

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР  
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ВИДОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ И  
МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-  
БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»**

---

*На правах рукописи*

**ОВАНЕСЯН ВЛАДИМИР ЭДУАРДОВИЧ**

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ УВЕАЛЬНОЙ  
МЕЛАНОМЫ НА ОСНОВЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ  
МАРКЕРОВ АНГИОГЕНЕЗА**

3.1.5. Офтальмология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научный руководитель**  
Доктор медицинских наук, профессор  
**В.Г. Лихванцева**

Москва – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ (обзор литературы)</b> .....	9
1.1 Клинические морфологические маркеры прогноза.....	12
1.2 Морфологические маркеры прогноза.....	15
1.3 Молекулярные маркеры прогноза.....	17
1.4 Цитогенетические маркеры, ассоциированные с прогнозом.....	19
1.5 Иммуногистохимические молекулярные маркеры прогноза.....	21
1.6 Морфологические и иммуногистохимические маркеры ангиогенеза.....	28
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	33
2.1 Дизайн исследования.....	33
2.2 Характеристика клинического материала.....	34
2.3 Методы диагностики.....	42
2.4 Методы лечения .....	44
2.5 Иммунологические методы исследования.....	47
2.6 Морфологические методы исследования.....	48
2.7 Методы статистического анализа.....	49
<b>ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМОЙ, ОЦЕНКА КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РИСКА В КАЧЕСТВЕ ПРЕДИКТОРОВ ПРОГНОЗА</b> .....	50
3.1 Оценка клиничко-морфологических показателей в качестве маркера прогноза .....	50
3.2 Оценка силы корреляционной связи клиничко-морфологических показателей и собственных маркеров с прогнозом.....	76
<b>ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ АНГИОГЕНЕЗА УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ. ПОИСК И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРЕДИКТОРОВ ПРОГНОЗА СРЕДИ МАРКЕРОВ АНГИОГЕНЕЗА</b> .....	77
4.1 Изучение васкуляризации в увеальной меланоме гистологическими методами.....	77
4.2 Изучение васкуляризации увеальной меланомы по ИГХ-экспрессии маркеров эндотелиальных клеток CD31 и CD34.....	83
4.3 Изучение ИГХ-экспрессии молекулярного маркера VEGF в увеальной меланоме.....	88
4.4 Изучение экспрессии рецептора VEGFR-2/Flk-KDR-1.....	94
4.5 Изучение экспрессии рецептора VEGFR-1/Flt-1.....	95

<b>ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ АНГИОГЕНЕЗА.....</b>	<b>102</b>
5.1 Оценка количественных показателей экспрессии молекулы VEGF опухолевыми клетками и эндотелием опухолевых сосудов в качестве предиктора прогноза клинического течения увеальной меланомы .....	104
5.2 Оценка количественных показателей экспрессии рецептора молекулы VEGF - Flt в качестве предиктора прогноза клинического течения увеальной меланомы .....	114
5.3 Оценка количественных показателей экспрессии рецептора молекулы VEGF – VEGFR-2/Flk-KDR-1 в качестве предиктора клинического прогноза при увеальной меланоме .....	117
5.4 Корреляционная оценка достоверности маркеров в ближайшем и отдаленном прогнозе...	118
5.5 Оценка возможностей мультиплексной проточной цитометрии с определением количественных показателей молекул ангиогенеза в стекловидной жидкости как альтернатива иммуногистохимического метода.....	120
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>121</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>134</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>136</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>137</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>138</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность и степень разработанности темы

Увеальная меланома (УМ) составляет менее 0,5% в спектре опухолей человека и менее 5% среди всех типов меланомы, поэтому по праву считается редкой. При этом она доминирует среди опухолей хориоидеи: ее доля достигает 60% [2, 6, 9, 13, 16, 19, 28, 33, 50, 68, 213, 223].

За последние 50 лет, благодаря инновационным молекулярным и генетическим технологиям наши знания о патогенезе УМ существенно обогатились. Мы стали лучше понимать процессы прогрессирования и метастазирования. Международными исследованиями на большом количестве больных было доказано, что 5-летняя выживаемость больных УМ варьируется от 25 до 97 % и зависит от стадии заболевания [149] и присутствия индивидуального набора факторов риска [214].

Радикальные местные методы лечения УМ признаны эффективными, но частота дистантных метастазов остается стабильно высокой. При выявлении отдаленных метастазов витальный прогноз резко ухудшается [151]. С момента выявления метастазов выживаемость составляет 4–15 месяцев [141]. Заметим, за последние тридцать лет наблюдений она практически не изменилась [35, 36]. Предпринимаются попытки контроля роста и замедления метастазирования с помощью таргетной и иммунной терапии [18, 25, 29]. Эффективность этих лечебных технологий оценена при диссеминировании УМ; но ни одна из них не изменила ситуацию кардинально. Мета-анализ 29 исследований, проведенных в период с 1988 по 2022 г., показал, что общая выживаемость и средняя продолжительность жизни больных с метастазами УМ за эти годы не изменились, независимо от технологии локального и системного лечения [25, 219].

Это свидетельствует об отсутствии четкого и эффективного способа прогнозирования и раннего выявления метастазов [13, 30, 36, 204], а также об отсутствии эффективных лечебных технологий, тормозящих или блокирующих этот процесс. Между тем, единичные публикации с описанием случаев высокой продолжительности жизни пациентов с диссеминированной стадией УМ на фоне системного лечения метастазов обосновывают дальнейший поиск мишеней для таргетной терапии.

В сосудистой оболочке, из меланоцитов которой развивается УМ, нет базальной мембраны, поэтому УМ находится в тесном прямом контакте с кровеносными сосудами, что открывает широкий путь к гематогенному метастазированию [163]. В этом аспекте УМ, метастазирующая исключительно (!) гематогенным путем, с ее избирательным органотропным характером метастазирования (88% в печень), становится привлекательной моделью для

изучения особенностей опухолевого ангиогенеза и его роли в метастазировании. Это объясняет не снижающийся интерес к изучению ангиогенеза УМ [63].

Прогнозирование исходов заболевания – важная составляющая работы офтальмоонколога с пациентом. По результатам опроса, проведенных T. Veran и S. Cook, 97% пациентов с УМ хотели бы знать о риске развития у них метастазов даже в отсутствие возможности профилактики или технологий улучшения витального прогноза [18, 19, 39]. Степень риска определяет настороженность пациента и мотивирует его на частые визиты к врачу и скрининг организма на скрытые метастазы. Точность прогноза способствует ранней диагностике метастазов и своевременному направлению на хирургическое лечение (в случае изолированного одиночного метастаза в печени) или таргетную терапию при множественных метастазах.

Факторами высокого риска развития метастазов признаны пожилой возраст, большой диаметр основания и толщина опухоли, вовлечение цилиарного тела, экстрасклеральное расширение, поздние стадии заболевания (T4 хуже T3), эпителиоидноклеточный тип, высокая митотическая активность и высокая плотность сосудов в единице площади (MVD), молекулярно-генетический профиль УМ [61, 68, 83, 84, 87, 121, 136, 189, 211, 215, 217, 218]. Однако эти традиционные клиничко-морфологические особенности опухоли, ассоциированные с плохой выживаемостью в первые 5 лет после энуклеации, не влияют на выживаемость в отдаленном прогнозе [38, 76]. Эксперты объясняют это тем, что после выбывания больных УМ с характеристиками, ассоциированными с ранней смертностью после энуклеации, остается однородная группа, вероятность выживания которой определяется уже другими факторами или другой комбинацией, такой, например, как пол и статус хромосом. Однако генетические исследования не всегда и не везде возможны. Они финансово затратны и требуют присутствия соответствующих специалистов и оборудования. Альтернативой молекулярно-генетическим методам служат иммуно-гистохимические (ИГХ) методы исследования, ставшие обязательным этапом морфологической диагностики опухолей органа зрения. Сегодня, возможности ИГХ расширились за счет появления молекулярно-биологических маркеров, позволяющих осуществлять не только верификацию опухоли, но и прогнозировать исход онкологического процесса и/или ответ на лечение, а также подбирать оптимальную таргетную терапию. Это стало возможным, благодаря последним достижениям в области молекулярной биологии, генетики и онкологии, расшифровке ключевых этапов канцерогенеза. Так, были раскрыты механизмы контроля клеточного деления и смерти, а также поддержания генетической стабильности клетки. Изучена роль отдельных механизмов и контролирующих эти механизмы молекулярно-биологических маркёров (p53, bcl-2, ki-67, c-kit, baх и др.) [4, 5, 8, 13, 21-26, 28, 31, 36, 37, 40, 55]. Установлено, что количественный анализ экспрессии этих белков в опухолях является важным показателем, характеризующим степень ее

агрессивности и вероятность ее метастазирования. В этом аспекте особый научно-практический интерес представляют молекулярные маркеры ангиогенеза. Экспериментально доказано, что необходимым условием для метастазирования УМ, является развитие в ней собственной сети сосудов [5, 10, 16, 18, 96, 100]. В отсутствие кровоснабжения опухоль не метастазирует и даже изредка регрессирует [8]. При этом аваскулярный пролиферат сохраняет свой митотический и метастатический потенциал на всем протяжении жизни пациента [101]. Ситуация стремительно меняется в условиях стимуляции ангиогенеза факторами роста [18]. Описаны случаи развития дистантных метастазов спустя 40 лет после энуклеации глаза с УМ [16]. В этом аспекте, изучение молекулярных этапов ангиогенеза и оценка его роли в отдаленном периоде наблюдения становится приоритетным направлением.

Ключевым фактором запуска ангиогенеза в опухолях признан фактор роста эндотелия сосудов (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) [96, 184]. VEGF стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток (ЭК), активирует гены протеолиза межклеточного матрикса в опухоли. Современные стратегии противораковой терапии, рассматривают злокачественные опухоли как своеобразный симбиоз двух типов клеток - опухолевой популяции и популяции эндотелиальных клеток. Поэтому, в лечение УМ, наряду с препаратами, направленными на разрушение опухолевых клеток, включают антиангиогенную терапию, направленную на блокирование активности VEGF. В связи с чем, особенности экспрессии этой молекулы, а также рецепторов к ней (Flt, flk), в совокупности определяющих ангиогенный фенотип опухоли, изучение роли этих факторов в клиническом и витальном прогнозе, представляют несомненный научно-практический интерес.

**Цель работы:** разработка прогнозирования клинического течения УМ на основе иммуногистохимических маркеров ангиогенеза.

**Основные задачи работы:**

1. Провести ретроспективный анализ клинико-морфологических факторов риска развития метастазов УМ с оценкой их достоверности и надежности как предикторов ближайшего и отдаленного прогноза.
2. Изучить ангиогенез УМ с помощью морфологических (MVD) и иммуногистохимических (ИГХ) маркеров (CD31, CD34, VEGF, Flt, Flk) во взаимосвязи со стадией заболевания, толщиной, диаметром основания опухоли и типом клеточного строения.
3. Представить сравнительный анализ корреляционных связей клинико-морфологических показателей и ИГХ маркеров с ближайшим и отдаленным прогнозом выживаемости больных УМ.

