I / Weak expression of Grade I	72,2%			1,5±0,9
Умеренная экспрессия градация II / Moderate Expression Grade II	12,0%			
Гиперэкспрессия градация III / Hyperexpression Grade III	15,8%		54,5%	
Гистологический тип увеальной меланомы				
Веретенноклеточные / Spindle cell	37,4%	1,1±0,1	17,9±7,0%,	0,7±0,1
Смешанноклеточные / Mixed cell	50,4±7,7%	1,3 ±0,2	12,4±4,2%	1,1 ±0,2
Эпителиоидные / Epithelioid cell	43,8±9,3%	1,5±0,5	17,1±5,4%	1,3±0,5

Рис. 1. ИГХ-реакция с АТ к VEGF в эндотелии сосудов и опухолевых клетках увеальной меланомы. Гист. № 56782. Ув. 400

Fig. 1. ICH-reaction from AT to VEGF in vascular endothelium and tumor cells of uveal melanoma. Hist. No. 56782. $\times 400$

Гиперэкспрессию VEGF (градация III, 17,7 % случаев) в ЭК обнаруживали чаще, чем экспрессию с умеренной (градация II, 9,4 %) и слабой интенсивностью (градация I, 4,3 %) (табл. 1).

Кинетика экспрессии VEGF опухолевыми и эндотелиальными клетками УМ

Рис. 2. Кинетика VEGF-положительных клеток на разных стадиях УМ (синий цвет — опухолевые клетки, голубой — эндотелиальные клетки)

Fig. 2. VEGF kinetics are positive cells at different stages of UM (Dark blue color — tumor cells, light blue — endothelial cells)

Экспрессия VEGF в клетках УМ и эндотелии сосудов УМ

Рис. 3. Графическое изображение экспрессии опухолевыми и эндотелиальными клетками в УМ. Достоверна межпопуляционная разница в численности VEGF⁺ клеток ($p \leq 0,001$)

Fig. 3. Graphic image of expression by tumor and endothelial cells in UM. Reliable inter-population difference in the number of VEGF⁺ cells ($p \leq 0,001$)

Как следует из представленного рисунка, эндотелиальные клетки начинали экспрессировать VEGF позже клеток УМ — на стадии T₂. И эти популяции становятся равнозначными при выходе опухоли за пределы фиброзной оболочки глаза (рис. 2).

В целом, если сравнивать «вклад» в продукцию VEGF двух популяций клеток, то доминируют в этом процессе, безусловно, опухолевые клетки увеальной меланомы, а не эндотелиальные клетки (рис. 3).

Другая характеристика «ангиогенного фенотипа» УМ — градация экспрессии VEGF, оцениваемая интенсивностью ИГХ-окрашивания, также варьировала от образца к образцу от слабой до гиперэкспрессии. Слабую экспрессию (градация I) выявляли в 31,3 % УМ, умеренную (градация II) — в 12,5 %, интенсивную (градация III) — в 18,8 %.

Детальный постадийный анализ свидетельствует о сокращении популяции клеток, умеренно и интенсивно экспрессирующих VEGF, с 66,6 до 27,8 % при переходе от стадии T₃ к стадии T₄ и росте популяции слабоэкспрессирующих VEGF-клеток (72,2 %).

Кинетика интенсивности клеточной продукции VEGF опухолевыми клетками на различных стадиях заболевания, высчитанная по усредненным показателям градации интенсивности, свидетельствует о некой цикличности с уменьшением градации интенсивности экспрессии по мере усугубления онкологического процесса. Пик интенсивности ($M \pm m$) зафиксирован при начальной меланоме T₁ ($M_{cp} = 2,3 \pm 0,6$), снижение экспрессии — на стадии T₂ ($M_{cp} = 1,3 \pm 0,2$), умеренный всплеск продукции ($M_{cp} = 1,7 \pm 0,1$) — на стадии T₃, и спад ($M_{cp} = 0,6 \pm 0,2$) — при массивном прорастании опухолью фиброзной оболочки глаза (рис. 4).

