

Жидкостная биопсия при увеальной меланоме. Есть ли смысл?

В.Э. Ованесян¹В.Г. Лихванцева^{1,2}С.И. Рычкова³, С.А. Сельков⁴

¹ ФПК «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

² ФГБУ ГНЦ «Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна»
Федерального медико-биологического агентства
ул. Гамалеи, 15, Москва, 123098, Российская Федерация

³ Медико-биологический университет инноваций и непрерывного образования
ФГБУ ГНЦ РФ «Федеральный биофизический центр им. А.И. Бурназяна»
Федерального медико-биологического агентства
ул. Гамалеи, 15, Москва, 123098, Российская Федерация

⁴ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта»
Менделеевская линия, 3, Санкт-Петербург, 199034, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2022;19(3):594–602

Цель работы: изучить информативность и целесообразность жидкостной биопсии при увеальной меланоме (УМ). **Материалы и методы.** Выполняли жидкостную биопсию (синоним: биопсия стекловидной жидкости, СТЖ) энуклеированных глаз с УМ. Пробы СТЖ использовали для количественной оценки концентрации про-IL-8, angiogenin, TNF-α, VEGF, bFGF и антиангиогенных (IFN-α, TGF-β, IFN-γ) факторов роста методом мультиплексной проточной цитометрии, сравнивали с показателями пациентов с сенильной катарактой. **Результаты.** Жидкостная биопсия предоставила ценную и достоверную информацию о спектре цитокинов и их количественных показателях в СТЖ глаз с УМ. По сравнению с сенильной катарактой в СТЖ глаз с УМ имело место достоверное повышение частоты обнаружения уровня проангиогенных цитокинов TNF-α (80,0 % против 47,5 %, $p < 0,05$; Мср ± л: $4,3 \pm 1,1$ пг/мл против $1,4 \pm 0,3$ пг/мл, $p < 0,05$), ИЛ-8 (100 % против 75 %, $p < 0,01$; $323,2 \pm 227,9$ пг/мл против $8,5 \pm 1,5$ пг/мл, $p < 0,001$), ангиогенина ($11704,9 \pm 1767,7$ пг/мл против $2820,15 \pm 1404,90$ пг/мл, $p < 0,01$), VEGF (100,0 % против 68,2 %, $p < 0,05$; $471,49 \pm 154,60$ пг/мл против $18,4 \pm 3,2$ пг/мл, $p < 0,05$) и bFGF (60,0 % против 26,7 %, $p < 0,05$; Мср: $44,6 \pm 16,2$ против $2,7 \pm 1,0$, $p < 0,001$). В обеих группах больных не выявляли антиангиогенный фактор TGF-β, но концентрация ИФН-γ была обнаружена в пяти из девяти проб на уровне $14,9 \pm 12,2$ пг/мл, а уровни ИФН-α при УМ были в 4 раза выше: $17,6 \pm 3,9$ пг/мл против $4,4 \pm 0,4$ пг/мл ($p < 0,05$). **Заключение.** Жидкостная биопсия глаз с УМ при использовании мультиплексной проточной цитометрии может стать ценным и высокоинформативным инструментом для изучения фенотипов УМ, при разработке и выборе молекулярных мишеней антиангиогенной, иммунной или иной таргетной терапии. Повышенные уровни проангиогенных факторов роста (IL-8, ангиогенина, TNF-α, VEGF и bFGF), выявленные в СТЖ глаз с УМ, свидетельствуют о присутствии одновременно трех механизмов стимуляции ангиогенеза, два из которых не зависят от VEGF, действуют самостоятельно и независимо и могут проявлять синергизм. Недостаточно высокие уровни интерферонов (ИФН-γ и ИФН-α) на фоне отсутствия TGF-β в стекловидной жидкости позволяют думать о том, что подавлен контроль регуляции природного ангиостатического звена ангиогенеза на глазах с УМ. Высокие уровни цитокинов с плюрипотентными (проангиогенными и провоспалительными) свойствами свидетельствуют о том, что при опухолях хориоидеи воспаление может играть роль промотора ангиогенеза.

Ключевые слова: жидкостная биопсия, увеальная меланомы, факторы роста, стекловидная жидкость, ангиогенез

Для цитирования: Ованесян В.Э., Лихванцева В.Г., Рычкова С.И., Сельков С.А. Жидкостная биопсия при увеальной меланоме. Есть ли смысл? *Офтальмология*. 2022;19(3):594–602. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2022-3-594-602>

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

Конфликт интересов отсутствует



В.Э. Ованесян, В.Г. Лихванцева, С.И. Рычкова, С.А. Сельков

Контактная информация: Лихванцева Вера Геннадьевна likhvantseva-4@yandex.ru

Жидкостная биопсия при увеальной меланоме. Есть ли смысл?

Liquid Biopsy for Uveal Melanoma. Does It Make Sense?

V.E. Ovanesyan¹, V.G. Likhvantseva^{1,2}, S.I. Rychkova³, S.A. Selkov⁴

¹ Academy of Postgraduate Education of the Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of FMBA of Russia

Volokolamskoe highway, 91, Moscow, 125371, Russian Federation

² A.I. Burnazyan Federal Biophysical Center of FMBA of Russia

Gamalei str., 15, Moscow, 123098, Russian Federation

³ Burnazyan Medical-Biological University of Innovation and Continuing Education, Federal Medical-Biological Agency

Gamalei str., 15, Moscow, 123098, Russian Federation

⁴ Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproduction named after D.O. Ott