4. Разработать регрессионные модели УМ с формулой расчета вероятности развития и срока появления первого метастаза УМ на основе комбинации персонализированных клинико-морфологических показателей и ИГХ предикторов ангиогенеза.

5. Раскрыть возможности применения проточной цитофлуориметрии в комплексной количественной оценке про- и антиангиогенных молекул в стекловидной жидкости глаз с УМ в качестве технологии, альтернативной ИГХ-методу.

### **Научная новизна работы**

Впервые выполнена комплексная сравнительная оценка информативности, надежности и достоверности клинико-морфологических показателей и ИГХ-маркеров ангиогенеза в ближайшем (12 мес., 3 года) и отдаленном (5 и  $\geq 10$  лет) прогнозе при УМ и доказан приоритет ИГХ предикторов ангиогенеза в отдаленном прогнозе.

Впервые представлены результаты корреляционного анализа ИГХ-маркеров ангиогенеза со стадией заболевания, толщиной, объемом, диаметром основания и типом клеточного строения опухоли у больных УМ.

Раскрыты возможности мультиплексной цитофлуориметрии в количественной оценке показателей ангиогенеза в стекловидной жидкости глаз с УМ и продемонстрированы высокие концентрации проангиогенных белков (VEGF:  $471,5 \pm 154,7$  пг/мл; ангиогенин:  $11704,9 \pm 1767,7$  пг/мл), а также плюрипотентных белков с провоспалительными эффектами (ИЛ-8:  $323,2 \pm 227,9$  пг/мл; FGFb:  $44,6 \pm 16,3$  пг/мл), что позволяло предложить ее в качестве альтернативы ИГХ-методу.

**Теоретическая значимость работы** заключается в разработке регрессионных моделей заболевания с формулами расчета для прогнозирования клинического течения УМ на основе представленных доказательств точности и надежности молекулярных маркеров ангиогенеза в качестве предикторов ближайшего и отдаленного прогноза.

**Практическая значимость работы** заключается в разработке рекомендаций по прогнозированию клинического течения УМ после энуклеации.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

Надежность и точность прогнозирования клинического течения УМ зависит от сложившейся персонализированной комбинации клинико-морфологических факторов риска и ИГХ-предикторов ангиогенеза (интенсивность экспрессии и количество VEGF позитивных опухолевых и эндотелиальных клеток, ядерной и цитоплазматической экспрессии рецепторов Flt и Flk).

Особенности ангиогенеза (фенотип) определяют вероятность развития неблагоприятного исхода УМ во все сроки наблюдения; прогностически неблагоприятными являются более 50 % VEGF позитивных опухолевых клеток ( $p=0,0001$ ) и/или  $>30$  % VEGF позитивных эндотелиальных клеток ( $p=0,001$ ),  $\geq 50\%$  Flk позитивных клеток ( $p=0,0001$ ),  $> 50$  Flt позитивных клеток с ядерной ( $p=0,001$ ) и цитоплазматической ( $p=0,001$ ) рецепцией на срезе УМ.

#### **Апробация работы и публикации**

Материалы работы доложены на научно-практической конференции с международным участием «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии» (31.03-1.02.2023г, г Казань), на международной конференции «Лига молодых офтальмологов» (7.04.2023г, г Уфа); на конференции «Апрельские диспуты» (15.04.2023г, Москва).

Диссертация апробирована на кафедре офтальмологии АПО ФГБУ ФНКЦ ФМБА России (24.05.2023г.).

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 6 статей, опубликованных в ведущих рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

#### **Объем и структура диссертации.**

Диссертация изложена на 154 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материал и методы исследований», трех глав, отражающих результаты собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 60 рисунками, 85 таблицами. Список литературы содержит 225 источников, из которых 40 – отечественных авторов и 185 – иностранных.

## ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ (обзор литературы)

Увеальная меланома (УМ) составляет 80% от так называемых «меланом глаза» и 5% меланом всех локализаций [10, 61, 211, 223]. В США заболеваемость УМ составляет 5 человек на миллион населения [223], в Европе - варьируется от 2 до 8 на миллион населения, уменьшаясь с севера на юг [215]. Инновационные лучевые методы органосохраняющего лечения улучшили показатели локального контроля опухоли и повысили шансы на остаточное зрение, однако выживаемость все еще остается неизменно низкой [2, 10, 25, 30, 134]. Практически 50% пациентов с УМ продолжают умирать в течение 10 лет после постановки диагноза, независимо от используемой лечебной технологии – органосохраняющего лечения или энуклеации [114, 115, 151]. УМ – чрезвычайно агрессивная опухоль, метастазы которой распространяются поистине с «космической скоростью», а средняя выживаемость больных после развития метастазов скудна и не превышает 12 месяцев [10, 21, 28, 34, 61, 124, 202]. Имеются лишь единичные сообщения о долгосрочной выживаемости [83, 84, 87]. Однако, несмотря на все еще низкие показатели, средняя выживаемость больных, получивших антиметастатическое лечение, превышает показатели нелеченых больных с генерализованной стадией УМ [25, 36, 58, 120, 121, 223].

По результатам опросов, проведенных Т. Veran и S. Cook с соавт. [54, 69], 97% больных УМ хотели бы знать о своем прогнозе и риске развития метастазов, даже в случае невозможности улучшить исход. Помимо психологического и юридического значения, уточнение прогноза способствует раннему выявлению метастазов с последующим проведением таргетной терапии [39, 199]. Маркеры неблагоприятного витального прогноза при УМ и их прогностическое значение проанализировано и представлено в литературе [11, 13-15, 21, 25, 27, 28, 31, 34, 38, 39, 42, 48, 50, 53, 54, 59, 70, 73, 75, 93, 102, 117, 136, 138, 144-147, 163-166, 172-175, 179, 187, 188, 192, 197, 215, 202, 211, 212, 218]. Все эти маркеры условно разделены на клинические, морфологические, молекулярные и генетические (см ниже).

### 1.1 Клинические и морфологические маркеры прогноза УМ

#### Клинические маркеры

- ✓ Пожилой возраст на этапе манифестации УМ,
- ✓ Мужской пол пациента,
- ✓ Большой диаметр основания,
- ✓ Толщина опухоли,
- ✓ Вовлечение цилиарного тела
- ✓ Диффузная форма УМ

- ✓ Ассоциация с окулодермальным меланоцитозом
- ✓ Экстраокулярный выход
- ✓ Продвинутая стадия заболевания по AJCC (8 редакция)

### Морфологические маркеры

- ✓ Эпителиоидный тип строения
- ✓ Высокая митотическая активность /молекулярные маркеры PC-10 /Ki-67
- ✓ Высокие показатели среднего диаметра 10 крупнейших ядер
- ✓ Высокая плотность микрососудов в ед. площади среза опухоли
- ✓ Микрососудистые петли и паттерны
- ✓ Изобилие инфильтрирующих опухоль лимфоцитов
- ✓ Изобилие инфильтрирующих опухоль макрофагов
- ✓ Высокая экспрессия фактора роста IGF-1R
- ✓ Высокая экспрессия молекул HLA класса I и II

### Цитогенетические маркеры

- ✓ Аберрации в хромосоме 3 – теряется (моносомия 3)
- ✓ Аберрации в хромосоме 8 – моносомия 8 (утрата хромосомы) и трисомия 8 (добавляется)
- ✓ Аберрации в хромосоме 1p (утрата)
- ✓ Аберрации в хромосоме 6q (утрата)

### Транскриптомные маркеры

- ✓ Генно-экспрессионный профиль класс 2

**Клинические маркеры.** Клинические признаки, позволяющие прогнозировать витальный прогноз УМ, включают возраст на момент обращения, пол, размеры и расположение опухоли в глазу (синоним: локализация), конфигурацию опухоли, наличие окулярного / окулодермального меланоцитоза (ОМ), экстраокулярное распространение опухоли (ЕОЕ) и стадию заболевания по классификации Американского объединенного комитета по Классификации рака (AJCC, 8 редакция) [49, 50, 52, 55, 83, 136, 141, 148, 151, 220].

**Возраст на момент обращения.** Информация о значении возраста противоречива. Одни авторы утверждают, что возраст не влияет на прогноз УМ [49, 52, 189]. Другие демонстрируют лучший витальный прогноз у детей с УМ по сравнению со взрослыми пациентами. [136, 155, 196, 211-221]. В порядке объяснения этого феномена была предложена гипотеза **смещения вторичных факторов риска**, таких как, более высокий процент меланом радужки и меньший размер опухоли при постановке диагноза, редкая частота экстраокулярного роста и более короткая продолжительность наблюдения за детьми по сравнению со взрослыми [196, 216]. Для

преодоления этих мешающих анализу факторов исследователи попытались совместить предикторы метастазирования, такие как пол, расположение опухоли, базальный диаметр и толщину опухоли, экстраокулярный выход и продолжительность наблюдения в каждой возрастной категории (молодые  $\leq 20$  лет, лица среднего возраста -21-60 лет, пожилые  $> 60$  лет,  $n=121$ ). Показано, что, действительно, молодой возраст на этапе диагностики УМ коррелирует с более низкой скоростью метастазирования по сравнению с пожилым возрастом [141]. Shields С., проанализировав данные 8933 больных с УМ, показала повышение риска метастазирования с возрастом. При 10 летнем сроке наблюдения метастазы развивались у 10% пациентов в возрасте 11-20 лет, 21% - в возрасте 41-50 лет и 30% - в возрасте 71-80 лет [215].

**Гендерная принадлежность** в качестве факторов риска также дала противоречивую информацию. Так, 3 исследовательские группы, включая COMS, не обнаружили различий в частоте метастазов среди мужчин и женщин с УМ [55, 152, 217]. Zloto *et al.*, анализируя данные 723 пациентов с УМ, обнаружил, что кумулятивная частота смертности, связанной с УМ, среди мужчин в первые 10 лет после постановки диагноза в 2 раза превышает женскую смертность. Хотя существенных гендерных различий в отношении возрастного распределения, размеров опухоли или частоты рецидивов не обнаружено. Исключение составила локализация: у мужчин УМ чаще располагалась кзади от экватора [222]. Rietschel *et al.* пришел к аналогичному заключению методом многомерного регрессионного анализа [198].

