ISSN 1816-5095 (print); ISSN 2500-0845 (online)
https://doi.org/10.18008/1816-5095-2022-4-789-796

поступила 07.03.22
was received 07.03.22

Изучение фенотипа эндотелиальных клеток в сосудах увеальной меланомы

В.Г. Лихванцева[1,2] О.А. Анурова[3] М.В. Верещагина[4]

С.Е. Астахова[2], В.Э. Ованесян[5], Е.В. Степанова[6]

[1] ФГБУ «Государственный научный центр РФ — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства
ул. Гамалеи, 15, Москва, 123098, Российская Федерация

[2]Академия постдипломного образования «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] ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Каширское шоссе, 23, Москва, 115478, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ **Офтальмология. 2022;19(4):789–796**

В опухолевом ангиогенезе официально признаны два основных механизма. Это образование сосудистых структур объединениями предшественников эндотелиальных клеток (ПЭК) или ангиобластов из циркулирующей периферической крови (1) и сосудистое кооптирование (2) с использованием предсуществующих сосудов. Определить *доминирующий фенотип эндотелиальных клеток* (ЭК), участвующих в неоангиогенезе увеальной меланомы (УМ), представляется очень важным из-за различной чувствительности разных ЭК к антиангиогенной терапии и их биологических различий. Циркулирующие гемангиобласты костномозгового происхождения (синоним: предшественники эндотелиальных клеток, ПЭК), участвующие в формировании сосудов в опухоли, могут также происходить от гемопоэтических стволовых клеток и в условиях избытка проангиогенных факторов роста подвергнуться «обратной дифференцировке» или «дедифференцировке». Такая ситуация чрезвычайно опасна из-за изменения биологических свойств ЭК: повышается скорость пролиферации и развивается высокая резистентность к любому виду интервенционной антиангиогенной терапии, включая антиангиогенные препараты таргетного назначения. В комплексе с высокой резистентностью к лучевой терапии и химиотерапии опухолевых клеток такая опухоль становится неуправляемой и быстро приводит к летальному исходу. Цель настоящего исследования: идентифицировать фенотип эндотелиальных клеток, участвующих в ангиогенезе УМ, методом иммуногистохимического анализа. Авторы провели иммуногистохимические исследования на парафиновых блоках (n = 98) энуклеированных глаз с УМ. Использовали один из рекомендуемых для этого маркеров ПЭК: моноклональное антитело к рецептору VEGFR2-KDR/Flk-1. Установлено, что экспрессия рецептора VEGFR-2/Flk-KDR-1 имела место только в 22,1 % УМ. Рецептор экспрессировался исключительно эндотелиальными клетками (ЭК) опухолевых сосудов и не экспрессировался клетками УМ. Отсутствовала базовая экспрессия рецептора (на стадии T1). Пик экспрессии наблюдали на стадии T2. На следующих стадиях онкологического процесса имел место спад экспрессии. Средняя ИГХ-градация интенсивности экспрессии также снижалась от стадии T2 к стадии T4. Flk-позитивные и негативные эндотелиальные клетки различались размерами, формой, характером связи с сосудистой стенкой и присутствием или отсутствием ядра в клетке. Авторы пришли к заключению, что оба механизма ангиогенеза имеют место в УМ. Небольшой процент (22,1 %) Flk+ эндотелиальных клеток свидетельствует о том, что доминирующим механизмом ангиогенеза в УМ является кооптирование сосудов на основе предсуществующих, а доминирующей популяцией ЭК — Flk-негативные ЭК.

Ключевые слова: увеальная меланома, ангиогенез, рецептор VEGFR-2/Flk-KDR-1, иммуногистохимический анализ, прогноз

Для цитирования: Лихванцева В.Г., Анурова О.А., Астахова С.Е., Верещагина М.В., Ованесян В.Э. Изучение фенотипа эндотелиальных клеток в сосудах увеальной меланомы. *Офтальмология.* 2022;19(4):789–796. https://doi.org/10.18008/1816-5095-2022-4-789-796

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

Конфликт интересов отсутствует

CC BY 4.0

Study of the Phenotype of Endothelial Cells in the Vessels of Uveal Melanoma

V.G. Likhvantseva[1,2], O.A. Anurova[3], S.E. Astakhova[2], M.V. Vereshchagina[4], V.E. Ovanesyan[5], E.V. Stepanova[6]

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

[2] 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

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

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

[5] Yegoryev Central District Hospital
Shchukova Mountain, 19, Yegoryevsk, Moscow Region, 140304, Russian Federation

[6] Experimental Diagnosis and Tumor Therapy Institution
Kashirskoe highway, 23, Moscow, 115478, Russian Federation