Mendeleevskaya Line, 3, St. Petersburg, 199034, Russian Federation

ABSTRACT

Ophthalmology in Russia. 2022;19(3):594–602

Purpose: to study the informativeness and appropriateness of liquid biopsy in uveal melanoma (UM). **Material and methods.** Performed a liquid biopsy (synonym: vitreous fluid biopsy, CST) of enucleated eyes with UM. CST samples were used to quantify the concentration of pro-(IL-8, angiogenin, TNF- α , VEGF, bFGF) and antiangiogenic (IFN- α , TGF- β , IFN- γ) growth factors by multiplex flow cytometry. Compared with the indicators of patients with senile cataracts. **Results.** Liquid biopsy provided valuable and reliable information about the spectrum of cytokines and their quantitative indicators in the CTZ of the eyes with UM. Compared with senile cataracts in the vitreous fluid of the eyes with UM, there was a significant increase in the frequency of detection and level of proangiogenic cytokines TNF- α (80.0 % vs. 47.5 %, $p < 0.05$; Msr $\pm$ m: 4.3 ± 1.1 pg/ml against 1.4 ± 0.3 pg/ml, $p < 0.05$), IL-8 (100 % vs. 75 %, $p < 0.01$; 323.2 ± 227.9 pg/ml versus 8.5 ± 1.5 pg/ml, $r < 0.001$), angiogenin (11704.9 ± 1767.7 pg/ml versus 2820.15 ± 1404.90 pg/ml, $r < 0.01$), VEGF (100.0 % vs. 68.2 %; $p < 0.05$; 471.49 ± 154.60 pg/ml vs. 18.4 ± 3.2 pg/ml, $p < 0.05$; 471.49 ± 154.60 pg/ml vs. 18.4 ± 3.2 pg/ml, $p < 0.05$) and bFGF (60.0 % vs. 26.7 %, $p < 0.05$; Msr: 44.6 ± 16.2 vs. 2.7 ± 1.0 , $p < 0.001$). In both groups of patients, the antiangiogenic factor TGF- β was not detected, but the concentration of IFN- γ was found in five of the eight samples at the level of 14.9 ± 12.2 pg/ml, and the levels of IFN were 4 times higher: 17.6 ± 3.9 pg/ml against 4.4 ± 0.4 pg/ml ($p < 0.05$). **Conclusions.** Liquid eye biopsy with UM using multiplex flow cytometry can be a valuable and highly informative tool for studying UM phenotypes, in the development and selection of molecular targets for antiangiogenic or other targeted therapies. Elevated levels of proangiogenic growth factors (IL-8, angiogenin, TNF- α , VEGF and bFGF) in vitreous fluid in UM indicate the presence simultaneously of three mechanisms for stimulating angiogenesis, two of which are independent of VEGF, act independently, and may show synergism. Insufficiently high levels of interferons (IFN- γ and IFN- α) against the background of the absence of TGF- β in the vitreous fluid allow us to think that the secretion and control of the regulation of the natural angiostatic link of angiogenesis in the eyes with choroidal melanoma is suppressed. High levels of cytokines with pluripotent (proangiogenic and pro-inflammatory) properties indicate that in choroidal tumors, inflammation may play the role of a promoter of angiogenesis.

Keywords: liquid eye biopsy, uveal melanoma, growth factors, vitreous fluid, angiogenesis

For citation: Ovanesyan V.E., Likhvantseva V.G., Rychkova S.I., Selkov S.A. Liquid Biopsy for Uveal Melanoma. Does It Make Sense? *Ophthalmology in Russia*. 2022;19(3):594–602. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2022-3-594-602>

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

There is no conflict of interests

АКТУАЛЬНОСТЬ

Уvealная меланома — одна из самых злокачественных опухолей человека. Избирательная органотропность в выборе органов инвазии и исключительно гематогенный путь метастазирования этой опухоли в комплексе с чрезвычайно высокой скоростью метастазирования заставляют искать все новые мишени и пути для таргетной терапии [1–4]. Высокая зависимость прогноза с развитием собственной сосудистой сети опухоли обосновывает необходимость изучения особенностей молекулярного ангиогенеза, который, как известно, контролируется и регулируется широким спектром про- и антиангиогенных факторов [5, 6]. В этом аспекте стекловидная жидкость (СТЖ) — один из ценных информативных объектов для изучения опухолевого ангиогенеза и поиска подходов к будущим фармацевтическим стратегиям [7–10]. До недавнего времени было невозможно определить в небольшом количестве стекловидной жидкости (50 мкл) одновременно несколько факторов роста.

Однако эта проблема разрешилась с изобретением мультиплексной проточной цитометрии.

Цель: изучить информативность и целесообразность жидкостной биопсии при увеальной меланоме (УМ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили 9 глаз с увеальной меланомой (УМ, стадия $T_4N_0M_0$), энуклеированные по причине невозможности выполнения органосохранного лечения. Ни на одном из глаз с УМ не было проведено лечение до энуклеации. Диагноз верифицировали методами визометрии, периметрии, биомикроскопии, офтальмоскопии, УЗИ. На этапе первичной диагностики все больные УМ обследовались у онколога (УЗИ/КТ/МРТ/ПЭТ-КТ) для исключения генерализации опухолевого процесса. Стадию опухоли определяли согласно классификации AJCC (8th Edition, 2017) [11].

Группой сопоставления служили глаза с сенильной катарактой ($n = 38$).

V.E. Ovanesyan, V.G. Likhvantseva, S.I. Rychkova, S.A. Selkov

Contact information: Likhvantseva Vera G. likhvantseva-4@yandex.ru

Liquid Biopsy for Uveal Melanoma. Does It Make Sense?

Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБУ ГНЦ Федерального медицинского биофизического центра им. А.И. Бурназяна. У всех пациентов получено информированное согласие на проведение операции и биопсию стекловидного тела, а также использование данных исследования в научных целях.

Стекловидную жидкость забирали до проведения факоэмульсификации катаракты во избежание ятрогенных эффектов, влияющих на состав СТЖ.

В образцах СТЖ больных определяли концентрацию 8 ключевых цитокинов и ростовых факторов, потенциально участвующих в опухолевом ангиогенезе. Использовали тест-систему BD Cytometric Bead Array (BD, США) и восьмицветный проточный цитофлуориметр FACS Canto II (Beckton Dickinson, США). Технология BD Cytometric Bead Array (CBA) позволяет точно и быстро обнаружить большой спектр активных веществ в одном образце биологической жидкости малого объема — 50 мкл. Концентрацию цитокинов определяли методом мультиплексной проточной цитометрии с помощью бус, покрытых антителами к цитокинам IL-8, angiogenin, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , VEGF, bFGF, TGF- β в соответствии с инструкцией производителя (BD, США).

Для оценки положения бус использовали флуоресцентные красители APC и APC-Cy7, концентрацию антигена оценивали по интенсивности флуоресценции по каналу красителя PE. В основе метода лежит иммунная реакция антигена (АГ) с антителом (АТ). Микрочастицы определенной интенсивности флуоресценции имеют на своей поверхности АТ к определенному АГ. После инкубации биологического материала с микрочастицами проводят инкубацию с проявляющими АТ. При проведении проточной цитометрии исследуемых образцов происходит разделение специфичных биологически активных веществ, связанных с микрочастицами с дискретной флуоресценцией по трем каналам флуоресценции. Во избежание перекрытия бус по размерам, цитокины были сгруппированы следующим образом:

1. IL-8 (бусы A9), TNF- α (бусы C4), IFN- α бусы (B8)
2. VEGF (бусы B8), bFGF (бусы C5), angiogenin (бусы C4)
3. IFN- γ (бусы B8)
4. TGF- β (бусы B6)

Первая панель — анализ содержания IL-8 (A9), TNF- α (C4), IFN- α (B8):

Измерение проводили на восьмицветном проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Beckton Dickinson, США). Данные по прямому и боковому светорассеянию исследуемых бус отражались на двумерной гистограмме FSC/SSC (рис. 1), полученной с монитора цитофлуориметра. Затем выделяли облако бус гейтом P7, а затем события из гейта P7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (рис. 2). В каждом гейте замеряли интенсивность флуоресценции по каналу PE и определяли концентрацию цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

Вторая панель — анализ содержания VEGF (B8), bFGF (C5), angiogenin (C4):

Данные по прямому и боковому светорассеянию исследуемых бус отражали на двумерной гистограмме FSC/SSC (рис. 3). Выделяли облако бус гейтом P7, а затем события из гейта P7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (рис. 4). В каждом гейте замеряли интенсивность флуоресценции по каналу PE для определения концентрации цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

Третья панель — анализ содержания IFN- γ (B8):