Различные гистологические типы УМ по-разному экспрессировали VEGF. Наиболее интенсивная экспрессия имела место в эпителиоидной УМ, наименее — в веретенчатой УМ (табл. 1). Достоверная разница в продукции, по-видимому, отражала интенсивность ангиогенеза в различных клеточных типах УМ.

Корреляционный анализ выявил достоверные корреляции некоторых клинических и ИГХ-показателей экспрессии VEGF. Так, была выявлена достоверная, прямая связь между продукцией VEGF в ЭК сосудов и стадией онкологического заболевания: коэффициент корреляции по интенсивности клеточной продукции составил $k = 0,47635$, по проценту иммуноположительных клеток — $k = 0,43981$ ($p < 0,01$ и $p < 0,05$) (табл. 2).

Экспрессия VEGF в ЭК прямо коррелировала с протяженностью опухоли: с увеличением диаметра УМ увеличивался процент гиперэкспрессирующих, умеренно экспрессирующих и слабоэкспрессирующих VEGF-клеток. Гиперэкспрессия VEGF ЭК сосудов ассоциировалась с поздними стадиями УМ с высоким риском метастазирования.

Продукция VEGF ЭК ассоциировалась с локализацией опухоли. Эндотелий изолированной меланомы радужки, цилиарного тела и юкстапапиллярной меланомы не секретировал этот цитокин. Количество VEGF⁺ эндотелиальных клеток резко возрастало при вовлечении в процесс преэкваatorialной зоны.

Гиперэкспрессия VEGF ЭК ассоциировалась с прогрессированием УМ по протяженности с вовлечением новых зон глаза в высоту, глубину, с инвазией склеры и выходом за пределы глаза, то есть с показателями, считавшимися прогностически неблагоприятными

и относящимися к клиническим факторам повышенного риска метастазирования (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Уvealная меланома относится к категории чрезвычайно агрессивных опухолей, метастазирующих исключительно гематогенным путем. А следовательно, кровеносные сосуды являются стратегически важными составляющими УМ. Однако к настоящему времени неизвестно, регулируется ли ангиогенез факторами окружающей среды, такими как ишемия, или генетическими механизмами. Кроме того, ангиогенез представляет научно-практический интерес в аспекте прогноза и антиангиогенного лечения УМ.

Лишь немногие работы освещают аспекты ангиогенеза УМ. Так, было установлено, что гипоксия индуцирует экспрессию HIF-1 α и VEGF-A в клеточных линиях УМ и культурах первичных опухолей *in vitro*, не влияя на пролиферацию. Экспрессия VEGF-A в первичных опухолях была вариабельной без какой-либо корреляции со специфическими гистологическими маркерами или прогнозом. Вместе с тем уровни VEGF-A в сыворотке крови пациентов с метастазами УМ превышали показатели больных без метастазов ($p < 0,001$). Авторы пришли к заключению, что экспрессия VEGF-A клетками УМ в основном контролируется гипоксией и включается триггером HIF-1 α , что указывает на важную роль окружения опухолевых клеток [19–20].

Во многих злокачественных опухолях гиперэкспрессия VEGF стимулирует развитие и поддержание достаточной сосудистой сети. Ангиогенез, управляемый VEGF, является обязательным не только для роста первичной опухоли, превысившей размеры, поддерживаемые простой диффузией питательных веществ

Кинетика интенсивности экспрессии VEGF в опухолевых и эндотелиальных клетках в УМ

Рис. 4. Кинетика интенсивности экспрессии VEGF на разных стадиях заболевания в клетках увеальной меланомы (синяя линия) и эндотелиальных клетках (оранжевая линия)

Fig. 4. The kinetics of the intensity of VEGF expression at different stages of the disease in the cells of uveal melanoma (blue line) and endothelial cells (orange line)

и кислорода (примерно 2–3 мм в диаметре опухоли), но также рассматривается как начальный подготовительный этап к отдаленным метастазам [21–23].