Гендерные различия показателей смертности при УМ традиционно привели к умозаключению о связи с гормонами [130]. По гипотезе Zloto эстроген косвенно влияет на УМ через регуляцию других меланома-ассоциированных факторов, в частности, может ингибировать рост микрометастазов в печени [130]. Роль гормонов в оценке риска злокачественной трансформации меланоцитов и при УМ изучали в основном по течению УМ у беременных. Информация не однозначная. Представляет интерес многоцентровое исследование с оценкой влияния гормонального статуса на развитие УМ, проведенное в 9 европейских странах [154]. В работе проводили опрос 293 пациентов (165 мужчин и 128 женщин) с УМ, а также 3198 здоровых лиц (2121 мужчина и 1077 женщин). Данных об ассоциации риска развития УМ с особенностями гормонального статуса, приемом гормональной терапии или оральных контрацептивов не получено [154]. К. Egan с соавт., обследовав 1818 больных с УМ (905 мужчин/913 женщин, из них 748 рожавших/165 нерожавших), показали, что 10-летняя выживаемость среди рожавших женщин лучше (69 %), чем у мужчин (61 %) и нерожавших женщин (59 %) ( $p = 0,02$ ) [90]. Таким образом, согласно его заключению, течение УМ у пациенток репродуктивного возраста, забеременевших или принимавших гормональные препараты на фоне лечения УМ, и гормональный статус в целом не влияют на развитие метастазов УМ [90]. J. Seddon с соавт.(1982), наблюдая пациентов с УМ, из них 5 беременных

женщин, в том числе одну пациентку с 2 беременностями, наступившими одна за другой; и перенесшую энуклеацию по поводу УМ, также не обнаружил статистически значимой разницы в выживаемости мужчин и женщин с УМ [210]. E. Holly с соавт. пришли к выводу об отсутствии связи гормонов с течением УМ, подойдя к проблеме через прием гормональных контрацептивов [130]. Их оппоненты, напротив, полагали, что беременность и ассоциированные с ней гормональные, метаболические и иммунологические изменения могут негативно влиять на течение УМ [150]. Худший прогноз для беременных больных УМ подтвердила M. Pilas-Pomykalska [195]. Было предложено несколько гипотез, объясняющих агрессивное течение УМ у беременных. Известно, что во время беременности повышается уровень эстрогена. Предположительно случаи агрессивного течения УМ у беременных обусловлены рецептор-лигандным эффектом эстрогена в ткани опухоли.

Рецепторы эстрогена (ERR)  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  относятся к суперсемейству ядерных рецепторов, выполняющих разные функции. Они играют важную роль во время беременности, включая имплантацию эмбриона, развитие плода и плаценты. Тандем ER и ER $\alpha$  регулирует ряд генов [90], модулируя активность ER в различных тканях, включая молочную железу, матку и кости [223]. Они также участвуют в прогрессировании некоторых типов рака, например, рака молочной железы [117]. Поэтому вполне закономерен поиск ER в УМ. Однако цитохимическими методами на срезах УМ рецепторов к эстрогену не удалось обнаружить [57, 110, 123, 159, 166]. С.В. Саакян с соавт. изучали экспрессию рецепторов эстрогена и прогестерона методом иммуноцитохимии в 22 образцах УМ (8 мужчин/14 женщин), среди которых одна пациентка была на 18 неделе беременности. Авторы не выявили рецепторов к гормонам в УМ [29-31]. Отсутствие рецепции к эстрогену и прогестерону подтвердил J. Shields с соавт., изучив образцы УМ 16 беременных пациенток (средний возраст 30 лет, период гестации — 6 мес) [214].

T. Makitie и соавт., изучив методом ИГХ экспрессию РЭ в 23 образцах первичной и 24 образцах метастатической УМ с помощью моноклональных антител (MAb) 1D5, не выявили положительную ИГХ реакцию на РЭ ни в одном из случаев [159]. Schoenfield et al. тем же методом ИГХ, а также генетическим методом (The Cancer Genome Atlas Project) продемонстрировал ER в УМ [205, 206]. Экспрессия ER(+) выявлена в общей сложности в 71% УМ (n=86) эпителиоидного и смешанно-клеточного строения с плохим прогнозом [205, 206]. Опухоли, гиперэкспрессирующие ER, имели генетически плохие прогностические признаки (потеря VAP1 и моносомия хромосомы 3). Однако, несмотря на связь ER<sup>+</sup> с плохими прогностическими генетическими характеристиками, когорта из 52 пациентов не продемонстрировала значимой связи между наличием ER и клиническим исходом заболевания, возможно, из-за небольшого размера выборки [206].

**Размеры опухоли** (наибольший диаметр основания и толщина) признаны одним из наиболее важных прогностических признаков УМ [36, 50, 74, 75, 109, 213]. В мета-анализе Diener-West *et al.*, 5-летняя смертность, связанная с УМ, составила 16% для небольших опухолей (толщина  $\leq 3$  мм и диаметр  $\leq 11$  мм), 32% для средних опухолей (толщина 3-8 мм и диаметр  $\leq 16$  мм) и 53% для больших опухолей (толщина  $> 8$  мм и диаметр  $> 15$  мм) [83]. Анализ 5, 10 и 12 летних наблюдений группы экспертов COMS показал 10%, 18% и 21% смертность для пациентов, получивших брахитерапию, и 11%, 17% и 27% после энуклеации УМ среднего размера, толщиной от 2,5 до 10 мм и диаметром  $< 16$  мм [85]. При больших УМ (толщина  $> 10$  мм или толщина  $> 2$  мм и  $> 16$  мм диаметр) по данным COMS, смертность от меланомы через 5 и 10 лет составила 28% и 40%, соответственно, в группе энуклеации и 26% и 45% в группе с дистанционным облучением, предшествующим энуклеации [206]. В долгосрочном наблюдении за когортой из 289 пациентов с УМ Kujala *et al.* подтвердил связь между **наибольшим базальным диаметром (МБД) опухоли и смертностью**, связанной с УМ [154]. С помощью регрессионного анализа конкурирующих рисков соотношение рисков составило 1,08 на каждый миллиметр увеличения диаметра опухоли. Кумулятивные оценки 25-летней смертности от УМ увеличивались с увеличением базального диаметра опухоли с 18% для небольших опухолей ( $< 10$  мм в диаметре), 52% для средних (диаметр 10-15 мм) до 59% для опухолей с  $\geq 16$  мм в диаметре [83].

Shields *et al.*, проследила исход 8033 пациентов с УМ и показала, что **увеличение толщины УМ** также ассоциируется с повышением риска метастазирования [218]. Частота метастазирования по Каплан-Мейеру через 5, 10 и 20 лет составила 6 %, 12% и 20% для УМ толщиной  $< 3$  мм, 14%, 26% и 37% для опухолей среднего размера (3,1-8 мм) и 35%, 49% и 67% для больших УМ ( $> 8$  мм) соответственно. Увеличение толщины опухоли на 1 мм повышает риск метастазирования на 5% каждые 10 лет, коэффициент повышения риска составил 1,08 [218].

### **Расположение (локализация) опухоли**

**Радужка.** Прогноз при меланоме радужки лучше, чем при меланоме цилиарного тела [200, 221]. В исследовании с участием 8033 пациентов с УМ, метастазы через 5 и 10 лет составили 4% и 7% для меланомы радужки, 19% и 33% для меланомы цилиарного тела и 15% и 25% для меланомы хориоидеи, соответственно [221]. Более низкая частота метастазирования меланомы радужки связана с более низкой биологической активностью или меньшим размером опухолей радужной оболочки [218, 220]. Таким образом, 10-летняя частота метастазирования меланомы радужки в 5 раз меньше показателей цилиарной меланомы и в 4 раза меньше показателей меланомы хориоидеи [218, 220]. McLean I.W. проанализировал 3432 случаев УМ и

показал, что при меланоме радужки смертность в 10 раз реже, чем при цилиарной меланоме и хориоидальной меланомы [173].

**Цилиарное тело.** Пациенты с цилиарной меланомой толщиной более 7 мм в 2,5 раза чаще погибали от метастазов, чем пациенты с соразмерной по толщине опухолью хориоидеи [124]. Кроме факта вовлечения цилиарного тела, имела значение протяженность его охвата УМ (% от основания опухоли, находящийся в цилиарном теле). Согласно данным Li *et al* меланома цилиарного происхождения (> 50% основания опухоли в цилиарном теле) в 1,6-2,3 раза чаще метастазирует, чем хориоидальная (<50% основания опухоли в пределах цилиарного тела) меланома [156]. Опухоли со 100% поражением цилиарного тела в 3,6 раза чаще метастазируют, чем хориоидальная меланома [77]. Плохой прогноз меланомы цилиарного тела эксперты объясняют большим размером опухоли на этапе первичной диагностики (из-за плохого доступа к визуализации), склонностью к моносомии 3 и 8q и характерным микрососудистым паттерном опухоли [77, 169, 197, 201]. Таким образом, вовлечение цилиарного тела в неопластический процесс при УМ признано независимым предиктором плохой выживаемости в нескольких многомерных моделях [152, 160, 161, 171, 189, 201].

**Диффузная форма** - опухоль с горизонтальным плоскостным характером роста. Встречаются диффузные меланомы радужки, анулярные меланомы, растущие вдоль угла передней камеры, кольцевидные меланомы цилиарного тела и диффузные меланомы хориоидеи [188]. Диффузная меланома радужки встречается в 11% случаев [48, 49, 50, 108, 200]. По сравнению с узловой меланомой этой локализации она несет больший метастатический потенциал. При 6-летнем сроке наблюдения за 25 случаями диффузной меланомы радужки метастазы развились в 13% случаев [108] против 4% при узловой меланоме радужки [91, 200, 219]. Более частое метастазирование диффузной меланомы радужки объясняют частым эпителиоидноклеточным строением, офтальмогипертензией, врастанием в корневую зону и угол передней камеры, быстрым экстраокулярным расширением [81, 82, 219, 221].

Кольцевидная меланома цилиарного тела - редкий тип УМ, встречается реже, чем в 1% случаев [81, 82] Метастазирование наступает в 52% при 5-летнем наблюдении [81] по сравнению с 19% при узловой форме меланомы цилиарного тела [82]. Плохой прогноз в случаях кольцевой меланомы цилиарного тела объясняется поздней диагностикой [219].

Диффузная меланома хориоидеи (МХ) составляет 3-17% всех меланом хориоидеи. [219] Диффузная МХ несет повышенный риск метастазирования, несмотря на плоский рост [223]. Сравнительный анализ по Каплан-Мейеру частоты метастазирования диффузной и узловой МХ (n=2121) составил 8% против 4% через 5 лет и 17% против 10% через 10 лет [219] Плохой прогноз при диффузной МХ объяснен поздней диагностикой, большой пропорцией эпителиоидных клеток и высокой тенденцией к экстраокулярному расширению [108, 218-221].

**Окулодермальный меланоцитоз (ОМ)** признан фактором повышенного риска развития УМ. Встречается в 1 случае из 400 больных УМ [220]. Связь ОМ с прогнозом УМ изучали в нескольких исследованиях [167, 220]. В исследовании, охватившем 7872 пациентов с УМ, лица с ОМ имели вдвое больший риск метастазирования по сравнению с теми, у кого ОМ отсутствовал [220]. Частота метастазирования по Каплан-Мейеру при ОМ составила 27% против 15% при УМ без ОМ через 5 лет и 48% против 24% через 10 лет [220]. После стратификации данных по возрасту, полу, толщине и диаметру опухоли, локализации эпицентра опухоли и локализации переднего края опухоли частота метастазирования по Каплан-Мейеру в группе ОМ через 5 и 15 лет составили 27% и 59% (соответственно) против 15% и 33% при УМ без ОМ [167].

**Экстраокулярное распространение (ЭОР)** - плохой прогностический фактор для УМ, встречается в 8-15% случаев [42, 72, 129, 185]. ЭОР ассоциируется с более крупными опухолями, передним их расположением (до экватора), большим диаметром опухоли, диффузным характером роста, эпителиоидно-клеточным строением, особым сосудистым фенотипом с закрытыми сосудистыми петлями, высокой скоростью митоза и моносомией 3, что в комплексе ухудшает прогноз выживаемости [42, 72, 124, 125, 129, 185, 223]. Полагают, что выживаемость ассоциируется, скорее, с характеристиками внутриглазной порции опухоли, чем с самим фактором ЭОР, за исключением случаев, когда размер ЭОР превышает 5 мм [185]. В исследовании с участием 610 больных УМ, 5-летняя смертность при макроскопическом расширении (> 5 мм) и небольшом ЭОР (до 5 мм) составила 37% против 24%, соответственно; а при большем ЭОР достигали 78 % [185].