Данные по прямому и боковому светорассеянию исследуемых бус отражали на двумерной гистограмме FSC/SSC (рис. 5). Затем выделяли облако бус гейтом P7, а после события из гейта P7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (рис. 6). В каждом гейте замеряли интенсивность флуоресценции по каналу PE для определения концентрации цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

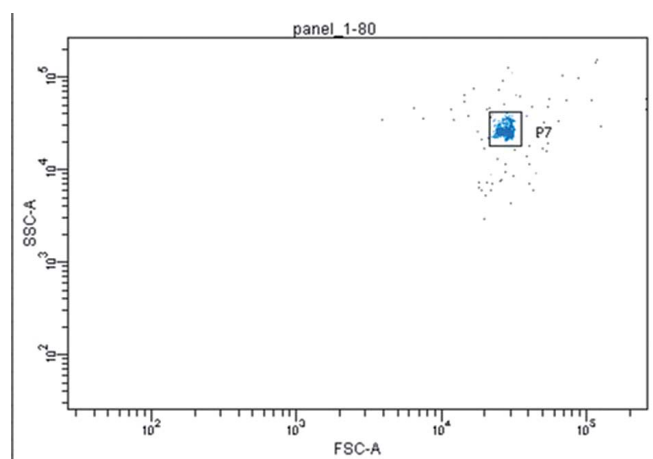


Рис. 1. Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

Fig. 1. Two-dimensional histogram in FSC/SSC coordinates

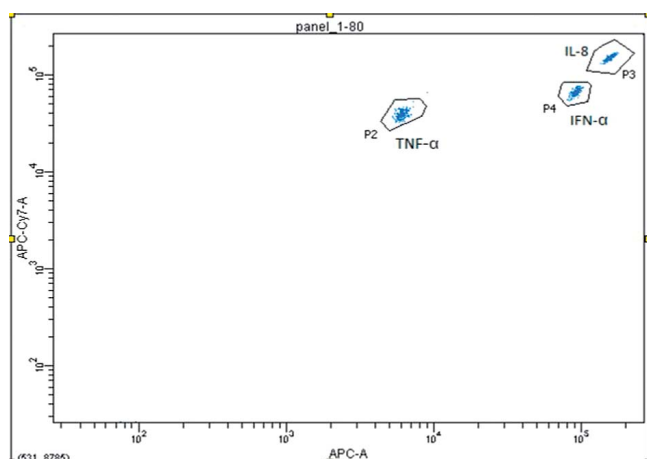


Рис. 2. Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7

Fig. 2. Distribution of beads from gate P7 in coordinates APC/APC-Cy7

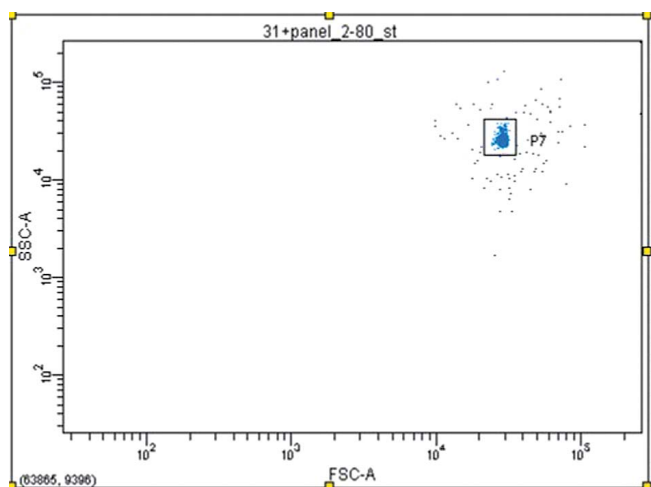


Рис. 3. Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

Fig. 3. Two-dimensional histogram in FSC/SSC coordinates

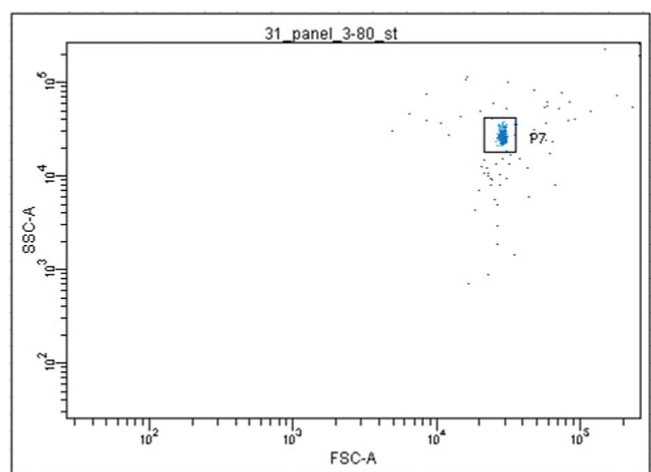


Рис. 5. Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

Fig. 5. Two-dimensional histogram in FSC/SSC coordinates

Четвертая панель — анализ содержания TGF- β (B6):

Данные по прямому и боковому светорассеянию исследуемых бус отражали на двумерной гистограмме FSC/SSC (рис. 7). Затем выделяли облако бус гейтом P7, а затем события из гейта P7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (рис. 8). В каждом гейте измеряли интенсивность флуоресценции по каналу PE для определения концентрации цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

Исследования выполняли в лаборатории клинической иммунологии учреждения Российской академии медицинских наук НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта Северо-Западного отделения РАМН (рук. — проф. Сельков С.А.).

Статистический анализ полученных данных проводили при помощи компьютерной программы SPSS. Для сравнения показателей в разных группах пациентов использовали непараметрический критерий Манна — Уитни (U-test).

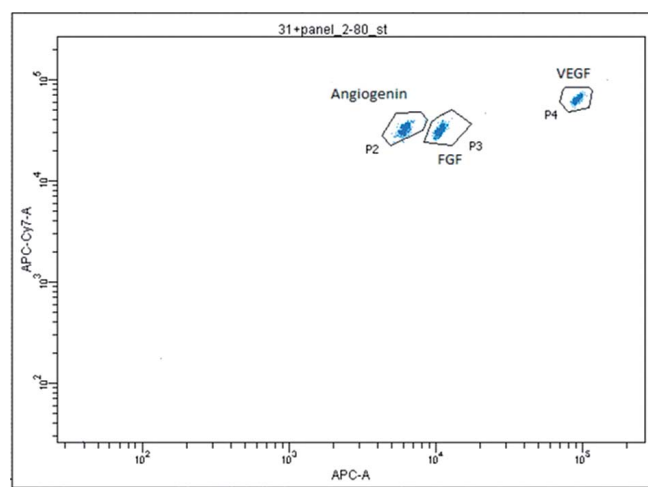


Рис. 4. Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7. Вторая панель

Fig. 4. Distribution of beads from gate P7 in coordinates APC/APC-Cy7. Second panel