ABSTRACT **Ophthalmology in Russia. 2022;19(4):789–796**

In tumor angiogenesis, two main mechanisms are officially recognized. They are: the formation of vascular structures by associations of endothelial cell precursors (PEK) or angioblasts from circulating peripheral blood (1) and vascular co-optation (2) using preexistent vessels. Determining the dominant phenotype of endothelial cells (EC) involved in the neoangiogenesis of uveal melanoma (UM) is very important due to the different sensitivity of different EC to antiangiogenic therapy and their biological differences. Circulating hemangioblasts of bone marrow origin (synonym: endothelial cell precursors, PEC) involved in the formation of vessels in the tumor can also originate from hematopoietic stem cells and, in conditions of an excess of proangiogenic growth factors, undergo "reverse differentiation" or "dedifferentiation". This situation is extremely dangerous due to changes in the biological properties of EC: the rate of proliferation increases and high resistance to any type of interventional antiangiogenic therapy, including targeted antiangiogenic drugs, develops. In combination with high resistance to radiation therapy and chemotherapy of tumor cells, such a tumor becomes uncontrollable and quickly leads to death… The purpose of this study: to identify the phenotype of endothelial cells involved in UM angiogenesis by immunohistochemical analysis. The authors conducted immunohistochemical studies on paraffin blocks (n = 98) of enucleated eyes with UM. One of the recommended PEC markers was used: a monoclonal antibody to the VEGFR2-KDR/Flk-1 receptor. It was found that the expression of the VEGFR- 2/Flk-KDR-1 receptor took place only in 22.1 % of the UM. The receptor was expressed exclusively by endothelial cells (EC) of tumor vessels and was not expressed by UM cells. There was no basic expression of the receptor (at stage T1). Peak expression was observed at stage T2. At the next stages of the oncological process, there was a decline in expression. The mean IHC gradation of expression intensity also decreased from stage T2 to stage T4. Flk-positive and negative endothelial cells differed in size, shape, nature of communication with the vascular wall and the presence or absence of a nucleus in the cell. The authors concluded that both mechanisms of angiogenesis take place in UM. A small percentage (22.1 %) Flk+ endothelial cells indicate that the dominant mechanism of angiogenesis in UM is co-optation of vessels based on preexistent, and the dominant population of EC is Flk-negative EC.

Keywords: uveal melanoma, angiogenesis, receptor VEGF-R1/Flk-1, immunohystochemical analysis, prognosis

For citation: Likhvantseva V.G., Anurova O.A., Astakhova S.E., Vereshchagina M.V., Ovanesian V.E. Study of the Phenotype of Endothelial Cells in the Vessels of Uveal Melanoma. *Ophthalmology in Russia.* 2022;19(4):789–796. https://doi.org/10.18008/1816-5095-2022-4-789-796

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

There is no conflict of interests

Известно четыре категории заболеваний глаз, протекающих с внутриглазным неоангиогенезом. Это ретинопатия недоношенных, диабетическая ретинопатия, неоваскулярные формы возрастной макулярной дегенерации и внутриглазные опухоли. Благодаря многообразию задействованных клеточных и молекулярных механизмов в неоангиогенезе внутриглазные опухоли представляют наибольший интерес для исследований.

На изучение закономерностей внутриглазного неоангиогенеза направлены инновационные диагностические технологии оптической когерентной томографии сетчатки с ангиографией (ОКТ-А), позволяющие диагностировать новообразованные сосуды на самых ранних стадиях заболевания. ОКТ-А позволяет не только посчитать плотность микрососудистой сети в разных зонах глазного дна и на разных уровнях сетчатки или хориоидеи, но и визуализировать аномальные сосуды, изучить их архитектонику и связь с питающими сосудами [1–7]. ОКТ-А в тандеме с ОКТ незаменима в мониторинге и оценке эффективности антиангиогенной терапии [5]. Однако только морфологические исследования дают картину, на основании которой можно судить об истинных механизмах неоангиогенеза, а следовательно, выйти на путь их прерывания.

До конца XX века в опухолевом ангиогенезе эксперты признавали *два основных механизма.* В 1997 г. Ashara описал сосудистые структуры, сформированные объединениями предшественников эндотелиальных клеток (ПЭК) или ангиобластов из циркулирующей периферической крови в местах с ишемическими проявлениями

или недостаточным ангиогенезом или нарушением целостности сосудистой стенки [8]. В 1999 г. Holash описал процесс многоэтапного сосудистого кооптирования, при котором опухоль использует уже существующие сосуды. Сначала эти сосуды регрессируют, вызывая массивные некрозы, затем на периферии опухоли развивается сеть сосудов указанным способом [9].

Чаще опухолевый ангиогенез протекает по классическому пути: ответвление новых микрокапилляров от уже существующих. В построении таких сосудов в основном участвуют эндотелиальные клетки, активно пролиферирующие и мигрирующие под влиянием факторов роста сосудистого эндотелия (VEGF) и других проангиогенных молекул (FGF, TNF и др), экспрессируемых опухолевыми клетками микроокружения [10–12].

Определить *доминирующий фенотип эндотелиальных клеток* (ЭК), участвующих в неоангиогенезе при той или иной офтальмопатологии, представляется очень важным из-за различной чувствительности разных ЭК к антиангиогенной терапии и их биологических различий. Например, циркулирующие гемангиобласты костномозгового происхождения (синоним: предшественники эндотелиальных клеток, ПЭК) участвующие в формировании сосудов в опухоли, могут также происходить от гемопоэтических стволовых клеток и в условиях избытка проангиогенных факторов роста подвергнуться «обратной дифференцировке» или «дедифференцировке» (дифференцировка в «обратном направлении») [13].

Такая ситуация чрезвычайно опасна из-за изменения биологических свойств ЭК: повышается скорость пролиферации и развивается высокая резистентность к любому виду интервенционной антиангиогенной терапии, включая антиангиогенные препараты таргетного назначения [14, 15]. В комплексе с высокой резистентностью к лучевой терапии и химиотерапии опухолевых клеток такая опухоль становится неуправляемой и быстро приводит к летальному исходу [15, 16].