**Стадия увеальной меланомы как маркер прогноза.** Американский объединенный комитет по классификации рака (AJCC) объединил клинические прогностические факторы в единую систему классификации [221]. В ней меланома радужки классифицируется в зависимости от характера распространения, наличия вторичной глаукомы и ЭОР. МХ и меланома цилиарного тела классифицируются в соответствии с диаметром и толщиной опухоли, а также ЭОР [221]. Пациенты с **более продвинутой стадией** по AJCC имеют худший прогноз [221]. Так, при определении стадии заболевания по классификации AJCC для меланом радужки I стадии, 10-летняя частота метастазирования составила 2%, для II стадии - 6%; для III стадии - 41% [221]. При МХ с **категорией T1** по классификации AJCC, 10-летняя частота метастазов составляла 15%, 25% для T2, 49% для T3 и 63% для T4. [63] **С возрастанием категории T опухоли на 1 позицию риск метастазирования и смертность увеличивались в 2 раза** [220]. По другим данным для задней (постэкваториальной) УМ, 10-летняя частота метастазирования составила 12% для опухолей стадии I, 29% для стадии II и 61% для стадии III.

Таким образом, с каждой последующей стадией меланомы риск метастазирования и смерти увеличивается в 3 раза [220].

## 1.2 Морфологические маркеры прогноза

**Морфологические маркеры**, позволяющие прогнозировать исход УМ, включают клеточный тип опухоли, ее митотическую активность, средний диаметр 10 крупнейших ядрышек, микроваскулярную плотность (MVD), внесосудистые структуры матрикса, количество инфильтрирующих опухоль лимфоцитов и макрофагов, экспрессию инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) и его рецептора (IGF-1R), принадлежность к HLA классу I [3, 5, 8, 10, 16, 25, 28, 29, 34, 39, 46, 51, 56, 168].

**Тип опухолевых клеток.** Доминирующий тип клеток в УМ - важный прогностический фактор. Callender предложил систему классификации УМ, выделяя веретенноклеточный тип А и В, эпителиоидноклеточный, смешанноклеточный, фасцикулярный и некротический типы [59]. Позднее эта классификация была упрощена, остались веретенноклеточный тип А и В, эпителиоидноклеточный и смешанноклеточный тип УМ [168]. Модифицированная классификация Callender показала более сильную корреляцию между доминирующим типом клеток в УМ и смертностью [168]. В когорте из 2652 больных УМ 15-летняя смертность при веретенноклеточном типе А составила 19%, веретенноклеточном типе В - 26%, смешанноклеточном - 59%, а эпителиоидноклеточном - 72% [189]. 15-летняя смертность пациентов с УМ смешанноклеточного типа в 3 раза превышала показатели веретенноклеточных УМ [189]. Исследования подтвердили, что веретенноклеточная УМ имеет лучший прогноз, чем смешанно-клеточная и эпителиоидно-клеточная [72, 114, 115, 169, 209, 212]. Прогноз ухудшается с увеличением количества эпителиоидных клеток в поле зрения под микроскопом (HPF, ув. 400) [210]. По данным Seddon JM 10-летняя выживаемость составила 82% среди больных УМ с эпителиоидными клетками  $<0,5$ , 55% для эпителиоидных клеток от 0,5 до 4,9 и 33% у пациентов с  $> 5$  эпителиоидными клетками [209]. Таким образом, неблагоприятными факторами, ведущими к раннему метастазированию при УМ, принято считать эпителиоидный и смешанноклеточный типы опухоли, большие размеры, наличие признаков инвазивного роста, массивные некрозы и кровоизлияния в опухоль, а также возраст пациентов 61-70 лет.

**Митотическая активность.** Активность пролиферации УМ определяют путем подсчета митозов на увеличении  $\times 40$  HPF. Опухоли с низкой митотической активностью имеют лучший прогноз по сравнению с опухолями с высокой митотической активностью [171]. Показано, что увеличение количества митозов / 40 HPF прямо коррелирует с увеличением смертности: 6-летняя смертность составила 16% для УМ с отсутствием митозов, 23% для 1 митоза, 40% для 2-4 митозов, 47% для 5-8 и 56% для 9-48 митозов [168].

---

**Средний диаметр десяти крупнейших ядрышек.** Большой средний диаметр десяти крупнейших ядрышек (MLN) в клетках опухоли коррелирует с плохим прогнозом [45, 169, 170, 177]. MLN измеряют на срезах, окрашенных серебром или гематоксилин-эозином. Более крупные MLN чаще обнаруживаются в эпителиоидноклеточных УМ и/или в УМ с высокой плотностью сосудов, что совокупно ухудшает прогноз [170, 177]. Однако показано, что более крупные MLN являются **независимым предиктором** меланомы-ассоциированной смертности [170, 177]. Смертность от УМ увеличивается в 0,58–1,27 раза на каждый 1 мкм прироста MLN [45, 133, 170, 177]. При анализе значения MLN (медиана - 4,05 мкм; диапазон 2,60-6,18 мкм, n=167) в УМ 10-летняя оценка специфической выживаемости при УМ по Каплан-Мейеру составила 74% для малых, 60% для средних, и 42% для больших MLN [45]. MLN продемонстрировал свой статус независимого предиктора прогноза после корректирования и устранения роли других, влияющих на выживаемость показателей, таких как, вовлечение цилиарного тела, наибольший диаметр основания опухоли, присутствие эпителиоидных клеток, а также микрососудистых петель и др. Однако лучше всего предсказывает выживание при УМ комплекс показателей: MLN + тип строения + MVD [45].

Таким образом, многолетние многоцентровые международные исследования на большом количестве клинического материала, выполненные группой экспертов высочайшего уровня (группа COMS), выявили клинические, морфологические и цитогенетические факторы риска метастазирования УМ, позволяющие идентифицировать пациентов с высоким риском развития метастазов. Отнесение пациентов к группе высокого риска позволяет мотивировать их к более частым визитам к врачу и выявить метастазирование на самой ранней стадии. В свою очередь, раннее выявление метастазов дает возможность радикального хирургического вмешательства. В настоящее время этот метод является единственным способом продления их жизни [12].

Низкие показатели выживаемости больных с генерализованной стадией УМ и не меняющиеся показатели 5- и 10-летней выживаемости за последние 30 лет свидетельствуют об отсутствии прорывных технологий таргетной терапии. С точки зрения онкологии принципиальное значение имеет выживаемость. Поэтому многие исследования сосредоточены на изучении связи экспрессии различных молекулярных маркеров с выживаемостью. В этом аспекте поиск новых надежных прогностических факторов важен, поскольку потенциальные прогностические маркеры в будущем могут стать мишенью таргетной терапии. В перспективе они, вероятно, автоматически станут кандидатами на профилактические/терапевтические адьювантные и иммунные системные технологии антиметастатической терапии.

### **1.3 Молекулярные маркеры прогноза**

Молекулярные маркеры, используемые в молекулярной диагностике злокачественных новообразований, можно разделить на биохимические, иммуногистохимические и

молекулярно-генетические. Большая часть биохимических онкомаркеров, вошедших в клиническую практику (РЭА, СА 19 9, СА 72 4), представляют собой белки, которые определяют в плазме крови, что облегчает получение материала для исследования, однако, удаленность маркера от опухолевого очага снижает его чувствительность и специфичность. Кроме того, концентрация таких маркеров может изменяться в крови в случае присутствия вторых опухолей другой локализации, а также, при воспалительных процессах организма [67].

### **Биохимические маркеры прогноза**

Профилирование белков сыворотки путем скрининга 84 различных белков, выполненное у 83 пациентов с диссеминированными и недиссеминированными стадиями УМ выявило 5 белков, связанных с прогнозом: лептин, остеоопонтин, програнулин, тенасцин С и DLL1 [218]. Было обнаружено, что низкие уровни лептина ( $< 5$  нг/мл (мужчины) и  $< 15$  нг/мл (женщины) в сыворотке и высокие уровни остеоопонтина ( $> 5$  нг/мл) выявляют пациентов с плохим прогнозом, и поэтому они были отобраны для включения в окончательный тест serUM-Px. С увеличением категории метастатического риска укорачивалась безметастатическая и снижалась общая выживаемость, возрастала кумулятивная частота смертности, связанной с УМ ( $p=0,007$ ,  $p=0,018$  и  $p=0,029$ , соответственно). В многомерной регрессии Кокса тест serUM-Px был признан полезным независимым предиктором метастазирования, наряду с размером опухоли и полом пациента в качестве ковариатов (отношение рисков 3,2, 95% ДИ 1,5-6,9). Последующее 20-летнее наблюдение показало, что этот простой тест предсказывал метастатическое заболевание за много лет до развития макрометастазов, в то время как большинство других тестов требовали повторных исследований и забора проб крови для выявления макрометастазов во время или непосредственно перед тем, как они становятся радиологически обнаруживаемыми [140]. Лептин изучен в различных типах опухолей, включая рак молочной железы, предстательной железы, толстой кишки и эндометрия, где он проявил себя фактором роста [57–61, 66, 85, 116, 131]. Лептин не только играет роль в потреблении пищи и энергетическом балансе, но также действует как провоспалительный адипокин с широким спектром активности, включая выработку цитокинов, клеточный иммунитет и ангиогенез [62–64, 92, 179, 180]. Лептин способствует росту опухоли, передавая сигналы через связь с рецепторами на нейронах гипоталамуса приводит к продукции тиреотропин-рилизинг-гормона (ТРГ) этими клетками [92]. Показано, что клетки меланомы экспрессируют ТРГ, который индуцирует пролиферацию этих клеток, объясняя его ростстимулирующие эффекты [92]. Остается неясным, почему при УМ лептин играет противоположную роль, повышенный уровень которого связан с защитным эффектом. Помимо повышенного уровня лептина, высокий ИМТ также связан с более низким уровнем адипонектина в плазме [95]. Было

показано, что низкий уровень адипонектина увеличивает риск метастазов УМ [213]. Кроме того, вырабатываемые печенью факторы роста IGF-1 и HGF/SF зависят от уровня физической нагрузки, стресса, питания и ИМТ, что может влиять на метастазирование, прогрессирование и возвращение опухолевых клеток в печень [69, 70, 89, 128]

#### 1.4 Цитогенетические маркеры, ассоциированные с прогнозом

Последние исследования подчеркнули значение генетических маркеров в прогнозе УМ. Аберрации в хромосоме 1, 3, 6 и 8 определяют выживаемость пациентов с УМ [132, 197]. Потеря хромосомы 3, увеличение 8q, потеря 1p и потеря 6q связаны с плохим прогнозом [75-77, 91, 132, 145, 146, 181, 182, 207]. Комплексный анализ взаимосвязи вышеперечисленных генетических изменений с клиническими и гистологическими особенностями УМ позволил выявить благоприятные и неблагоприятные в отношении витального прогноза молекулярно-генетические факторы.