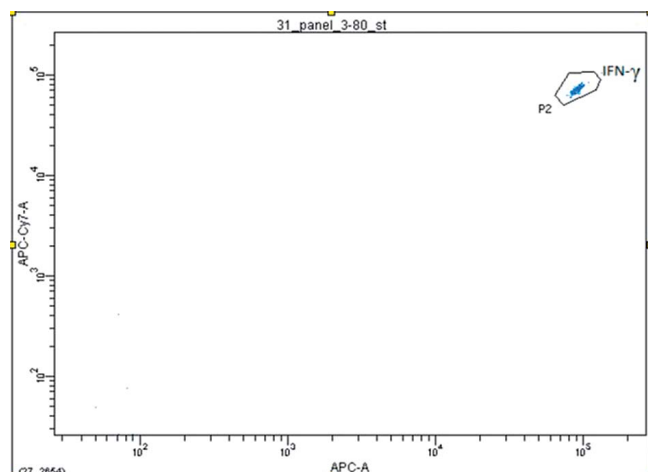


Рис. 6. Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7

Fig. 6. Distribution of beads from gate P7 in coordinates APC/APC-Cy7

РЕЗУЛЬТАТЫ

Было установлено, что в стекловидной жидкости глаз с УМ, по сравнению с сенильной катарактой, достоверно чаще и на более высоком уровне выявлялись проангиогенные цитокины TNF- α (80,0 % против 47,5 %, $p < 0,05$; $M_{cp} \pm m$: $4,3 \pm 1,1$ пг/мл против $1,4 \pm 0,3$ пг/мл, $p < 0,05$; табл. 1, рис. 9), ИЛ-8 (100 % против 75 %, $p < 0,01$; $323,2 \pm 227,9$ пг/мл против $8,5 \pm 1,5$ пг/мл, $p < 0,001$; рис. 10), ангиогенин ($11704,9 \pm 1767,7$ пг/мл против $2820,2 \pm 1404,9$ пг/мл, $p < 0,01$; рис. 11), VEGF (100,0 % против 68,2 %; $p < 0,05$; $471,5 \pm 154,6$ пг/мл против $18,4 \pm 3,2$ пг/мл, $p < 0,001$; рис. 12) и bFGF (60,0 % против 26,7 %, $p < 0,05$; M_{cp} : $44,6 \pm 16,2$ против $2,7 \pm 1,0$, $p < 0,001$; табл. 1, рис. 13). В обеих группах больных в СТЖ не выявляли антиангиогенный фактор TGF- β , однако ИФН- γ был обнаружен в пяти из девяти проб на уровне $14,9 \pm 12,2$ пг/мл, а уровни ИФН- α были в 4 раза выше: $17,6 \pm 3,9$ пг/мл против $4,4 \pm 0,4$ пг/мл ($p < 0,05$) (табл. 1).

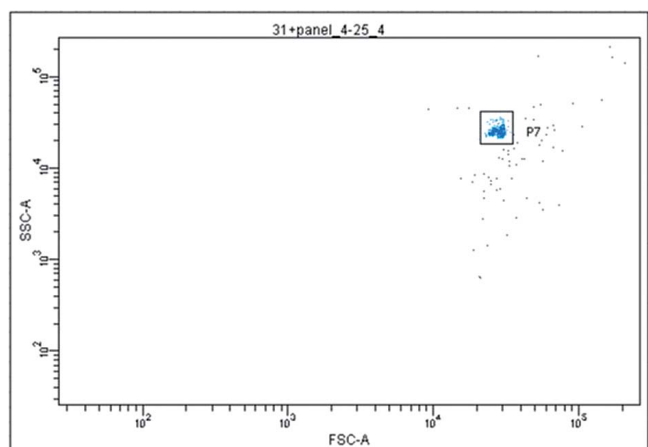


Рис. 7. Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

Fig. 7. Two-dimensional histogram in FSC/SSC coordinates

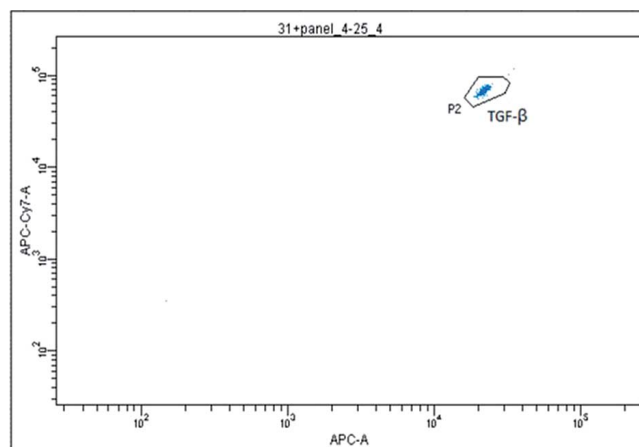


Рис. 8. Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7

Fig. 8. Distribution of beads from gate P7 in coordinates APC/APC-Cy7

Таблица 1. Концентрация факторов роста в стекловидной жидкости при увеальной меланоме

Table 1. Concentration of growth factors in vitreous fluid in uveal melanoma

Нозологическая группа / Nosological group	Показатели	Концентрация, пг/мл / Concentration, pg/ml							
		TNF	IFN-α	IL-8	Angiogenin	VEGF	bFGF	IFN-γ	TGF-β
Увеальная меланوما / Uveal melanoma (n = 9)	Средние $M \pm m$	4,3 ± 1,1*	17,6 ± 3,9**	323,2 ± 227,9***	11704,9 ± 1767,7***	471,5 ± 154,7***	44,6 ± 16,3***	14,9 ± 5,4	-
	Станд. отклонение (σ)	2,4	8,8	501,4	3959,6	346,5	36,4	12,2	-
	Me [Q1; Q3]	5,8 [Q1 = 1,6; Q3 = 6,2]	24,0 [Q1 = 6,8; Q3 = 25,2]	76,0 [Q1 = 30,5; Q3 = 739,5]	10129,8 [Q1 = 8278,8; Q3 = 15918,7]	287,0 [Q1 = 193,2; Q3 = 842]	70,8 [Q1 = 0; Q3 = 76]	-	-
	Коридор значений	3,1–6,3	6,8–25,2	15,4–1321,6	8147,3–18 824,5	143,3–1098,8	0,0–78,8	0,0–25,1	-
	Частота выявления	80 %	83 %	100 %	100 %	100 %	60 %	60 %	0,0 %
Катаракта / Cataract (n = 38)	Средние $M \pm m$	1,4 ± 0,3	4,4 ± 0,4	8,5 ± 1,5	2820,2 ± 319,3	18,4 ± 3,2	2,7 ± 1,1	-	-
	Станд. отклонение (σ)	1,4	1,8	6,7	1404,9	14,2	4,6	-	-
	Me [Q1; Q3]	0,9 [Q1 = 0; Q3 = 2,7]	4,8 [Q1 = 3,8; Q3 = 5,3]	6,9 [Q1 = 4,4; Q3 = 10,1]	2471,1 [Q1 = 1549,6; Q3 = 3855,4]	17,8 [Q1 = 5,4; Q3 = 30,2]	9,3 [Q1 = 0,0; Q3 = 9,3]	-	-
	Коридор значений	0,0–3,3	0,0–6,8	0,0–27,7	848,4–6194,6	0,0–36,7	0,0–11,4	-	0,0–206,3
	Частота выявления	47,5 %	74,3 %	74,3 %	100 %	68,2 %	26,7 %	-	5,3 %