Заметим, последние исследования свидетельствуют об участии таких циркулирующих гемангиобластов не только в опухолевом ангиогенезе, но и в диабетической ретинопатии или в восстановлении целостности эндотелиальной выстилки при посттромботической неоваскуляризации сетчатки. Возможно, этот факт объясняет не 100 % успех эндовитреальных антиангиогенных препаратов при указанной офтальмопатологии [17–22].

Идентификация ПЭК или определение фенотипа ЭК является сложной задачей — «золотого стандарта» не существует. Ни одна из предложенных комбинаций маркеров не может считаться полностью специфичной для ПЭК [23]. Наиболее часто для определения этих клеток используется соэкспрессия маркеров CD34, CD133, VEGFR2-KDR/Flk-1 [24]. Asahara и соавт. охарактеризовали ПЭК как субпопуляцию CD34+-гемопоэтических клеток-предшественников, соэкспрессирующих VEGFR-2/Flk+, способную дифференцироваться в ЭК *in vitro* [8].

Мобилизация ПЭК из костного мозга является сложным процессом, в котором участвует множество факторов: стромально-клеточный производный фактор α (SDF-1α), матриксная металлопротеиназа 9, VEGF и ряд цитокинов. Под их воздействием при выходе из костного мозга ПЭК, характеризующиеся экспрессией маркеров, специфичных для предшественников (CD34, CD133), теряют их или начинают соэкспрессировать маркеры зрелого эндотелия (VEGF-R2/Flk+) [25–30]. ПЭК высвобождаются в кровеносное русло и мигрируют в зоны поврежденного слоя эндотелиальных клеток сосуда или зоны гипоксии.

Этот механизм открыт сравнительно недавно. Участвует ли он в построении собственной сети сосудов в УМ, до настоящего времени не установлено. Если классический путь ангиогенеза — рост и ответвление новых микрокапилляров от уже существующих в УМ — изучен и доказан, то возможность мобилизации и использования циркулирующих ПЭК костномозгового происхождения не раскрыта и не изучена. Этот аспект ангиогенеза и стал предметом наших исследований.

Цель исследования: идентифицировать фенотип эндотелиальных клеток, участвующих в ангиогенезе УМ, методом ИГХ анализа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Были проведены традиционные морфологические исследования на парафиновых блоках (n = 97) энуклеированных глаз с УМ с целью верификации диагноза. На втором этапе на этих же блоках выполняли иммуногистохимический (ИГХ) анализ.

Стадию УМ выставляли в соответствии с рекомендациями 8 редакции Американского объединенного комитета по раку (AJCC) по классификации опухолей (TNM) (2017) [31, 32].

Морфологическую диагностику УМ проводили согласно международным стандартам диагностики опухолей человека (2018), используя в сложных случаях маркеры меланоцитарного ряда [33, 34].

Применяли стандартную методику: готовили парафиновые срезы толщиной 3–5 микрон, депарафинировали и регидратировали в батарее спиртов, прогревали 30 минут на водяной бане в 95–99° цитратном буфере для «демаскировки» антигенов (АГ), охлаждали при комнатной температуре и переносили в фосфатный буфер. Затем срезы инкубировали в темноте с 3 % перекисью водорода, приготовленной на дистиллированной воде, и промывали в фосфатном буфере для блокирования эндогенной пероксидазы. Неспецифическое связывание антител (АТ) блокировали инкубацией с 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина. Реакцию с первичными АТ проводили при 4 °С в течение ночи. После первичных АТ стекла промывали в фосфатном буфере с pH 7,4–7,6. Инкубацию со вторыми АТ, меченными биотином («LSAB+kit», DAKO, Дания), проводили при комнатной температуре 20 минут, затем срезы промывали

дважды по 5 мин. Инкубацию с АТ, мечеными стрептавидином («LSAB+kit», DAKO), проводили при комнатной температуре в течение 20 мин, после этого срезы промывали еще трижды. ИГХ-реакцию визуализировали с помощью системы «DAKO» (Дания). Срезы докрашивали гематоксилином и заключали в бальзам.

В качестве первичных АТ использовали один из двух маркеров ПЭК: АТ к VEGFR-2/Flk-1 (козьи поликлональные АТ, разведение 1:100, фирма Santa Cruz Biotech).

Негативным контролем служила ИГХ-реакция без первичных АТ.

ИГХ анализ выполняли с помощью светового микроскопа «Leica» (Германия) (увеличение ×100, ×200, ×400).

Результаты оценивали по интенсивности ИГХ-окрашивания и количеству окрашенных (положительных) клеток в максимально содержащих зонах, локализации окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана) [33].

Исследования ткани УМ выполняли на базе отдела патологической анатомии и гистологии ЦКБ РАН; отдела патологической анатомии № 3 (онкопатология) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава Российской Федерации (к.м.н. О.А. Анурова); лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей (НИИ ЭДиТО, д.м.н. Е.А. Степанова).

Анализ результатов проводили на персональном компьютере с помощью пакета программ SAS (Statistical Analysis System, version 6.09, USA). Связь между показателями определяли по величине коэффициентов корреляции. Статистическую достоверность различий между количественными показателями в разных группах вычисляли с помощью модифицированного *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок, а ранговых показателей — по χ^2-критерию Фишера.