На связь гиперэкспрессии VEGF в УМ с наличием отдаленных метастазов указывают многие исследователи [20–22]. Экспериментально доказано несколькими исследованиями, что высокие концентрации VEGF в сыворотке коррелируют с повышенной частотой метастазов и плохой выживаемостью в мышинной модели УМ [24, 25]. Это указывает на возможную роль VEGF-A в формировании метастазов. Sheidow и соавт., наоборот, не обнаружили корреляции между иммунореактивностью VEGF в образцах УМ энуклеированных глаз и возникновением метастатического заболевания [23].

Проведенные нами исследования позволяют говорить, что VEGF является облигатным условием

Таблица 2. Корреляционная связь между экспрессией VEGF и клиническими, гистологическими показателями

Table 2. Correlation relationship between VEGF expression and clinical, histological indicators

Показатель / Index	Коэф. корреляции Спирмена, степень достоверности p / Coeff. Spirman's correlation, the degree of confidence in the p	
	интенсивность экспрессии VEGF / VEGF Expression Intensity	процент VEGF ⁺ клеток / percentage of VEGF cells
Экспрессия VEGF в эндотелии сосудов / VEGF expression in vascular endothelium		
Стадия УМ / Stage UM	$k = 0,47635, p < 0,01$	$k = 0,43981, p < 0,05$
Максимальный диаметр УМ / Maximum diameter of UM	$k = 0,53523, p < 0,001$	$k = 0,6234, p < 0,001$
Толщина УМ / The thickness of UM	$k = 0,53523, p < 0,001$	$k = 0,6234, p < 0,001$
Локализация УМ / Localization of UM	$k = 0,4832, p < 0,01$	$k = 0,5451, p < 0,01$
Клеточное строение / Cellular structure	$k = 0,2371, \text{н/д}$	$k = 0,2682, \text{н/д}$
Экспрессия VEGF в опухолевых клетках / VEGF expression in tumor cells		
Стадия УМ / Stage UM	$k = 0,27612, \text{н/д}$	$k = 0,23981, \text{н/д}$
Максимальный диаметр УМ / Maximum diameter of UM	$k = 0,53523, p < 0,001$	$k = 0,6234, p < 0,001$
Толщина УМ / The thickness of UM	$k = 0,7245, p < 0,001$	$k = 0,6823, p < 0,001$
Локализация УМ / Localization of UM	$k = 0,4832, p < 0,01$	$k = 0,5451, p < 0,01$
Клеточное строение / Cellular structure	$k = 0,6371, p < 0,001$	$k = 0,5822, p < 0,001$

развития и прогрессии УМ. Продуцентами молекулы VEGF в УМ являются две популяции клеток: эндотелиальные клетки сосудов и клетки УМ. Выявлены общие закономерности экспрессии VEGF: зафиксирована базовая продукция молекулы опухолевыми клетками и цикличность экспрессии эндотелием сосудов УМ. Цикличность интенсивности экспрессии VEGF, по-видимому, можно объяснить развитием областей гипоксии в зонах повышенной плотности опухолевых клеток в пролиферате УМ и достижением им определенной высоты. Уровень экспрессии VEGF, в свою очередь и отчасти, может отражать степень гипоксии опухолевого пролиферата. Пик VEGF-позитивных опухолевых клеток ассоциируется с начальными стадиями УМ, затем происходит снижение количества экспрессирующих клеток к стадии Т4. Популяция VEGF⁺ ЭК, напротив, подвержена динамичному росту численности, начиная со стадии Т2 до стадии Т4. На стадии Т4 численности популяций ОК и ЭК, экспрессирующих VEGF, уравниваются.

Между экспрессией VEGF в опухолевых клетках и ЭК сосудов, с одной стороны, и толщиной, диаметром, локализацией УМ — с другой, выявлена корреляционная прямая связь умеренной силы. Экспрессия VEGF в опухолевых клетках коррелировала с клеточным строением УМ, а экспрессия VEGF в ЭК коррелировала со стадией заболевания.

Представленные результаты не позволяют сделать заключение о роли VEGF в развитии дистантных метастазов. Это требует отдельного анализа, что является ограничением настоящей работы.