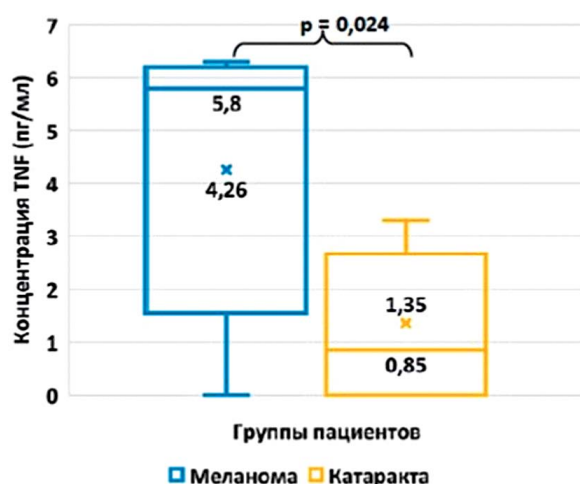
Примечание: * — достоверность различий от катаракты, $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.Note: * — is the confidence of the differences from group cataract, $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.

Рис. 9. Диаграмма сравнения концентраций TNF при УМ и катаракте

Fig. 9. Diagram comparing TNF concentrations in UM and cataracts



Рис. 10. Диаграмма сравнения концентраций IL-8 при УМ и катаракте

Fig. 10. Diagram comparing IL-8 concentrations in UM and cataracts

В.Э. Ованесян, В.Г. Лихванцева, С.И. Рычкова, С.А. Сельков

Контактная информация: Лихванцева Вера Геннадьевна likhvantseva-4@yandex.ru

Жидкостная биопсия при увеальной меланоме. Есть ли смысл?

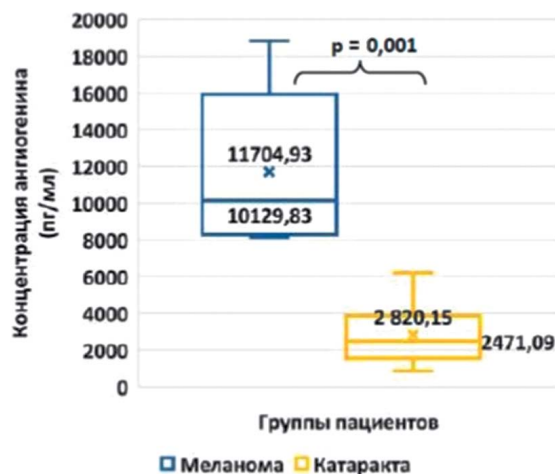


Рис. 11. Диаграмма сравнения концентраций ангиогенина при УМ и катаракте

Fig. 11. Diagram comparing angiogenin concentrations in UM and cataracts

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время мы, как нам кажется, немало знаем про увеальную меланому. Накоплен огромный опыт мирового сообщества офтальмоонкологов. Расширились наши представления о биологии опухоли [5], генетике [12] и их связи с прогнозом [5, 12]. Изучены многие клинические, молекулярные и генетические факторы риска прогрессирования УМ [13]. Вся эта информация нашла отражение в новой классификации AJCC, (8th Edition, 2017) и новых Федеральных рекомендациях по лечению УМ [11]. В нашем распоряжении появились новые инструменты для ранней диагностики УМ (ОКТ и ОКТА) [14] и новые технологии лечения, включая иммунные препараты [15]. Мы хорошо удерживаем локальный контроль УМ [16]. Что это нам дало?

К сожалению, общая тенденция к удлинению выживаемости после диагностики разных типов рака [14, 15] не распространилась на УМ. Так, в период с 1973 по 2009 год, когда данные были стратифицированы по годам постановки диагноза, существенных различий в общей выживаемости не наблюдалось. Пятилетняя относительная выживаемость пациентов с УМ составила 68,9 % [16], 81,6 % [3] и 81,4 % [17] для случаев, диагностированных в Европе (1983–1994 гг.), США (1973–2008 гг.) и Западной Австралии (1981–2005 гг.) соответственно. Таким образом, УМ относится к немногим видам рака со стабильными или растущими показателями смертности в течение последних 40 лет. Прогноз метастатической стадии УМ остается по-прежнему мрачным, со средней общей выживаемостью (ОС) менее года в большинстве случаев [1, 17, 18]. Все это отражает отсутствие нынешних эффективных системных стратегий [1, 19, 20]. Вместе с тем следует отметить появившиеся в базах данных единичные случаи удлинения продолжительности жизни больных с метастазированием

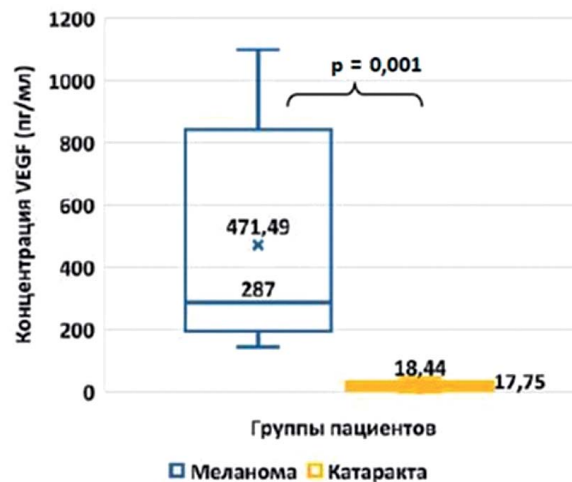


Рис. 12. Диаграмма сравнения концентраций VEGF при УМ и катаракте

Fig. 12. Diagram comparing VEGF concentrations in UM and cataracts

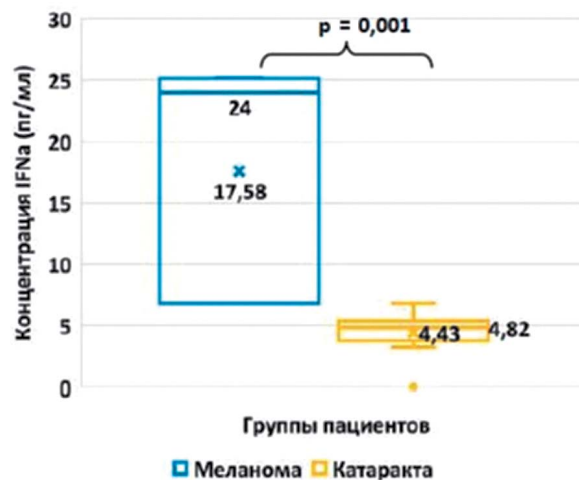


Рис. 13. Диаграмма сравнения концентраций IFN-α при УМ и катаракте

Fig. 13. Diagram comparing IFN-α concentrations in UM and cataracts

УМ на фоне иммунотерапии. Описаны случаи двухлетней выживаемости [21].