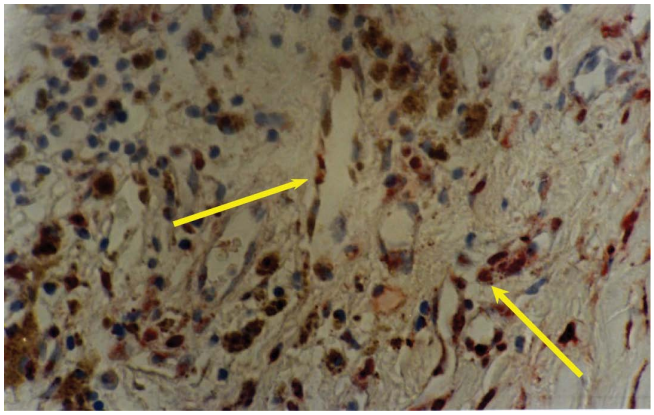

Рис. 1. Иммуногистохимическая реакция с антителами к рецептору Flk/KDR-1, положительная реакция со специфическими АТ в опухолевых сосудах (гистол. № 59799, ×400)

Fig. 1. Immunohystochemical reaction with antibodies to Flk/KDR-1 receptor, positive reactivity with specific AT in tumor vessels (Histol. № 59799. ×400)

Протяженность опухоли оценивали по балльной системе с учетом значимости различных локализаций УМ в прогнозе заболевания от 1 до 17 баллов. С целью более точного анализа по оценке роли распространенности опухоли был введен индекс распространенности опухоли и его градации. Градацию I приписывали опухоли с ранговым показателем от 1 до 3; II — от 4 до 7; III — от 8 до 11 и IV — при ранге более 11 [35]

Статистическую обработку данных проводили на базе лаборатории современных методов оценки здоровья в отделе биостатистики Государственного научного центра НИИ профилактической медицины Минздрава РФ (В.А. Выгодин).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование экспрессии рецептора VEGFR-2/Flk-KDR-1

Установлено, что экспрессия рецептора VEGFR-2/Flk-KDR-1 имела место только в 22,1 % УМ. Заметим, рецептор экспрессировался исключительно эндотелиальными клетками (ЭК) опухолевых сосудов, которые так или иначе имели связь с сосудами, находились в его просвете или выстилали сосудистую стенку (рис. 1). Собственно опухолевые клетки не экспрессировали рецептор VEGFR-2/Flk-KDR-1 (далее: Flk).

При этом процент Flk+ (позитивных) клеток в поле зрения иммунопозитивных образцов УМ колебался от 3 до 100 % в зонах просмотра. Интенсивность рецепции расценивали скорее как слабую (ИГХ-градация — I, 14,7 % случаев). Редко обнаруживали эндотелиальные клетки с умеренной и гиперэкспрессией Flk (4,2 и 3,2 %, соответственно) (рис. 1).

Выявлены **общие закономерности экспрессии Flk-KDR-1 в УМ**:

- отсутствовала базовая экспрессия рецептора (на стадии T1);
- пик экспрессии наблюдали на стадии T2, на следующих двух стадиях онкологического процесса имел место спад экспрессии. Так, средний процент Flk-позитивных клеток на стадии T2 составлял 15,0 ± 11,0 % (табл. 1), к стадии T_4 он снижался до 8,8 ± 5,5 %, составляя при 75 % инвазии склеры — 2,6 ± 2,2 %;
- средняя ИГХ-градация интенсивности экспрессии также снижалась от стадии T2 к стадии T4;
- Flk-KDR-1 экспрессировался исключительно в эндотелиальных клетках, причем не во всех. Морфологический фенотип Flk-позитивных ЭК клеток отличался: Flk+ клетки были мельче размерами, имели более округлую форму и располагались в тех сосудах, в которых отсутствовала эндотелиальная выстилка на стенках сосуда или была разрушена стенка сосуда (рис. 1).

Обнаружена связь рецепции Flk с локализацией опухоли. Установлено, что меланома радужки и иридоцилиарные меланомы не экспрессируют этот рецептор.

Таблица 1. Экспрессия рецептора Flk на различных стадиях УМ

Table 1. Flk receptor expression at various stages of UM

Стадия УМ Stage UM	Число случаев Number of cases	Средний процент Flk + клеток (*M* ± *m*) Average Percentage Flk + Cells (*M* ± *m*)	Средняя интенсивность ИГХ-экспрессии Flk (*M* ± *m*) Average intensity of IH-expression Flk (*M* ± *m*)
T_1	9	-	-
T_2	25	15,0 ± 11,0	1,6
T_3	36	13,7 ± 6,6	1,3
T_4	28	8,8 ± 5,5	1,0

Таблица 2. Экспрессия Flk в УМ различного гистологического строения

Table 2. Expression of Flk in the UM of different histological structure

Гистологический тип УМ Histological type UM	Средний процент Flk+ клеток (*M* ± *m*) Average Percentage Flk+ Cells (*M* ± *m*)	Средняя градация интенсивности ИГХ-экспрессии Average gradation of IHC-expression intensity
Веретеноклеточные УМ / Spindle cell UM (*n* = 33)	15,9 ± 5,4 %	1,6
Смешанноклеточные УМ / Mixed cell UM (*n* = 35)	12,8 ± 5,2 %	1,3
Эпителиоидные УМ / Epithelioid cell UM (*n* = 30)	3,7 ± 2,4 %*	1,1*

Примечание: достоверность различий показателей Flt N между веретеноклеточными и эпителиодными УМ, $p < 0,01$.
Note: Significance of differences in Flt N values between spindle cell and epithelial UM $p < 0.01$.