ВЫВОДЫ

Уvealная меланома — злокачественная опухоль, формирующая «ангиогенный фенотип» на базовом уровне (Т1) и экспрессирующая VEGF двумя популяциями клеток — опухолевыми и эндотелиальными.

Изучены и описаны общие закономерности экспрессии VEGF на разных стадиях заболевания.

Корреляционная связь экспрессии VEGF опухолевых клеток с клеточным строением УМ, а экспрессия VEGF в эндотелиальных клетках со стадией заболевания позволяют думать о важной роли этого феномена в метастазировании, однако этот аспект требует отдельного изучения.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ:

Лихванцева В.Г. — написание статьи, дизайн исследования, научное редактирование;
Анурова О.А. — выполнение исследований, сбор материала, интерпретация результатов;
Астахова С.Е. — сбор клинического материала, подготовка и анализ результатов;
Верецагина М.В. — сбор клинического материала, техническое редактирование, оформление библиографии;
Ованесян В.Э. — подготовка иллюстраций; сбор материала, статистический анализ данных;
Степанова Е.В. — непосредственное проведение исследования, интерпретация результатов, подготовка к публикации иллюстративного материала.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- 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.).]
- Карамышева А.Ф. Ангиогенез опухоли: механизмы, новые подходы. В кн.: Канцерогенез. Под ред. Д.Г. Заридзе. М.: Научный мир, 2000. [Karamysheva A.F. Tumor angiogenesis: mechanisms, new approaches. In the book: *Carcinogenesis*. Ed. by D.G. Zaridze. Moscow: Scientific World, 2000 (In Russ.).]
- 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 vascular tract of the eye. Moscow: The last word, 2003. 456 p. (In Russ.).]
- Лихтенштейн А.В., Шапот В.С. Опухолевый рост: ткани, клетки, молекулы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1998;3:25–44. [Lichtenstein 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.).]
- Козлов Д.В., Зорин Н.А., Голубев О. А. Вторичный ангиогенез — одно из звеньев становления и прогрессии рака молочной железы. *Архив патологии*. 1996;58(4):72–75. [Kozlov D.V., Zorin N.A., Golubev O.A. Secondary angiogenesis is one of the links in the formation and progression of breast cancer. *Archive of pathology = Arhiv patologii*. 1996;58(4):72–75 (In Russ.).]
- Ferrara N. and Dans-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Revs*. 1997;18(1):4–23. DOI: 10.1210/edrv.18.1.0287
- Melincovici C.S., Boşca A.B., Şuşman S., Mărginean M., Mihai C., Istrate M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) — key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455–467.
- Folberg R., Pe'er J., Gruman L.M. The morphologic 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
- 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
- Folberg R. Tumor progression in ocular melanomas. *J. Invest Dermatol*. 1993;100(3):326S–333S. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12470222
- Folberg R., Menaffey M., Gardner L.M. The microcirculation of choroidal and ciliary body melanomas. *Eye*. 1997;11(2):227–238. DOI: 10.1038/eye.1997.57
- Комолова Г.С., Рустамьян Ю.Л. Ангиогенин-индуцируемый ангиогенез как мишень в терапии опухолей. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 1998;61(5):81–84. [Komolova G.S., Rustam'yan Yu.L. Angiogenin-induced angiogenesis as a target in tumor therapy. *Experimental and Clinical Pharmacology = Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 1998;61(5):81–84 (In Russ.).]
- Копнин Б.П. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения. *Практическая онкология*. 2002;3(4):229–235. [Kopnin B.P. Neoplastic cell: basic properties and mechanisms of their occurrence. *Practical oncology = Prakticheskaya onkologiya*. 2002;3(4):229–235 (In Russ.).]
- Степанова Е.В. Антиангиогенная терапия: новые возможности лечения злокачественных заболеваний. *Практическая онкология*. 2002;3(4):246–252. [Stepanova E.V. Antiangiogenic therapy: new possibilities for the treatment of malignant diseases. *Practical oncology = Prakticheskaya onkologiya*. 2002;3(4):246–252 (In Russ.).]
- Brierley J., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. (eds.) TNM classification of malignant tumours, Eighth edition edn. Oxford, UK; Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, Inc; 2017.
- Garg G., Finger P.T., Kivelä T.T., Simpson E.R., Gallie B.L., Saakyan S. Patients presenting with metastases: stage IV uveal melanoma, an international study. *Br J Ophthalmol* 2021;0:1–8. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2020-317949
- Heegaard S., Jensen O.A., Prause J.U. Immunohistochemical diagnosis of malignant melanoma of the conjunctiva and uvea: comparison of the novel antibody against melan-A with S100 protein and HMB-45. *Melanoma Res*. 2000;10(4):350–354. DOI: 10.1097/00008390-200008000-00006
- Iwamoto S., Burrows R.C., Kalina R.E. Immunophenotypic differences between uveal and cutaneous melanomas. *Arch Ophthalmol* 2002;120(4):466–470 DOI: 10.1001/archophth.120.4.466
- Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist*. 2004;9(Suppl 1):2–10. DOI: 10.1634/theoncologist.9-suppl_1-2
- el Filali M., Missotten G.S.O.A., Maat W., Ly L.V., Luyten G.P.M., van der Velden P.A., Jager M.J. Regulation of VEGF-A in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(5):2329–2337. DOI: 10.1167/iovs.09-4739
- Boyd S.R., Tan D., Bunce C. Vascular endothelial growth factor is elevated in ocular fluids of eyes harbouring uveal melanoma: identification of a potential therapeutic window. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(4):448–452. DOI: 10.1136/bjo.86.4.448
- Missotten G.S., Notting I.C., Schlingemann R.O. Vascular endothelial growth factor in eyes with uveal melanoma. *Arch Ophthalmol*. 2006;124:1428–1434 DOI: 10.1001/archophth.124.10.1428
- Sheidow T.G., Hooper P.L., Crukley C., Young J., Heathcote J.G. Expression of vascular endothelial growth factor in uveal melanoma and its correlation with metastasis. *Br J Ophthalmol*. 2000;84:750–756. DOI: 10.1136/bjo.84.7.750