**Хромосома 3.** Среди имеющихся аберраций моносомия хромосомы 3 (полная потеря одной копии хромосомы) доминирует в УМ и является наиболее важным прогностическим фактором [76, 77, 197, 216]. Частичные аберрации хромосомы, например, частичная делеция одной копии хромосомы 3 и изодизомия (потеря одной копии хромосомы 3, а затем дублирование оставшейся дефектной копии), несут свой метастатический потенциал [219]. В пределах одной и той же опухоли могут встречаться разные варианты моносомии 3. Schoenfield et al выявил моносомию 3 в основании УМ, а дисомию 3 - на вершине опухоли [207]. Моносомия 3 встречается в 21–56% случаев [197]. Трехлетняя смертность при моносомии 3 в УМ составляет 50% и 42-54% против 0% без моносомии 3 за период наблюдения от 2 до 8 лет. [74, 75, 145, 146, 216]. Наличие моносомии 3 указывает на высокий риск метастазирования. Моносомия 3 ассоциируется с клиническими и морфологическими факторами риска, включая большой диаметр опухоли, вовлечение цилиарного тела, эпителиоидный тип строения, высокую митотическую активность, сосудистые петли и ЭОР [77, 145, 146, 197, 208]. Роль моносомии 3 в снижении продолжительности жизни пациентов с УМ, а метилирования гена RASSF1A - в ее увеличении продемонстрировал Цыганков А.Ю. [35].

Недавно выявлен ген-супрессор опухоли - BRCA1-ассоциированный белок 1 (BAP1), картированный в хромосоме 3p21.1, его мутация связана с метастазированием УМ [126].

**Хромосома 8.** Среди аберраций в хромосоме 8 в 41–53% УМ встречается увеличение 8q, реже - потеря 8p [76, 145, 146, 181-183]. Наиболее распространенными формами увеличения 8q являются трисомия 8, изохромосома 8q и амплификация гена c-myc [209]. Увеличение хромосомы 8q является неблагоприятным прогностическим маркером УМ как в случае отдельного самостоятельного проявления, так и в случае сосуществования с моносомией 3.

[77]. Увеличение хромосомы 8q часто идет в тандеме с моносомией 3, по сравнению с простым увеличением 8q или простой моносомией 3. В случае указанного тандема прогноз хуже.

Damato *et al.* в когорте из 356 пациентов с УМ, не выявил аномалий хромосом 3, 8 в 42%, прироста 8q в 11%, моносомии 3 в 21% и комбинированного усиления 8q и моносомии 3 в 27% [77]. Пятилетняя смертность от УМ составила 6% в отсутствие хромосомных аномалий, 31% при увеличении только 8q, 40% при моносомии 3 и 66% при комбинированном приросте 8q и моносомии 3 [77]. Увеличение 8q было связано с клиническими и гистопатологическими факторами риска, включая больший диаметр опухоли, вовлечение цилиарного тела, эпителиоидный тип УМ, высокую скорость митоза и сосудистые петли [77].

**Хромосома 1.** Потеря части или всей хромосомы 1p связана с плохим прогнозом, когда она присутствует самостоятельно или сосуществует с моносомией 3 [145, 146]. Потеря хромосомы 1p чаще встречается в опухолях с моносомией 3 (40%), реже (10%) в опухолях с дисомией 3 [127]. Сочетанная потеря хромосом 1p и 3 имеет более сильную корреляцию с метастазами УМ, чем каждая из них по отдельности. При этом влияние моносомии 3 на выживаемость в значительной степени связано с изменениями в 1p36 [145]. При одновременной потере хромосом 1p36 и 3 вероятность развития метастазов в 7,8 раз выше, чем без этих потерь или с изолированной потерей хромосом 1p36 или 3 [146].

**Хромосома 6.** Увеличение хромосомы 6 имеет обратную связь с метастазами УМ, и улучшает прогноз. [201] Заметим, увеличение хромосомы 6p, как правило, исключает моносомию 3 [187, 211]. Полагают, что усиление 6p представляет собой отдельную группу УМ с альтернативным генетическим канцерогенезом по сравнению с таковым при моносомии 3 [91, 187] Сосуществование увеличения 6p и моносомии 3 встречается только в 4% УМ. [91]. Потеря хромосомы 6q, напротив, ухудшает прогноз. При изучении 35 опухолей, потеря 6q выявлена в 40% метастазирующих УМ и только в 7% неметастазирующих опухолей. [40].

### **Транскриптомные особенности**

Анализ мРНК с помощью технологии *GEP*, позволил выделить 2 класса УМ [209] Все УМ I класса имели **дисомию 3**, а УМ класса II имели **моносомию 3** [209] Опухоли класса I были признаны опухолями низкого риска, а опухоли класса II - высокого риска. [181-184]. При этом 80% УМ класса I имели увеличение хромосомы 6p, в то время как 80% опухолей класса II имели моносомию 3 [203]. Анализ выживаемости продемонстрировал 95% вероятность выживания в классе I по сравнению с 31% в классе 2 через 7,7 лет наблюдения [203]. Таким образом, УМ класса I редко метастазировали в отличие от УМ класса II [181-184, 209]. Пациенты с УМ класса II, как правило, были старше, ассоциировались с более толстыми опухолями, эпителиоидным типом клеточного строения, высокой скоростью пролиферации (гиперэкспрессия Ki-67) и мутациями в гене-супрессоре VAP1 [62, 126, 181-184].

Многоцентровое исследование, проведенное в 12 онкологических центрах, подтвердило сильную связь GEP с прогнозом. [184] В среднем через 17 месяцев наблюдения метастазы были обнаружены в 1% у класса I и 26% - у класса II. [184] Класс GEP имел сильную независимую связь с метастазами, а статус хромосомы 3 не давал дополнительной прогностической информации, не зависящей от GEP [183]. Сочетание моносомии 3 и увеличение хромосомы 8q было связано с наихудшим прогнозом. (уровень доказательности AJCC: II).

### 1.5 Иммуногистохимические молекулярные маркеры прогноза

В последние годы наш арсенал пополнился широким спектром молекулярных ИГХ маркеров, позволяющих изучить корреляции с традиционными клиническими, морфологическими и генетическими факторами риска. ИГХ маркеры - представляют собой белковые молекулы, продукты экспрессии генов, активно участвующих в канцерогенезе. Их определяют в образцах опухолевых тканей. Они чувствительны и специфичны. Изменение экспрессии ИГХ-маркеров является заключительным этапом реализации генетической программы, приводящей к достижению опухолью наивысшего уровня анаплазии и перехода к метастазированию. Классическая передача генетической информации в клетке ДНК→РНК→белок предполагает, что до проявления аномальной экспрессии белков, повреждения затрагивают ДНК и РНК, что и отражается на уровне генома и на уровне экспрессии белковых ИГХ маркеров.

Опубликовано пять зарубежных исследований, в которых проанализирована экспрессия разных белков в связи со статусом хромосом. Гиперэкспрессия EphA5, по-видимому, является благоприятным прогностическим фактором, поскольку она коррелирует с редкой потерей хромосомы 3 [112]. Напротив, гиперэкспрессия PARP связана с частой потерей хромосомы 3 [113]. Наихудший прогноз вызывает гиперэкспрессия нестина, связанная с более частой потерей хромосомы 3 и увеличением хромосомы 8q [86]. С частой потерей хромосомы 3 ассоциируется гипоэкспрессия белка PERP (эффektor апоптоза p53, связанного с РМР-22, играющего роль в индукции гибели клеток) [186] и адипонектина [221].

Изучением молекулярных ИГХ маркеров занимались многие исследователи. На территории Российской Федерации наиболее масштабные ИГХ-исследования УМ проведены В.Г. Лихванцевой с соавт., проанализировавшей 20 молекулярных и 3 ткане-дифференциальных маркера: десмин, S-100, меланин А, виментин, HMB45, MITF, тирозиназа, CD117 (c-kit), BCL2, CD31, CD34, CD68, nm23, LCA, циклин Д1, p53, Ki67, Вах, CD95L и др [19-23]. Большой спектр ткане-дифференциальных маркеров представлен в работах Саакян с соавт. [29].

**Молекулярные маркеры клеточной пролиферации.** В качестве прогностических маркеров часто используют белки-регуляторы клеточного цикла: циклин D1, PC-10 и Ki-67. Способность к неограниченному размножению – одна из особенностей опухолей. Количество делящихся клеток является независимым интегральным показателем опухоли. Митотическая активность УМ проанализирована методом ИГХ на уровне ядра с маркерами PC-10, PCNA и Ki-67 [142, 190-192; 204, 212]. Интенсивная ИГХ-окраска ядер PC-10 и Ki-67 в клетках УМ ассоциировалась со снижением выживаемости [142, 176].

Ядерный антиген пролиферирующих клеток PCNA экспрессируется в 100% УМ с количеством позитивных клеток на срезе от 55 до 100% [8]. Экспрессия PCNA обратно коррелирует с выживаемостью: у лиц с продолжительностью жизни до 1 года показатели на 11% превысили показатели больных УМ с продолжительностью жизни до 3-х лет и на 20% превысили тех, кто пережили 10-летний рубеж. Экспрессия PCNA более 80% клетками УМ признана наиболее неблагоприятным маркером прогноза [8].

**Ki-67** – ядерный антиген, кодируемый геном 10-ой хромосомы, экспрессируется на поздних фазах (G1, S, G2 и M) клеточного цикла. Маркер локализуется в ядрышках и может быть компонентом ядерных прерибосом [79]. Его прогностическая роль доказана при разных опухолях, например, рака простаты и молочной железы [14, 26]. Изучение в УМ экспрессии Ki-67 показало, что по сравнению с меланомой кожи пролиферативная активность УМ на порядок ниже (Мср. индекс в меланоме кожи Ki-67 -  $35,6 \pm 31,1$ , медиана 25 против  $3,11 \pm 8,2$  и медианы = 1 в УМ) [10]. Высоко коррелятивная отрицательная связь ( $p=0,03$ ) между продолжительностью жизни пациента с момента манифестации метастазов УМ до смерти и продукцией Ki-67 ( $p=0,03$ ) подтверждали важную значимость Ki-67 в канцерогенезе опухоли. По данным Лихванцевой В.Г. с соавт, индекс Ki-67 может быть использован в качестве самостоятельного маркера прогноза общей выживаемости при УМ, однако в комплексе с маркерами апоптоза он работает лучше [19]. Брендель Н.И. выявила Ki-67 в 55% УМ с 3 - 30% позитивных клеток. В ее работе процент ИГХ позитивных клеток в группе с неблагоприятным течением УМ в 1,5 раза превышал показатели группы с благоприятным течением. Автор пришла к выводу, что Ki-67 пригоден для прогнозирования раннего метастазирования УМ. Прогностически неблагоприятным маркером она назвала  $\geq 20\%$  Ki-67 позитивных клеток в срезе УМ [8].