Установленный факт не противоречит теории ангиогенеза в целом, если учесть, что опухоли этих локализаций редко достигают больших размеров, медленно растут, по-видимому, не испытывают сильной гипоксии. Кроме того, благодаря локализации, доступной обзору, их рано диагностируют (на стадии Т1). Но, возможно, причина и в другом. Отсутствие рецепторов Flk в меланоме радужки препятствует развитию интратуморальной сети сосудов, в свою очередь, отсутствие клинически значимой собственной сосудистой сети тормозит рост меланом в передней камере глаза и создает препятствие на пути метастазирования. Мы также не исключаем супрессию экспрессии Flk каким-либо природным пептидом с ангиостатическими свойствами, находящимся во влаге передней камеры.

Максимальный процент Flk-позитивных клеток выявляли при распространении меланомы за экватор (Мср. = 16,7 ± 8,7 %). Как ни странно, но преэкваториальная меланома не отличалась большим количеством Flk+ ЭК. Возможно, характер построения сосудистой сети преэкваториальной УМ принципиально иной? Например, здесь кровоснабжение идет за счет развивающихся анастомозов с собственной сосудистой сетью хориоидеи, по типу сосудистого кооптирования или формирования межклеточных каналов микроциркуляции, то есть по «облегченному» типу или по типу мимикрии. Эта гипотеза может объяснить быстрое прогрессирование и частое метастазирование опухолей этой локализации.

Анализ рецепции Flk в УМ с различной протяженностью (синонимы: распространенность по ширине, максимальный диаметр) подтвердил общую закономерность для опухолевого ангиогенеза. Экспрессию Flk обнаруживали только в УМ с градацией индекса протяженности II и сразу на высоком уровне: процент позитивных клеток составил 15,1 ± 5,1 %. При увеличении протяженности до III градации рецепция Flk снижалась до 7,4 ± 4,7 %, при более обширных меланомах (градация IV) вновь достигала 14,4 ± 6,6 %.

Установлена высококоррелятивная связь между клеточным типом меланомы и продукцией Flk: средний процент Flk-позитивных клеток в веретеноклеточной УМ — 15,9 ± 5,4; средняя интенсивность — 1,6; в смешанноклеточной — 12,8 ± 5,2 % и 1,3, а в эпителиоидной — 3,7 ± 2,4 % ($p < 0,01$) и 1,1. Результаты свидетельствуют, что более агрессивная эпителиоидная УМ мало экспрессирует рецептор Flk-KDR-1.

Экспрессия Flk находилась в обратной связи с возрастом пациента. Чем старше был больной, тем слабее экспрессировался рецептор Flk (k = -0,4388, $p < 0,01$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Наши исследования были посвящены проверке рабочей гипотезы, согласно которой в ангиогенезе УМ, наряду с классическим механизмом опухолевого ангиогенеза — кооптированием с уже имеющимися сосудами, примыкающими к опухоли, выходящими из хориоидеи, участвует механизм рекрутинга и мобилизации циркулирующих предшественников ЭК костномозгового происхождения — ПЭК. С этой целью мы провели ИГХ-анализ, используя рекомендуемый для этих целей маркер ПЭК — VEGFR-2/Flk-KDR-1. Ранее на этих же архивных блоках мы уже изучали экспрессию другого маркера ПЭК — CD34. Мы получили подтверждение в том, что отдельные (но не все!) ЭК несут на себе этот тканедифферентационный антиген, что отчасти подтверждало возможное участие этого механизма в ангиогенезе УМ. В настоящем исследовании мы убедились, что отдельные ЭК (но далеко не все!) несут маркер предшественников гемангиобластов костномозгового

происхождения — VEGFR-2/Flk-KDR-1, что позволяет отнести ИГХ-окрашенные антителами к VEGFR-2/Flk-KDR-1 эндотелиальные клетки к ПЭК. Примерно каждый пятый образец УМ (в 22,1 %) продемонстрировал ИГХ-окраску на Flk в эндотелиальных клетках.

Высокая специфичность маркера VEGFR-2/Flk-KDR-1 подтверждалась следующими фактами:

- иммунофиксация антител происходила исключительно в эндотелиальных клетках и не осуществлялась в опухолевых клетках;

- ИГХ-окрашивание антителами к VEGFR-2/Flk-KDR-1 имело место далеко не во всех ЭК. Чаще сосудистые ЭК оказывались иммунонегативными;

- морфологически Flk+ эндотелиальные клетки (предположительный фенотип: ПЭК) отличались от стационарных Flk-эндотелиальных клеток.

ПЭК имели более вариабельный размер, мельче ЭК (до 25 μM), округлую форму, некоторые из клеток не имели ядра, располагались мелкими группами. В отличие от них классические ЭК имели форму вытянутого веретена, в них обязательно присутствовало ядро, они плотно контактировали с сосудистой стенкой на всем ее протяжении и между собой.