Известно, что стратегии иммунотерапии развивались на фоне изучения механизмов иммунного надзора в глазу. Глаз в процессе эволюции создал мощную многоуровневую систему для защиты органа зрения от потока чужеродных антигенов. В глазу работает несколько феноменов иммунной привилегии. Предположительно, клетки УМ используют аналогичные процессы, чтобы избежать иммунного надзора. Что касается врожденного иммунитета, то продукция фактора ингибирования макрофагов (MIF) и TGF-β, добавленная к положительной регуляции МНС класса I, подавляет действие естественных клеток-киллеров (NK). Клетки УМ продуцируют цитокины, такие как IL-6 и IL-10, которые

способствуют дифференцировке макрофагов до подтипа M2, которые способствуют росту опухоли вместо эффективного иммунного ответа. Клетки УМ также нарушают адаптивный иммунный ответ за счет выработки индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), сверхэкспрессии лиганда запрограммированной смерти-1 (PD-L1), изменения экспрессии FasL и устойчивости к перфорину. Этот биологический фон предполагает, что иммунотерапия может быть эффективной в борьбе с УМ только при учете ее иммунного фенотипа [22].

В этом аспекте жидкостная биопсия глаз с УМ с количественным анализом одновременно нескольких стратегически важных иммунных молекул представляется ценным инструментом для сбора информации.

Глаз считается иммунопривилегированным органом; он обладает уникальной способностью защищаться от неконтролируемого воспаления, которое может повредить зрительные функции. Эта иммунная привилегия влияет на иммунный ответ против клеток УМ и обеспечивает механизмы ее ускользания от иммунной системы [23].

Различные факторы играют роль в иммунной привилегии глаза. Например, влага передней камеры богата иммуносупрессивными белками, такими как трансформирующий фактор роста β (TGF- β), вазоактивный кишечный пептид (VIP), α -меланоцит-стимулирующий гормон (α -MSH) и регуляторные белки системы комплемента (CRP). Гематоофтальмический барьер ограничивает доступ воспалительных клеток к глазу. Клетки тканей глаза снижают экспрессию основного комплекса гистосовместимости (MHC) класса Ia во избежание цитотоксических опосредованных реакций лизиса; и, наконец, они экспрессируют PD-L1, который ингибирует Т-клеточно-опосредованную реакцию [24].

Ингибирование иммунного ответа не ограничивается только глазом, и с помощью процесса, называемого переднекамерным иммунным отклонением (ACAID), активные иммунокомпетентные клетки взаимодействуют с иммунной системой, вызывая необычное подавление системного иммунного ответа на появление антигена (АГ) в передней камере. Глаз, тимус, селезенка и симпатическая нервная система также участвуют в ACAID [24]. Цель состоит в том, чтобы смягчить воспаление против АГ, представленных в глазу. Такой «сценарий» представляется эволюционной адаптацией для предотвращения потери зрения.

Теория иммуноредактирования объясняет, как опухоли модифицируют себя и свое микроокружение для того, чтобы уклониться от разрушения иммунными клетками и выжить [25]. Другими словами, иммуноредактирование состоит в изменении иммуногенности опухоли из-за противоопухолевого ответа иммунной системы, в результате этого происходит модификация микроокружения опухоли и появление иммунорезистентных типов опухоли. Механизмы иммунного ускользания, используемые раковыми клетками, могут сильно различаться

от опухоли к опухоли [26, 27], и есть убедительные доказательства того, что клетки УМ имитируют механизмы, позволяющие нормальным клеткам поддерживать свою иммунопривилегированность в глазу, и активно используют их, причем не только в глазу, но и в местах метастазирования [28]. Недавно было выявлено существование четырех различных типов моделей взаимодействия опухоли с ее микроокружением на основе наличия или отсутствия инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) и экспрессии PD-L1 — лиганда запрограммированной смерти 1. Ниже представлено описание типов этих моделей по Teng et al. [28]:

Тип I	PD-L1 +	TIL +	Встречается при кожной меланоме; считается, что этот тип в значительной степени реагирует на блокаду контрольно-пропускных пунктов
Тип II	PD-L1 -	TIL -	Иммунная реакция микроокружения отсутствует. Блокада контрольно-регуляторных точек одним агентом не будет успешной из-за отсутствия предсуществовавших Т-клеточных инфильтратов
Тип III	PD-L1 +	TIL -	PD-L1 экспрессируется конститутивно на раковых клетках посредством онкогенной сигнализации; приближен к типу II
Тип IV	PD-L1 -	TIL -	Иммуноустойчивое микроокружение опухоли; альтернативные супрессивные пути могут быть доминирующими

Иммунотерапия оказалась чрезвычайно эффективной при лечении нескольких видов опухолей [26, 27]. Чтобы достичь максимального эффекта терапии, крайне важно иметь более глубокое понимание взаимодействия между иммунной системой и раковыми клетками.

Заметим, некоторые шаги уже предприняты в этом направлении. Так, проанализирован широкий спектр цитокинов в передней камере и продемонстрированы повышенные их концентрации в водянистой влаге глаз с УМ [7–10]. Однако большинство УМ возникает в хориоиде и контактирует со СТЖ. Более того, в отличие от водянистой влаги, которая постоянно замещается и пополняется в результате продукции цилиарным телом, СТЖ более консервативна по составу и, таким образом, может лучше отражать состояние проблемы взаимодействия с УМ. Заметим, только единичные работы такого плана проведены при УМ [29].

Наше исследование носило научно-практический характер; его целью стало изучение восьми стратегически важных цитокинов, контролирующих процессы пролиферации (IFN- α и IFN- γ), воспаления (TNF- α , IL-8, bFGF) и ангиогенеза (VEGF, ангиогенин, TGF- β). Функция ангиогенеза в той или иной мере присутствует у всех восьми цитокинов и носит дозозависимый характер) в опухолях. Попутно мы оценивали информативность жидкостной биопсии в тандеме с мультиплексной проточной цитометрией и иммуногистохимическим анализом (в потенциале) как инструмента верификации модели типа УМ (см. выше) и обоснования подходов к иммунотерапии УМ.

Нами было установлено, что по сравнению с контрольными глазами (глаза с сенильной катарактой) глаза с УМ демонстрируют высокие концентрации в СТЖ ключевых медиаторов воспаления. Многократное

повышение провоспалительных цитокинов ИЛ-8 ($\approx$ в 35 раз) и bFGF ($\approx$ в 20 раз) позволяет думать о том, что воспаление при УМ может играть роль индуктора ангиогенеза и промотора прогрессирования. Однако эта гипотеза нуждается в дополнительном исследовании.

Связь между раком и воспалением была описана еще Вирховом в 1863 году, и с тех пор этот факт ни у кого не вызывает сомнения [30, 31]. Клинически и экспериментально было доказано, что хроническое воспаление усиливает рост, инвазию и метастазирование опухолей. Более того, воспаление признано официальной третьей мишенью для таргетной терапии, наряду с опухолевой популяцией и ее ангиогенезом [31].