**Cyclin D1** – важный регулятор G1 – S-фазы клеточного цикла, является непрямым антагонистом эффектов p53. Экспрессия cyclin D1 признана неблагоприятным фактором общей выживаемости при раке пищевода и щитовидной железы [53, 174, 118]. Имеются всего несколько работ, посвященных исследованиям этого маркера в УМ. Прослежена положительная корреляция экспрессии cyclin D1 со скоростью роста УМ. Подтверждено, что экспрессия cyclin D1 является независимым фактором риска развития метастазов УМ. [10, 71,

72]. По данным, М.В. Верещагиной 91,3 % УМ иммунопозитивны к циклину D1: слабая экспрессия выявлена в 78,3% УМ, умеренная – в 13% [10]. Экспрессия циклина D1 не зависела от возраста и пола. Cyclin D1+ УМ, как правило, коррелировали с Ki-67.

**CD117/c-Kit.** Продемонстрировала важная роль экспрессии маркера c-Kit (n=76, 83,6% позитивных УМ), контролирующего путем трансмембранного рецептор-лигандного механизма клеточный рост и пролиферацию [10]. Экспрессия c-Kit нарастала по мере потери клеточной дифференцировки, нарастания клеточной анаплазии и ядерной атипии, увеличения толщины (вертикальная фаза роста) и объема УМ. Гиперэкспрессия c-Kit имела место во всех подкожных метастазах УМ. Результаты позволяли предположить, что блокировка трансмембранного рецептора CD117/c-Kit может стать перспективным способом замедления метастатического процесса. Достоверная корреляционная связь трансмембранного рецептора CD117/c-Kit с процессами скорости роста, усиления клеточной и ядерной анаплазии указывали на возможность применения этой молекулы в качестве возможной точки-мишени лекарственной терапии УМ - препарата таргентного назначения – иматиниба мезилата (Гливек) [20]. .

**nm23.** Роль ядерного белка nm23 до конца не ясна. Доминирует мнение, что в некоторых опухолях с высоким метастатическим потенциалом утрачивается его экспрессия или белок экспрессируется на низком уровне. За белком nm23 признаны следующие биологические функции: супрессия метастазирования, участие в опухолевой дифференцировке и в пролиферации. По данным Верещагиной М.В., nm23 экспрессируется в 68 % УМ, одинаково часто у мужчин и женщин. Экспрессии nm23 увеличивается с возрастом ( $k=0,30$ ,  $p=0,03$ ), с увеличением пропорции эпителиоидных клеток в УМ ( $p=0,033$ ), с ослаблением клеточной дифференцировки и нарастанием анаплазии УМ (агрессивный фенотип). Количество случаев с умеренной и выраженной экспрессией nm23 в УМ с выраженной васкуляризацией превысило показатели слабо васкуляризованных УМ. Экспрессия белка тесно коррелировала с пигментацией опухоли. Слабо пигментированные УМ имели фенотип nm23<sup>-</sup>, а пигментированные УМ - nm23<sup>+</sup> ( $p<0.0001$ ). Однако показатели выживаемости больных УМ по Каплан-Мейеру не выявили статистически значимых различий в группах пациентов с nm23<sup>-</sup> и nm23<sup>+</sup> [10, 20]. Таким образом, проведенные исследования показали, что экспрессия nm23 усиливается по мере ослабления степени клеточной дифференцировки и нарастания агрессивности фенотипа УМ, усиления васкуляризации и пигментации опухоли. Не доказана возможность прогнозирования исходов УМ на основе экспрессии nm23.

**Молекулярные маркеры апоптоза.** Известно, что прогрессирование любой опухоли сопровождается селекцией автономного клона опухолевых клеток, развивающегося на фоне дисбаланса между апоптозом и пролиферацией. Судьба клетки и опухоли в целом определяется на уровне контроля клеточного деления и смерти, осуществляемого специфическими белками.

Эти белки получили название биологических молекулярных маркеров опухолевого роста (p53, Bcl-2, Вах, CD95L). Чем больше выражен дисбаланс между ними, тем хуже прогноз для больного [16, 34]. Апоптоз включается действием множества внутренних и внешних факторов. Сигналы, помогающие клетке выжить, запускаются контактами клетка–клетка, клетка–экстрацеллюлярный матрикс, растворимыми ростовыми факторами. В качестве растворимых проапоптических сигналов может служить CD95L. Внутри клетки решение о смерти определяется балансом между проапоптическими молекулами, подобными Вах, и антиапоптическими белками, например, Bcl-2. Повреждения ДНК контролируются p53 и другими механизмами. В целом, диагностика апоптоза, идентификация пептидов, непосредственно регулирующих важнейшие этапы его запуска (p53, Bcl-2, Вах, Fas-рецепторы и др.) даёт ценную информацию об особенностях клинического течения, скорости роста, лекарственной чувствительности, эффективности лечения, выживаемости и о других свойствах опухолей различного генеза.

В исследованиях В.Г. Лихванцевой с соавт. [19] были изучены корреляции между p53, Bcl-2 и Вах. В p53-позитивных УМ чаще наблюдали экспрессию Вах и реже Bcl-2, и, что наиболее важно, соотношение Bcl : Вах было меньше 1, в противоречие данным Coupland SE, который не обнаружил корреляции между p53 и Bcl-2 [70]. В прогнозе УМ анализ со-экспрессии Bcl-2 и Вах имел наиболее достоверную и информативную значимость. Группой благоприятного прогноза служили Bcl-2-/Вах- больные УМ, в то время как неблагоприятного - группа Bcl-2-/Вах+ . Интересно, что экспрессия Вах играет значение только в Bcl-2 негативных опухолях, тогда как Bcl-2+ УМ вне зависимости от присутствия Вах имели средний уровень риска развития метастазов. Индекс Bcl-2:Вах, отражающий баланс анти- и проапоптических факторов, являлся также высоко информативным и достоверным маркером клинического и витального прогноза больных с УМ. Прогностически неблагоприятным оказались значения  $\leq 1,0$  ( $p=0,0021$ ). Наиболее часто неблагоприятные показатели Bcl-2/Вах встречались при анулярных формах, густо пигментированных УМ [34].

Анализ зависимости пролиферативной активности от экспрессии других молекулярно-биологических маркеров показал, что индекс Ki-67 выше у p53+ УМ и Bcl-2 - УМ. Самую высокую пролиферативную активность среди УМ имели опухоли p53+/Вах-. Следует заметить, что статус Вах, сам по себе, не оказывал значимого влияния на пролиферативную активность опухоли. Индекс Ki-67 не коррелировал с присутствием другого маркера апоптоза – CD95L и с индексом Bcl-2/Вах. Прогностически информативной оказалась комбинация Ki-67 и Вах. Наиболее короткий период до появления метастазов (безрецидивная выживаемость 42 %, медиана 72 мес) имели Ki-67-/Вах+ больные УМ по сравнению с Ki-67-/Вах- (безрецидивная выживаемость 72 %) [34].

**Рецептор инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1R).** С показателями выживаемости коррелировала экспрессия IGF-1R в УМ. [46] Корреляционную связь между гиперэкспрессией IGF-1R в УМ и смертью от метастатической болезни объясняли тем, что IGF-1 в основном продуцируется в печени, которая является первым и доминирующим местом развития метастазов УМ [46] Основываясь на этом факте, эксперты предполагают, что блокада IGF-1R может стать новым самостоятельным потенциальным методом лечения метастазов или может быть предложена в качестве адъювантной терапии для профилактики развития метастазов [119], а серологические показатели IGF-1 могут быть использованы в качестве прогностического биомаркера метастатической УМ в мониторинге [111]. Анализ 15-летней выживаемости по Каплан-Мейеру 36 больных УМ показал значительную связь между высоким уровнем IGF-1R (экспрессия в > 50% клеток УМ) и смертностью, связанной с УМ. [111] В течение 15 лет наблюдения погибли из-за метастазов 56% пациентов с высоким IGF-1R (экспрессия в > 50% клеток УМ), 42% с низким IGF-1R (экспрессия в 15-50% клеток) и 0% с очень низким IGF-1R (экспрессия в <15% клеток). [111]

#### **Молекулярные маркеры, ассоциированные с размерами опухоли**

Обзор последних работ выявил несколько маркеров, демонстрирующих высоко корреляционную связь с традиционными клиническими и морфологическими маркерами, подтвердившими свою надежность временем и масштабными исследованиями, представляющими интерес в аспекте прогноза. Так, выявлено несколько молекулярных ИГХ-маркеров, коррелирующих с диаметром и толщиной УМ. В зависимости от функций маркера, эта связь была прямой (экспрессия росла с увеличением размеров УМ) или обратной (экспрессия снижалась или исчезала при увеличении опухоли). В частности, с **диаметром опухоли** прямо коррелировала экспрессия Ki-67: в больших УМ экспрессия Ki-67 в 1,8 раза была выше, чем в малых опухолях, что позволяло считать его регулятором горизонтального роста УМ [10].

Прямая корреляция с размерами опухоли выявлена у PCNA: в крупных УМ на 9% больше иммунопозитивных клеток, чем в средних и на 17% выше, чем в малых УМ [8]

С толщиной опухоли коррелирует гиперэкспрессия c-REL и CCR7 [202, 203]. C-REL является членом семейства транскрипционных факторов ядерного фактора κB (NF-κB) и регулятором онкогенеза. CCR7 - рецептор, экспрессирующийся в клетках лимфоидного ряда, опосредующий клеточную миграцию наивных лимфоцитов и зрелых дендритных клеток в лимфоидные органы, регулирующий транспорт раковых клеток через экстраклеточный матрикс.

С диаметром и толщиной опухоли коррелирует циклин D1 (91,3% экспрессии в УМ). По данным Верещагиной М.В. связь циклина D1 с высотой, объемом и диаметром основания опухоли обратная: коэфф. корр.  $k_1=-0,407$  ( $p=0,05$ ),  $k_2=-0,403$ ; ( $p=0,056$ );  $k_3=-0,367$ ; ( $p=0,08$ ). Полагают, что этот белок регулирует обе фазы роста УМ - вертикальную и горизонтальную [10].

Наряду с этим, диаметр опухоли коррелирует с гиперэкспрессией белков Hsp90, PARP и PD-1 [46, 60, 63, 94, 113, 139, 138] и потерей экспрессии белка nm23 [10, 122]. Белок теплового шока 90 (Hsp90) играет роль в фолдинге, внутриклеточном транспорте, поддержании и деградации внутриклеточных продуктов метаболизма, в передаче клеточных сигналов. PARP (поли(АДФ-рибозо)полимераза), ядерный белок, участвует в процессах репарации ДНК. Рецептор программируемой гибели клеток-1 (PD-1) является мембраносвязанным рецептором и регулирует ответ иммунной системы [112, 113, 122]. С большим диаметром опухоли (только!) в нематастатической подгруппе [28] коррелирует гиперэкспрессия кластера дифференцировки - CD147. CD147 - член суперсемейства иммуноглобулинов, участвующего в межклеточном распознавании, в иммунологических реакциях, дифференцировке и развитии [157].

Потеря экспрессии белка-мутанта атаксии-телеангиэктазии (ATM) коррелирует как с большим диаметром опухоли, так и с ее толщиной. ATM - активатор реакции, ядерный белок, запускающей повреждение ДНК [137].