Заметим, эти морфологические особенности ПЭК были ранее отмечены и описаны разными авторами, изучавшими ангиогенез при самых разных заболеваниях [20, 24].

Отсутствие базовой рецепции VEGFR-2/Flk-KDR-1 (на стадии T1) свидетельствует о том, что механизм рекрутинга и привлечения ПЭК подключается не сразу, а только по достижении опухолью определенного «статуса» (стадия T2). Выявленный факт косвенно подтверждает, что механизм привлечения ПЭК является, по-видимому, более сложным, энергозатратным, и в нем нет необходимости при маленьких опухолях. В контексте этого объяснения находится и отрицательная корреляционная связь с возрастом пациента. С повышением возраста, как известно, снижается уровень продукции ростовых факторов, необходимых для реализации этого механизма ангиогенеза.

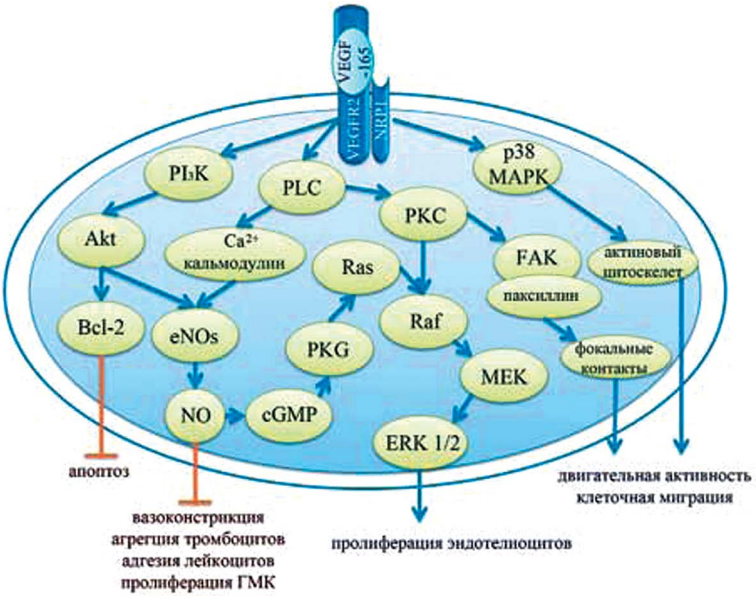

Рис. 2. Схема VEGFR2-сигнального пути: PI3K — фосфоинозитид-3-киназа; Akt — протеинкиназа B; Bcl-2 — белок-регулятор апоптоза; PLC — фосфолипаза C; eNOs — эндотелиальная NO-синтаза; NO — оксид азота; cGMP — циклический гуанозинмонофосфат; PKG — протеинкиназа G; Ras — сигнальный белок; малая ГТФ-аза; PKC — протеинкиназа C; Raf — протоонкоген; MEK — киназа митоген-активируемых киназ; ERK1/2 — киназы, активируемые внеклеточными сигналами типов 1 и 2; p38 MAPK — киназы митоген-активируемых белков p38; FAK — киназа фокальной адгезии[1]

Fig. 2. VEGFR2 signal pathway circuit: PI3K — phosphoinositide-3-kinase; Akt — protein kinase B; Bcl-2 — protein-regulator of apoptosis; PLC — phospholipose C; eNOs — endothelial NO-synthesis; NO — nitric oxide; cGMP — cyclic guanosine monophosphate; PKG — protein kinase G; Ras — signal protein; small GTF-aza; PKC — protein kinase C; Raf — proto-oncogene; MEK — kinase of mitogen-activated kinases; ERK1/2 — kinases activated by extracellular signals of types 1 and 2; p38 MAPK — kinases of mitogen-activated proteins p38; FAK — focal adhesion kinase

Выявленная корреляционная связь с местом развития меланомы в увеальном тракте позволяет предположить, что триггером этого механизма ангиогенеза являются некие растворимые факторы, которые в изобилии продуцируются опухолями хориоидеи и не экспрессируются меланомами радужки. Полагаем, что этот фактор может определять различия в поведении опухолей этих локализаций. С другой стороны, не исключена и обратная связь, когда через ангиогенные механизмы идет стимуляция роста, пролиферации опухолевых клеток, усиление их локомоторных функций. Многочисленные исследования, проведенные сравнительно недавно, раскрыли расшифровку этих молекулярно-генетических взаимосвязей (рис. 2). В этом аспекте рецептор Flk обладает несравнимо более широкими возможностями, нежели рецептор Flt-1.

Таким образом, настоящими и проведенными нами ранее исследованиями [34] было установлено, что эндотелиальные клетки внутриопухолевых сосудов УМ классифицируются на 2 ИГХ-фенотипа:

1 фенотип: CD34+/CD31+/Flt-1-/Flk-;

2 фенотип: CD34+/CD31–/Flt-1+/Flk+ (маркеры предшественников ЭК из гемангиобластов).

В УМ ведущим фенотипом ЭК является CD34+/CD31+/Flt-1-/Flk-. Следовательно, ведущим механизмом ангиогенеза в УМ является кооптирование, при котором опухоль использует уже существующие сосуды.