В СТЖ мы также определяли уровни наиболее значимых факторов роста ангиогенеза. Было обнаружено, что на глазах с УМ присутствуют высокие концентрации не только ключевого фактора, запускающего ангиогенез — VEGF, уровень которого в 20 раз превышал аналогичные показатели на глазах с катарактой, но и 4-кратное повышение ангиогенина. Ангиогенез, или рост новых кровеносных сосудов из ранее существовавшего сосудистого русла, лежит в основе роста и прогрессирования опухоли и, как полагают, является следствием дисбаланса про- и антиангиогенных стимулов. УМ связана с проангиогенными факторами роста, такими как VEGF и bFGF. Ранее полагали, что VEGF отсутствуют в ткани собственно меланомы [32, 33] в то время как bFGF, напротив, экспрессируется [34]. Однако ранее мы уже продемонстрировали факт иммуногистохимической экспрессии VEGF собственно опухолевыми и эндотелиальными клетками сосудов хориоидеи [35]. Полагаем, что выявленный нами факт объясняет высокие концентрации этого фактора роста в СТЖ.

В целом мы пришли к заключению, что жидкостная биопсия глаз в тандеме с инновационной мультиплексной проточной цитометрией как метод количественного определения одновременно нескольких молекул в небольшом объекте (50 мкл) является хорошим и информативным инструментом для диагностики и верификации модели опухолевого взаимодействия

с микроокружением. В перспективе это может стать существенным подспорьем при выработке стратегии лечения метастазирующих форм и выборе иммунотерапии. В перспективе иммунотерапия метастазирующих форм УМ — многообещающая технология при условии грамотного подхода к выбору препарата. В этом аспекте диагностика персонифицированного типа УМ в соответствии с представленной классификацией позволяет более грамотно подойти к иммунотерапии больных с метастазирующей стадией заболевания.

ВЫВОДЫ

Жидкостная биопсия глаз с УМ при использовании мультиплексной проточной цитометрии может стать ценным и высокоинформативным инструментом для изучения фенотипов УМ при разработке и выборе молекулярных мишеней антиангиогенной, иммунной или иной таргетной терапии.

Повышенные уровни проангиогенных факторов роста (IL-8, ангиогенина, TNF- α , VEGF и bFGF) в стекловидной жидкости при меланоме хориоидеи свидетельствуют о присутствии одновременно трех механизмов регуляции ангиогенеза, два из которых не зависят от VEGF, действуют самостоятельно и независимо и могут проявлять синергизм.

Недостаточно высокие уровни интерферонов (ИФН- γ и ИФН- α) на фоне отсутствия TGF- β в стекловидной жидкости позволяют думать о том, что подавлена секреция и контроль регуляции природного ангиостатического механизма ангиогенеза на глазах с меланомой хориоидеи.

Высокие уровни цитокинов с комплексными проангиогенными и провоспалительными свойствами свидетельствуют о том, что при опухолях хориоидеи воспаление может играть роль промотора ангиогенеза. И этот феномен нуждается в учете стратегии лечения.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ:

Ованесян В.Э. — сбор материала, написание статьи;
Лихвантсева В.Г. — планирование дизайна исследования, редактирование текста;
Рычкова С.И. — статистический анализ результатов, подготовка графиков, библиография;
Сельков С.А. — контроль выполнения и сбор данных лабораторных исследований, участие в расшифровке результатов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Yang J., Manson D.K., Marr B.P., Carvajal R.D. Treatment of uveal melanoma: Where are we now? *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2018;10:1–17. DOI: 10.1177/1758834018757175
- Aronow M.E., Topham K., Singh A.D. Uveal Melanoma: 5-Year Update on Incidence, Treatment, and Survival (SEER 1973–2013). *Ocul. Oncol. Pathol.* 2018;4:145–151. DOI: 10.1159/000480640
- Singh A.D., Turell M.E., Topham A.K. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology* 2011;118(9):1881–1885. DOI: 10.1016/j.optha.2011.01.040
- Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Захарова Г.П., Гарри Д., Выживаемость пациентов с меланомой малых и средних размеров. *Эффективная фармакотерапия.* 2020;16:(21):18–22. [Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Zaharova G.P., Garri D. Survival of patients with small to medium-sized melanoma. *Effective pharmacotherapy = Effektivnaya farmakoterapiya.* 2020;16:(21):18–22 (In Russ)]. DOI: 10.33978/2307-3586-2020-16-21-18-22
- Amaro A., Gangemi R., Piaggio F., Angelini G., Barisione G., Ferrini S., Pfeffer U. The biology of uveal melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2017;36:109–140. DOI: 10.1007/s10555-017-9663-3
- Castet F., Garcia-Mulero S., Sanz-Pamplona R., Cuellar A., Casanovas O., Caminal J.-M., Piulats J.-M. Uveal Melanoma, Angiogenesis and Immunotherapy, Is There Any Hope? *Cancers.* 2019;11:834. DOI: 10.3390/cancers11060834
- Asencio-Duran M., Dabad-Moreno J.V., Vicandi-Plaza B., Manzano-Muñoz B., Capote-Diez M., Amorena-Santisteban G. The Vitreous Body and Its Role in the Diagnosis of Eye Pathologies Medical Research Archives. 2021;9(9):2–24. DOI: 10.18103/mra.v9i9.2543
- Lee C.S., Jun I.H., Kim T.I., Byeon S.H., Koh H.J., Lee S.C. Expression of 12 cytokines in aqueous humour of uveal melanoma before and after combined ruthenium-106 brachytherapy and transpupillary thermotherapy. *Acta Ophthalmol.* 2012;90:e314–e320. DOI: 10.1167/iov.12-10123
- Ly L.V., Bronkhorst I.H., van Beelen E. Inflammatory cytokines in eyes with uveal melanoma and relation with macrophage infiltration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:5445–5451. DOI: 10.1167/iov.10-5526
- Nagarkatti-Gude N., Bronkhorst I.H.G., van Duinen S.G., Luyten G.P.M., rtine J. Jager M.J. Cytokines and Chemokines in the Vitreous Fluid of Eyes with Uveal Melanoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2012;53:6748–6755. DOI: 10.1167/iov.12-10123
- Kivela T., Simpson E.R., Grossniklaus H.E., Jager M.J., Sough A.D., Caminal J.M. Uveal melanoma. In: AJCC Cancer Staging Manual, 8th. New York, Springer: 2017. P. 805–817.
- Shain H., Bagger M.M., Yu R., Chang D., Liu Sh., Vemula S., Weier J.F., Wadt K., Heegaard S., Bastian B.S., Kiilgaard J.F. The genetic evolution of metastatic uveal melanoma. *Nature Genetics.* 2019;51:1123–1130. DOI: 10.1038/s41588-019-0440-9