Другая взаимосвязь выявлена с маркером EphA1: гиперэкспрессия связана с диаметром опухоли [43, 113]. EphA1, продуцирует эритропоэтин, является рецептором RTK человеческого гепатоцеллюлярного рецептора A1, регулирует процесс эмбрионального развития, включая направление аксонов, формирование тканевых границ, миграцию клеток, сегментацию, пролиферацию и ангиогенез. Таким образом, высокая экспрессия EphA1 для УМ является благоприятным прогностическим фактором.

### **Молекулярные маркеры, ассоциированные с расположением опухоли**

Вовлечение в неопластический процесс цилиарного тела признано независимым фактором повышенного риска метастазирования (уровень доказательности AJCC: I) [152]. Это связывают с тем, что из-за своего расположения цилиарное тело недоступно осмотру, поэтому опухоль, как правило, развивается задолго до ее обнаружения [149]. Вместе с тем, вовлечение цилиарного тела ассоциируется с гиперэкспрессией 6 белков. Это: **PD-1** и **CD147** (относится только к метастатической подгруппе) [157, 218], **HERC2** (убиквитин-протеинлигаза 2, содержащая HECT) и **RLD-домен E3**, ядерный и цитоплазматический белок, участвует в регуляции репарации ДНК, пигментации), **P-белок**, участвующий в синтезе меланина в меланоцитах и в пигментном эпителии сетчатки [143]., **циклин D1** [10; 70-73].

### **Молекулярные маркеры, ассоциированные с экстрасклеральным расширением**

Экстрасклеральное расширение (ЭОР) признано неблагоприятным прогностическим фактором (уровень доказательности АЖСС: II). [149, 152]. Выявлены ИГХ-маркеры, ассоциированные с ЭОР. В зависимости от биологических эффектов, связь носит прямой (экспрессия нарастает с глубиной инвазии) или обратный характер (экспрессия исчезает при ЭОР). Обнаружена прямая связь ЭОР с гиперэкспрессией белков-регуляторов пролиферации УМ: циклином D1 и Ki-67. В случаях ЭОР экспрессия циклина D1 в УМ на 14% выше, чем в опухолях без признаков инвазии. Экспрессия cyclin D1  $\geq 15\%$  клетками УМ ассоциируется с экстрабульбарным ростом, и неблагоприятным исходом заболевания [10]. В случае ЭОР количество Ki-67<sup>+</sup> клеток составило 25 $\pm$ 0,33% против 15,3 $\pm$ 0,51% без ЭОР [8]. Этот факт также согласуется с данными Верещагиной М.В. [10].

Склеральная инвазия ассоциируется с гиперэкспрессией молекул BNP3, Cripto-1, и циклином D1. BNP3 (BCL2, 19 kD, белок, взаимодействующий с белком 3) регулирует клеточную гибель, аутофагию и цитопротекцию [139], Cripto-1 (фактор роста-1, полученный из тератокарциномы) является регулятором онкогенеза, пролиферации и выживания раковых клеток [164, 203].

Напротив, гиперэкспрессия EphA1, коррелирует с низкой частотой экстраклеральной инфильтрации, поэтому признана благоприятным прогностическим маркером [112, 113].

С глубокой склеральной инвазией коррелирует низкая экспрессия nm23 и адипонектина [122]. Адипонектин — белковый гормон, регулирующий уровень глюкозы, расщепление жирных кислот, пролиферацию клеток и воспаление [211].

#### **Молекулярные маркеры, ассоциированные с клеточным типом опухоли.**

Доминирующий тип клеток, присутствующих в опухолевой ткани, признан независимым прогностическим фактором, определяющим риск метастазирования (уровень доказательности АЖСС: I) [149]. В УМ могут присутствовать два типа клеток — веретенообразные и эпителиоидные. Наличие эпителиоидных клеток ухудшает прогноз. Не установлены пропорции клеток для признания опухоли смешанной или эпителиоидной. Многие патологоанатомы даже не пытаются классифицировать по типу, а только фиксируют наличие эпителиоидных клеток [149]. Наличие эпителиоидных клеток коррелирует с гиперэкспрессией маркеров-REL, CyclinD1, HERC2, PD-1 и P-белка [70, 143, 223] и PARP [112, 113], нестина, внеклеточного фермента LOX (lysyl oxidase) [219] и CEACAM [70, 112, 113, 143, 208].

Нестин - цитоплазматический и мембраносвязанный белок нервных стволовых клеток, член семейства белков промежуточных филаментов (IF) класса VI [56]. CEACAM - молекула клеточной адгезии раковоэмбрионального антигена-1, трансмембранный гликопротеин, играющий роль в межклеточных взаимодействиях, регулятор клеточного роста, ангиогенеза,

иммуномодуляции и клиренса инсулина в печени [29,37]. LOX (lysyl oxidase) играет роль в эмбриональном развитии, заживлении ран и ремоделировании тканей взрослых [41, 209].

Наряду с этим, присутствие эпителиодных клеток в УМ коррелирует с гипоэкспрессией ATM [21] и NEMO/IKK $\gamma$ . NEMO/IKK $\gamma$  - белок, необходимый для активации фактора транскрипции NF $\kappa$ B, регулирующего клеточные ответы на воспаление, иммунитет.

Гиперэкспрессии Ki-67 ассоциировалась с эпителиоидно-клеточным строением УМ: индекс пролиферации при эпителиоидноклеточном типе УМ на 4% выше, чем при веретенноклеточном [8, 10]. Со смешанным типом клеток связана низкая экспрессия p16. p16 - ингибитор циклинзависимых киназ 2A, CDKN2A, множественный опухолевой супрессор 1, отвечающий за замедление перехода клеточного цикла из фазы G1 в фазу S [153].

### **1.6 Морфологические и иммуногистохимические маркеры ангиогенеза**

Ангиогенез имеет важное значение в прогрессировании любой опухоли. УМ – не является исключением. Используют разные показатели, отражающие характер ангиогенеза: например, MVD - количественный показатель плотности сосудов в опухоли, подсчитанный с помощью традиционного морфологического исследования, ИГХ-окрашивание сосудов с помощью маркеров эндотелиальных клеток CD31, CD34 или молекулярных маркеров FVIII-Rag, VEGF и его рецепторов. [86, 87, 110, 160, 161]. Микрососуды более отчетливо проявляются и их легче подсчитать на срезах после ИГХ-окрашивания. Наряду с ИГХ-методами подсчета MVD, применяют неинвазивные методы оценки MVD с помощью ультразвуковой визуализации сосудов [27], конфокальной микроскопии, флюоресцентной ангиографии (ФАГ) [32, 33, 67, 88, 89, 90, 175]. Высокие показатели MVD ассоциируется с сокращением выживаемости пациентов с УМ [63, 110, 161, 160].

Выявлена корреляционная связь между высоким MVD и наличием микрососудистых петель и сетей, с одной стороны, и эпителиоидными клетками, большим диаметром основания опухоли, с другой стороны, что комплексно ухудшает прогноз [63, 110]. Вместе с тем, доказано, что MVD – независимый и самостоятельный фактор риска метастазов при УМ [45, 160, 161] При изучении УМ (n=162; медиана MVD: 40 сосудов  $\pm$  0,313мм<sup>2</sup>; диапазон 5-121) было установлено, что с увеличением MVD 10-летняя смертность при УМ увеличивается от квартиля к квартилю: 9%, 29%, 59% и 64%, соответственно [161, 160]. Аналогичные результаты представил Foss et al.: 9-летняя кумулятивная выживаемость для четырех квартилей составила 85%, 55 %, 44% и 27%, соответственно [110].

Другим показателем, коррелирующим с выживаемостью, теоретически могла быть ангиоархитектоника или тип сосудистой сети. Имеющаяся информация на сегодняшний день по этому вопросу противоречива. Одни эксперты опровергают роль ангиоархитектоники в прогнозе УМ [116]. Другие [5, 33], напротив, подчеркивают, что по мере роста опухоли,

происходит трансформация ангиоархитектоники, увеличение диаметра опухолевых сосудов, скоростных показателей кровотока и индекса резистентности, что сопровождается уменьшением акустической плотности образования. Следует отметить, что в своих выводах, авторы опирались на данные, полученные разными методами исследования.

**Сосудистые и внесосудистые паттерны матрикса УМ.** Концепция микрососудистых паттернов была впервые введена Folberg R. Автор предположил, что архитектура микрососудов коррелирует с прогнозом УМ [99]. Он разработал классификационную схему, в которой выделил в дополнение к нормальным сосудам, включенным в строму опухоли, и фокальным бессосудистым зонам, параллельные прямые сосуды, параллельные сосуды с перекрестом, сосудистые дуги (неполные петли), дуги с разветвлением, замкнутые сосудистые петли, окружающие небольшие скопления опухолевых клеток, и микрососудистые сети, состоящие из петель, расположенных «спина к спине» [99]. Структуры оценивают с помощью световой микроскопии на тканях после окрашивания их по Шиффу. В своем исследовании «случай-контроль» Folberg et al показал, что присутствие замкнутых сосудистых петель в УМ является наиболее значимым сосудистым паттерном, связанным со смертью от метастатической УМ. Обнаружение по крайней мере одной замкнутой петли в УМ ассоциируется с присутствием эпителиоидных клеток и, по крайней мере, одного митоза [97, 98]. Al-Jamal проанализировал по Каплан-Мейеру 10-летнюю выживаемость при УМ и продемонстрировал 80% выживаемость для тех, у кого петли отсутствовали, 48% в случаях присутствия петель без сетей, и 40%, если петли образуют сети в УМ [45]. Прогностические возможности микрососудистых петель и сетей, окружающих скопления опухолевых клеток, их независимость и надежность доказаны несколькими исследованиями при УМ. [92-94, 147, 160, 161]. Зарегистрированы два типа экстравазкулярного матрикса, связанные с высоким риском метастазирования (уровень доказательности AJCC: II) [56]. Это сети и петли, образованные опухолевыми сосудами. Их наличие определяют на световом уровне под микроскопом [147].

По данным различных исследований плотность сосудов в опухоли имеет важное прогностическое значение: чем выше плотность сосудов в опухоли, тем хуже прогноз заболевания. Способ подсчета сосудов при этом чрезвычайно важен. ИГХ в этом аспекте с его маркерами - CD34 и CD31 - может стать незаменимым инструментом.

CD34 – трансмембранный гликопротеин, экспрессируется гематопоэтическими стволовыми клетками, эндотелием сосудов, интерстициальными клетками Кахаля и группой отростчатых клеток дермы вокруг кровеносных сосудов и в оболочке нервов. CD34 не окрашивает стромальные клетки нормальной хориоидеи или цилиарного тела. CD34 окрашивает эндотелий нормальных хориоидальных сосудов, прилежащих к опухоли, и сосудов

внутри нее [36, 135]. Таким образом с помощью этого маркера можно оценить степень истинной васкуляризации УМ и ее связь с метастазированием.

CD31 – маркирует эндотелиальные клетки (ЭК). Выполняет роль адгезивного фактора межклеточного взаимодействия между ЭК, клетками эндотелия и лейкоцитами, которые выполняют важную роль в миграции моноцитов через базальную мембрану эндотелия. CD31 экспрессируется непрерывным эндотелием артерий, артериол, венул, вен, и **не экспрессируется прерывистым эндотелием**. Этот маркер пригоден для визуализации сосудов в опухолях.