Наша работа имеет ограничение. Оно заключается в том, что мы проводили

[1] Арутюнян И.В., Кананыхина Е.Ю., Макаров А.В. Роль рецепторов VEGF-A165 в ангиогенезе. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013; 8(1):12–18. [Arutyunyan I.V., Kananykhina E.V., Makarov A.V. Role of VEGF-A165 receptors in angiogenesis. Cell Transplantology and Tissue Engineering. 2013;8(1):12–18 (In Russ.)].

ИГХ-исследования поэтапно, выполняя на одном и том же архивном блоке УМ вначале анализ с маркерами CD34 и CD31, на следующем срезе — с Flt-1, а на последующем — Flk-1. Более доказательной была бы соэкспрессия на одном срезе всех маркеров или хотя бы двух: CD34/Flk-1. Вместе с тем тот факт, что мы не выявили среди 98 тестируемых УМ случаи Flt-1-/Flk+, позволяет думать, что ИГХ-анализ с единственным маркером Flk на срезе специфичен, информативен и достаточен.

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.
Верещагина 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

1. Свирин А.В., Кийко Ю.И., Обруч Б.В., Богомолов А.В. Спектральная оптическая когерентная томография: принципы и возможности метода. *РМЖ. Клиническая офтальмология.* 2009;2:50–53. [Svirin A.V., Kiiko Yu.I., Obruch B.V., Bogomolov A.V. Spectral optic coherent tomography: principles and possibilities (Literary review). Russian Medical Journal. Clinical Ophthalmology = *Rossiyskiy medicinskiy zhurnal. Klinicheskaya oftal'mologiya.* 2009;2:50–53 (In Russ.)].
2. Duker J.S., Waheed N.K., Goldman D.R. Handbook of retinal OCT: optical coherence tomography. Philadelphia: WB Saunders; 2014.
3. Shields C.L., Sioufi K., Fuller T., Higgins T. Which tumor, what imaging modality. *Retina Today.*2016;08:57–64.
4. Нероев В.В., Саакян С.В., Мякошина Е.Б. Оптическая когерентная томография-ангиография в диагностике начальной меланомы и отграниченной гемангиомы хориоидеи. *Вестник офтальмологии.* 2018;134(3):4–18. [Neroev V.V., Sahakyan S.V., Myakoshina E.B. Optical coherence tomography-angiography in the diagnosis of initial melanoma and delimited choroid hemangioma. Annales of Ophthalmology = *Vestnik oftal'mologii.* 2018;134(3):4–18 (In Russ.)]. DOI: 10.17116/oftalma201813434
5. Shields C.L., Say E.A., Samara W.A., Khoo C.T. Optical coherence tomography angiography of the macula after plaque radiotherapy of choroidal melanoma: Comparison of irradiated versus nonirradiated eyes in 65 patients. *Retina.* 2016;36(8):1493–1505. DOI: 10.1097/IAE.0000000000001021
6. Ghassemi F., Mirshahi R., Fadakar K., Sabour S. Optical coherence tomography angiography in choroidal melanoma and nevus. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ).* 2018;12:207. DOI: 10.2147/OPTH.S148897
7. Pellegrini M., Corvi F., Invernizzi A., Ravera V. Swept-source optical coherence tomography angiography in choroidal melanoma: an analysis of 22 consecutive cases. *Retina.* 2019;39(8):1510–1519. DOI: 10.1097/IAE.0000000000002205
8. Asahara T. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964–966. DOI: 10.1126/science.275.5302.964
9. Holash J., Maisonpierre P., Compton D. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science. Washington DC.* 1999;284:1994–1998.
10. Gille H., Kowalski J., Li B., LeCouter J., Moffat B., Zioncheck T.F. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2): a reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. J. Biol. Chem. 2001;276:3222–3230. DOI: 10.1074/jbc.M002016200
11. Jin K.L., Mao X.O., Greenberg D.A. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97:10242–10247. DOI: 10.1073/pnas.97.18.10242
12. Omolara O., Ogunshola O. O., Antic A., Donoghue M. J., Fan S.-Y., Kim H. Paracrine and autocrine functions of neuronal VEGF in the CNS. *J. Biol. Chem.* 2002;277:11410–11415. DOI: 10.1074/jbc.M111085200
13. Loges S Identification of the Adult Hemangioblast. *Stem Cells and Development journal.* 2004;13(1):229–242.DOI: 10.1089/154732804323099163.
14. Van Limbergen E.J., Zabrocki P., Porcu M. FLT1 kinase is a mediator of radioresistance and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Oncol.* 2014;53(5):637–645. DOI: 10.3109/0284186X.2013.835493
15. Bhattacharya R., Ye X.C., Wang R. Intracrine VEGF Signaling Mediates the Activity of Prosurvival Pathways in Human Colorectal Cancer Cells Cancer Res. 2016;76(10):3014–3024. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1605
16. Wey J.S., Fan F., Gray M.J. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer.* 2005;104(2):427–438. DOI: 10.1002/cncr.21145
17. Ii M., Takenaka H., Asai J. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circulation research.* 2006;98(5):697–704. DOI: 10.1161/01.RES.0000209948.50943.ea
18. Hazarika S., Dokun A.O., Li Y. Impaired angiogenesis after hindlimb ischemia in type 2 diabetes mellitus: differential regulation of vascular endothelial growth factor receptor 1 and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *Circulation research.* 2007;101(9):948–956. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.160630