24. Claffey K.P., Brown L.F., del Aguila L.F. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Res.* 1996;56:172-181.

25. Frenkel B.V., Kalickman S., Pe'er J. VEGF as a biomarker for metastatic uveal melanoma in humans. *Curr Eye Res.* 2011;36(4):386-390. DOI: 10.3109/02713683.2010.534573

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

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 кафедры офтальмологии
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
Анурова Ольга Александровна
кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом отделения № 3 (онкопатология)
ул. Академика Опарина, 4, Москва, 117997, Российская Федерация

Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»
Астахова Светлана Евгеньевна
кандидат медицинских наук, кафедра офтальмологии
Волоколамское шоссе, 91, Москва, 125310, Российская Федерация

ГБУ «Детская городская поликлиника № 15» Департамента здравоохранения г. Москвы, Амбулаторно-поликлинический центр
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

Научно-исследовательский институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
Степанова Евгения Владиславовна,
доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории изучения механизмов ангиогенеза

ABOUT THE AUTHORS

Academy of Postgraduate Education of the Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of FMBA of Russia
Likhvantseva Vera G.
MD, Professor, department of ophthalmology
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

Academy of Postgraduate Education of the Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of FMBA of Russia
Astakhova Svetlana E.
PhD, department of ophthalmology
Volokolamskoe highway, 91, Moscow, 125371, Russian Federation

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

Yegoryev Central District Hospital
Ovanesian Vladimir E.
head of the department of ophthalmology
Shchukova Mountain, 19, Yegoryevsk, Moscow Region, 140304, Russian Federation

Research Institute of Experimental Diagnosis and Therapy of Tumors of National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin
Stepanova Evgenia V.
PhD, Professor, head of the laboratory for the study of angiogenesis mechanisms
Kashirskoye highway, 23, Moscow, 115478, Russian Federation