13. Kaliki S., Shields C.L., Shields J.A. Uveal melanoma: Estimating prognosis Indian Journal of *Ophthalmology*. 2017;63(2):93–101. DOI: 10.4103/0301-4738.154367
14. 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 the vascular network of choroidal melanoma. *Ophthalmology in Russia = Oftalmologiya*. 2020;17(2):172–180 (In Russ.)]. DOI: 10.18008/1816-5095-2020-2-172-180
15. Гришина Е.Е. Анализ выживаемости больных увеальной меланомой при органосохранном и ликвидационном лечении. *Альманах клинической медицины* 2018;46(1):68–75. [Grishina E.E. Analysis of survival of patients with uveal melanoma in organ-preserving and liquidation treatment. *Almanac of Clinical Medicine = Almanah klinicheskoy meditsiny*. 2018;46(1):68–75 (In Russ.)]. DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-1-68-75
16. Virgili G., Gatta G., Ciccolallo L., Capocaccia R., Biggeri A., Crocetti E. Survival in patients with uveal melanoma in Europe. *Archives of Ophthalmology*. 2008;126(10):1413–1418. DOI: 10.1001/archophth.126.10.1413
17. Chew A.L., Spilsbury K., Isaacs T.W. Survival from uveal melanoma in Western Australia 1981–2005. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2015;43(5):422–428. DOI: 10.1111/ceo.12490
18. De Angelis R., Sant M., Coleman M.P., Francisci S., Bail P., Pierannunzio D., Trama A. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EURO-CARE-5 — a population-based study. *The Lancet Oncology*. 2014;15(1):23–34. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70546-1
19. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: Cancer Journal for Clinicians*. 2016;66(1):7–30. DOI: 10.3322/caac.21332
20. Kuk D., Shoushtari A., Barker C., Panageas K., Munhoz R., Momtaz P., Ariyan C., Brady M., Coit D., Bogatch K. Prognosis of Mucosal, Uveal, Acral, Nonacral Cutaneous, and Unknown Primary Melanoma from the Time of First Metastasis. *Oncologist*. 2016;21:848–854. DOI: 10.1634/theoncologist.2015-0522
21. Pons F., Plana M., Caminal J.M., Pera J., Fernandes I., Perez J., Garcia-Del-Muro X., Marcoval J., Penin R., Fabra A. Metastatic uveal melanoma: Is there a role for conventional chemotherapy? — A single center study based on 58 patients. *Melanoma Res*. 2011;21:217–222. DOI: 10.1097/CMR.0b013e3283457726
22. Carvajal R.D., Schwartz G.K., Tezel T., Marr B., Francis J.H., Nathan P.D. Metastatic disease from uveal melanoma: Treatment options and future prospects. *Br. J. Ophthalmol*. 2017;101:38–44. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2016-309034
23. Niederkorn J.Y. Immune escape mechanisms of intraocular tumors. *Prog Retin Eye Res*. 2009;28:329–347. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2009.06.002
24. Yang W., Chen P.W., Li H. PD-L1: PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:2518–2525. DOI: 10.1167/iovs.07-1606
25. Stein-Streilein J., Streilein J.W. Anterior chamber associated immune deviation (ACAID): regulation, biological relevance, and implications for therapy. *Int Rev Immunol*. 2002;21:123–152. DOI: 10.1080/08830180212066
26. Brahmer J., Reckamp K.L., Baas P. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373:123–135. DOI: 10.1056/NEJMoa1504627
27. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3:991–998. DOI: 10.1038/ni1102-991
28. Teng M.W., Ngiew S.F., Ribas A. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res*. 2015;75:2139–2145. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0255
29. Beatty G.L., Gladney W.L. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2015;21:687–692. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1860
30. Boyd S.R., Tan D., Bunce C., Gittos A., Neale M.H., Hungerford J.L., Charnock-Jones S., Cree I.A. 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
31. Чехун В. Воспаление и рак. *Онкология*. 2009;11(4):244–245. [Chekhun V. Inflammation and cancer. *Oncology = Onkologiya*. 2009;11(4):244–245 (In Russ.)].
32. Савельева О.Е., Перельмутер В.М., Таширева Л.А., Денисов Е.В., Исаева А.В. Воспаление как терапевтическая мишень при комплексном лечении злокачественных опухолей. *Сибирский онкологический журнал*. 2017;16(3):65–78. [Savel'eva O.E., Perel'muter V.M., Tashireva L.A., Denisov E.V., Isaeva A.V. Recovery as a therapeutic target in the complex treatment of malignant tumors. *Siberian journal of oncology = Sibirskiy onkologicheskii zhurnal*. 2017;16(3):65–78 (In Russ.)]. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-3-65-78
33. Stitt A.W., Simpson D.A., Boockvar C. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors is regulated in eyes with intra-ocular tumours. *J Pathol*. 1998;186:306–312. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(1998110)186:3<306::AID-PATH183>3.0.CO;2-B
34. Sheidlow T.G., Hooper P.L., Cruckley C. Expression of vascular endothelial growth factor in uveal melanoma and its correlation with metastasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:S577.
35. Cree I.A., Boyd S.R., Tan D. Angiogenesis in ocular melanoma: the role of VEGF and bFGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:S577.
36. 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. [Likhvantseva V.G., Anurova O.A., Astakhova S.E., Vereshchagina M.V., Ovanesyan V.E., Stepanova E.V. Vascular endothelial growth factor expression in uveal melanoma. *Ophthalmology in Russia = Oftalmologiya*. 2021;18(4):914–921 (In Russ.)] DOI: 10.18008/1816-5095-2021-4-914-921

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ФПК «Академия постдипломного образования» ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства
Ованесян Владимир Эдуардович
соискатель

Волоколамское шоссе, 91, Москва, 125310, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0002-0623-4217>

ФПК «Академия постдипломного образования» ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства
ФГБУ ГНЦ «Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства
Лихванцева Вера Геннадьевна

доктор медицинских наук, профессор, консультант
Волоколамское шоссе, 91, Москва, 125310, Российская Федерация
ул. Гамалеи, 15, Москва, 123098, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0002-3175-9592>

Медико-биологический университет инноваций и непрерывного образования
ФГБУ ГНЦ РФ «Федеральный биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства
Рычкова Светлана Игоревна
доцент кафедры офтальмологии
ул. Гамалеи, 15, Москва, 123098, Российская Федерация

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта»
Сельков Сергей Алексеевич
заведующий отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий
Менделеевская линия, 3, Санкт-Петербург, 199034, Российская Федерация

ABOUT THE AUTHORS

Academy of Postgraduate Education of the Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of Federal Medical-Biological Agency

Ovanesyan Vladimir E.
applicant

Vologolamskoe highway, 91, Moscow, 125310, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0002-0623-4217>

Academy of Postgraduate Education of the Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of Federal Medical-Biological Agency

A.I. Burnazyan Federal Biophysical Center of Federal Medical-Biological Agency
Likhvantseva Vera G.

MD, Professor, consultant
Vologolamskoe highway, 91, Moscow, 125310, Russian Federation
Gamalei str., 15, Moscow, 123098, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0002-3175-9592>

Burnazyan Medical-Biological University of Innovation and Continuing Education,
Federal Medical-Biological Agency

Rychkova Svetlana I.
Associate Professor
Gamalei str., 15, Moscow, 123098, Russian Federation

Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproduction named after D.O. Ott
Selkov Sergey A.
head of the Department of immunology and intercellular interactions
Mendeleevskaya Line, 3, St. Petersburg, 199034, Russian Federation