19. Tan K., Lessieur E., Cutler A. Impaired function of circulating CD34(+)CD45(-) cells in patients with proliferative diabetic retinopathy. Experimental eye research. 2010;91(2):229–237. DOI: 10.1016/j.exer.2010.05.012
20. Мичурова М.С., Калашников В.Ю., Смирнова О.М., Кононенко И.В., Иванова О.Н. Роль эндотелиальных прогениторных клеток в развитии осложнений сахарного диабета. *Сахарный диабет.* 2015;1:24–32. [Michurova M.S., Kalashnikov V.Yu., Smirnova O.M., Kononenko I.V., Ivanova O.N. The role of endothelial progenitor cells in the development of complications of diabetes mellitus Diabetes mellitus. *Saharnyj diabet.* 2015;1:24–32 (In Russ.)].
21. Butler J.M., Guthrie S.M., Koc M. SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy. *Journal of Clinical Investigation.* 2005;115(1):86–93. DOI: 10.1172/JCI200522869
22. Fadini G.P. Is bone marrow another target of diabetic complications? *European journal of clinical investigation.* 2011;41(4):457–463. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2010.02417.x
23. Khan S.S., Solomon M.A., McCoy J.P. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. Cytometry Part B: Clinical Cytometry. 2005;64B(1):1–8. DOI: 10.1002/cyto.b.20040
24. Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95(3):952–958. DOI: 10.1182/blood.V95.3.952.003k27_952_958
25. Raeve H., Van Marck E., Van Camp B., Vanderkerken K. Angiogenesis and the role of bone marrow endothelial cells in haematological malignancies Histol Histopathol. 2004;19:935–950. DOI: 10.14670/HH-19.935
26. Del Papa N., Quirici N., Soligo D., Scavullo C., Cortiana M., Borsotti C., Maglione W., Comina D.P., Vitali C., Fraticelli P., Gabrielli A., Cortelezzi A., Lambertenghi-Deliliers G. Del Bone marrow endothelial progenitors are defective in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(8):2605–2615. DOI: 10.1002/art.22035
27. Schmidt-Lucke C., Fichtlscherer S., Aicher A., Tschöpe C., Schultheiss H.-P., Zeiher A.M., Dimmeler S. Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol. *PLoS One.* 2010;5(11):13790c. DOI: 10.1371/journal.pone.0013790
28. Lanuti P., Santilli F., Marchisio M., Pierdomenico L., Vitacolonna E., Santavenere E., Iacone A., Davì G., Romano M., Miscia S. A novel flow cytometric approach to distinguish circulating endothelial cells from endothelial microparticles: relevance for the evaluation of endothelial dysfunction. *J. Immunol. Methods.* 2012;380(1–2):16–22. DOI: 10.1016/j.jim.2012.03.007
29. Hristov M.W., Erl P.C. Weber Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003;23(7):1185–1193._DOI: 10.1161/01.ATV.0000073832.49290.B5
30. Blann A.D., Woywodt A., Bertolini F., Bull T.M., Buyon J.P., Clancy R.M., Haubitz M., Hebbel R.P., Lip G.Y.H., Mancuso P., Sampol J., Solovey A., Dignat-George F. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb. Haemost.* 2005;93(2):28–35. DOI: 10.1160/TH04-09-0578
31. Клинические рекомендации «Увеальная меланома», утвержденные Минздравом РФ, 2020 г. [Clinical recommendations "Uveal melanoma", approved by the Ministry of Health of the Russian Federation, 2020 (In Russ.)]. https://diseases.medelement.com/disease/%D1%83%D0%B2%D0%B5%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%B0%D1%8F%D0%BC%D0%B5%D0%BB%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%BC%D0%B0-%D0%BA%D0%BF-%D1%80%D1%84-2020/16856
32. 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.
33. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Под ред. С.В. Петрова и Н.Т. Райхлина. Казань, Титул, 2004. 451 с. [Guidelines for immunohistochemical diagnosis of human tumors. Eds. S.V. Petrova, N.T. Rajhlina. Kazan': Titul, 2004. 451 p. (In Russ.)].
34. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2002. 641 p.
35. Астахова С.Е., Лихванцева В.Г., Ухов Ю.И., Степанова Е.В., Верещагина М.В. Маркеры ангиогенеза в прогнозе увеальной меланомы. *Медицинская иммунология, Санкт-Петербург,* 2003;5(3–4):346. [Astahova S.E., Likhvantseva V.G., Uhov Yu.I., Stepanova E.V., Vereshchagina M.V. Markers of angiogenesis in the prognosis of uveal melanoma. Medical Immunology = *Medicinskaya immunologiya, Sankt-Peterburg.* 2003;5(3–4):346 (In Russ.)].

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, кафедра 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-паталогоанатом патолого-анатомического 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 «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Степанова Евгения Владиславовна
доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории изучения механизмов ангиогенеза
Каширское шоссе, 23, Москва, 115478, Российская Федерация

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

V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology
Anurova Olga A.
PhD, pathologist of the Pathology department No. 3 (oncopathology)
Academician Oparina 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
Koptevsky ave., 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
Stepanova Evgenia V.
PhD, Professor, head of the Laboratory for the study of angiogenesis mechanisms
Kashirskoe highway, 23, Moscow, 115478, Russian Federation