ИГХ-исследования с применением CD31 (n=78, 100% УМ+) и CD34 (n=78, 100% УМ+), показали полезность этих молекул в визуализации опухолевых сосудов. Подтверждена высокая достоверность и информативность показателей экспрессии CD31 и CD34 ( $p < 0,001$  и  $p < 0,05$ , соответственно) в прогнозе исходов УМ, превосходящая по точности традиционную оценку васкуляризации УМ на световом уровне [5, 10]. **Молекулярные маркеры, экспрессия которых коррелирует с ангиогенезом УМ**

С наличием сосудистых сетей коррелирует гиперэкспрессия маркеров SEACAM [144]. С наличием как петель, так и сетей коррелирует гиперэкспрессия MMP-9 и VEGF-A [202]. MMP-9 (матриксная металлопротеиназа-9) играет роль в деградации белков внеклеточного матрикса, в клеточной пролиферации, миграции, дифференцировке, ангиогенезе, апоптозе. VEGF-A действует специфически на эндотелиальные клетки, опосредует повышенную проницаемость сосудов, индуцирует ангиогенез, васкулогенез и рост ЭК, способствуя их миграции и ингибированию апоптоза.

С наличием сосудистых петель коррелируют низкая экспрессия NEMO/IKK $\gamma$  и гиперэкспрессия нестина [86, 209]. Как видно из представленных данных отсутствуют публикации, связанные с изучением роли рецепторов к VEGF в УМ. Между тем, биологические эффекты молекулы VEGF реализуются посредством рецептор-лигандного взаимодействия и отсутствие рецепторов делает невозможным рост сосудов в опухоли. Кроме того, именно спектр рецепторов в опухоли определяет мишени антиангиогенной терапии. Это придает особую актуальность изучению рецепторов в опухолевых клетках при УМ.

#### **Изменения предикторов прогноза с течением времени**

Установлено, что характеристика опухолей и больных УМ, проживших более 5 лет, отличается от той, кто умер раньше. Больные УМ, умершие от метастатической болезни, демонстрировали больший LBD ( $p < 0,001$ ), высокое митотическое число ( $p = 0,046$ ), более продвинутую стадию AJCC ( $p = 0,013$ ), чаще имели моносомию 3 ( $p = 0,038$ ) и удвоение хромосомы 8q ( $p < 0,001$ ), по сравнению с теми, кто пережил 5-летний срок наблюдения [172].

Предикторы прогноза со временем изменяются. На исходном уровне мужской пол ( $p=0,03$ ), диаметр опухоли ( $p<0,001$ ), количество митозов ( $p<0,001$ ), внесосудистые петли матрикса ( $p=0,03$ ), экстраокулярный рост ( $p<0,001$ ) и прирост 8q ( $p<0,001$ ) независимо друг от друга ассоциируются со смертью от УМ. У цензурированных пациентов, выживших 5 лет после энуклеации, в качестве значимых предикторов остаются только возраст (HR, 1,03; 95% ДИ, 1,0–1,05;  $p=0,03$ ), диаметр опухоли (HR, 1,14; 95% ДИ, 1,07–1,22;  $p<0,001$ ), моносомия 3 (OR 3,12; 95% ДИ 1,08–9,04;  $p=0,04$ ) и увеличение 8q (OR 10,31; 95% ДИ 2,23–47,74;  $p=0,003$ ). Многомерный регрессионный анализ и вовсе оставил значимым только мужской пол (HR, 6,87; 95% ДИ, 1,26–37,42;  $p=0,03$ ) и статус хромосомы 8q (HR, 14,75; 95% ДИ, 1,77–122,99;  $p=0,01$ ). Для уточнения влияния пола и статуса хромосомы 8q на 5-летнюю выживаемость пациентов после энуклеации, были построены кумулятивные кривые заболеваемости, в которых были учтены конкурирующие риски. Кривые кумулятивной заболеваемости не выявили разницы в частоте смертности среди мужчин и женщин, больных УМ ( $p=0,78$ ), тогда как увеличение 8q коррелировало с плохой выживаемостью на протяжении всего периода наблюдения ( $p<0,001$ ).

---

### Резюме

Обзор литературы показывает, что подгруппа пациентов с УМ, которые выживают в течение 5 лет, отличается от тех, кто умирает раньше, и что прогностические факторы через 5 лет после энуклеации отличаются от таковых на этапе энуклеации. Через 5 лет мужской пол и прирост 8q являются единственными предикторами плохого исхода в дальнейшем.

В большинстве исследований анализируются информативность маркеров ранней смертности при УМ, при этом мало что известно о том, как эти факторы прогнозируют долгосрочную выживаемость (более 5 лет после энуклеации). Характеристика больных, переживших этот срок, вероятно, может отличаться от исходной когорты, поскольку пациенты с неблагоприятными характеристиками уже выбыли по вполне понятным причинам. Знание прогностических параметров выживших пациентов представляется не менее важным для понимания механизмов, приводящих к поздним метастазам.

Долгосрочный прогноз УМ плохой: более чем в 50% случаев наступает смерть. Прогнозировать исход УМ можно по клиническим, гистопатологическим и цитогенетическим маркерам. Точный прогноз УМ позволит идентифицировать пациентов с высоким риском метастазирования, облегчая их целевой скрининг и обосновывая дополнительное / адъювантное системное лечение.

Альтернативой молекулярно-генетическим методам служит ИГХ анализ, ставший обязательным методом морфологической верификации опухолей органа зрения. Сегодня, арсенал ИГХ пополнился молекулярно-биологическими маркерами, позволяющими

прогнозировать исход онкологического процесса и/или ответ на лечение, а также подбирать оптимальную таргетную терапию. Установлено, что количественный анализ ИГХ-экспрессии этих белков в опухолях является важным показателем, характеризующим степень агрессивности неопластического процесса и вероятность метастазирования. Учитывая гематогенный путь метастазирования УМ, в этом аспекте особый научно-практический интерес представляют молекулярные маркеры ангиогенеза.

Таким образом, смена парадигм, появление новой 8 редакции AJCC, учитывающей фактор локализации опухоли в глазу, смещение акцентов в сторону молекулярной диагностики и использования молекул, тесно коррелирующих с ключевыми клиническими и морфологическими маркерами прогноза, продемонстрировавшими высокую степень доказательности по AJCC (I-II), обосновывает ревизию данных по изучению клеточных и молекулярных показателей ангиогенеза с оценкой возможностей применения этих маркеров в качестве предикторов 5- и 10-летнего прогноза выживаемости при УМ и создание на их основе регрессионных моделей с формулами для расчета прогноза.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Дизайн исследования

Целью нашей работы стала разработка способов прогнозирования клинического течения УМ на основе ИГХ маркеров ангиогенеза.

Цель достигали путем создания многомерных линейных регрессионных моделей заболевания с формулами для расчета выживаемости и/или срока развития первого метастаза. В формулы вошли наиболее значимые в прогнозе предикторы.

#### *1 этап*

Клинико-морфологические предикторы отбирали, сравнивая выживаемость по Каплан-Мейеру у больных УМ с наличием или отсутствием предиктора. Оценивали силу его корреляционной связи с выживаемостью – 12 мес., 3, 5 или 10 и более лет. В качестве предикторов анализировали: пожилой возраст, высоту, больший диаметр основания УМ, локализацию, стадию заболевания (8 редакция), эпителиоидный тип строения.

Особенностью анализа выживаемости по Каплан-Мейеру является тот факт, что он может быть осуществлён только для цензурированных данных. Наблюдения называются цензурированными, если интересующая зависимая переменная представляет момент наступления терминального события, а длительность исследования ограничена по времени. Такой подход повышает качество и надежность статистического анализа. Отбирали маркеры, продемонстрировавшие тесную связь с прогнозом заболевания.

#### *2 этап*

Изучали ангиогенез и его роль в прогнозе УМ, используя гистологические и ИГХ-методы исследования. В качестве предикторов оценивали традиционные показатели (плотность сосудов на единицу площади среза – MVD), а также клеточные (CD34 и CD31) и молекулярные ИГХ-маркеры ангиогенеза (VEGF, рецепторы Flk и Flt).

#### *3 этап*

Создавали модели заболевания на основе комбинаций из нескольких предикторов, например, пожилого возраста, цилиарной локализации и гиперэкспрессии маркеров ангиогенеза и т.д.. Модели обрабатывались программой SAS и выдавались в виде формул для просчета выживаемости и срока появления 1 метастаза.

#### *4 этап*

Следующим шагом стал поиск альтернативы ИГХ-методу оценки ангиогенеза. В этом аспекте анализировали возможности проточной мультиплексной цитофлуориметрии с количественной оценкой комплекса молекул, участвующих в ангиогенезе.

Достижение поставленной цели предполагало тщательное планирование исследований и сбор достаточного количества больных с разными сроками выживаемости и разным набором

персонализированных клинических показателей (высоты, диаметра основания, локализации, тип ангиогенеза и др) .

## 2.2 Характеристика клинического материала

Клиническим материалом для настоящего исследования стали архивные данные о 220 пациентах с УМ. Все пациенты получили хирургическое лечение в учреждениях г. Москвы и Московской области (ЦКБ РАН, МНИИ ГБ РАМН), прослежены от 12 месяцев до 20 лет. Дата смерти подтверждена документально Центральным Адресным Бюро, а причины смерти заключениями патологоанатомического отделения.

Разработка регрессионных моделей заболевания требует определенного алгоритма статистического анализа и соблюдения правил. Одним из обязательных составляющих является *фактор достаточности клинического материала по каждому из анализируемых показателей*. В этом аспекте, проанализировать возможности достижения поставленных задач позволяет характеристика клинического материала (см ниже).

### *Стадии и подстадии УМ (8 редакция)*

Больные УМ, вошедшие в настоящее исследование находились на разных стадиях заболевания. Так, на 1 стадии УМ пребывали 23 пациента, на 3-й – 58, на 4й – 84. Присутствие *достаточного числа больных с разными стадиями заболевания* позволяло решать поставленные задачи. В частности, оценить прогностическую значимость стадии и подстадии заболевания в ближайшем и отдаленном прогнозе.

Таблица 1- Распределение пациентов по стадиям УМ - (8 редакция)

Число больных (%)	стадия Т1	стадия Т2	стадия Т3	стадия Т4	Всего
<b>Всего:</b>	<b>23</b>	<b>58</b>	<b>84</b>	<b>55</b>	<b>220</b>
<b>a</b>	14 (60,87)	46 (79,31)	62 (73,81)	31 (56,36)	153
<b>b</b>	7 (30,43)	10 (17,24)	20 (23,81)	8 (14,55)	45
<b>c</b>	2 (8,70)	2 (3,45)	0 (0,00)	7 (12,73)	11
<b>d</b>	-	-	2 (2,38)	7 (12,73)	9
<b>e</b>	-	-		2 (3,64)	2

*В исследование включено достаточное количество больных с разными стадиями и подстадиями УМ для оценки их значения в прогнозе заболевания.*

### Гендерный признак

Пациенты распределялись по гендерному признаку следующим образом: преобладали больные УМ женского пола (128 женщин против 92 мужчин). В таблице 2 представлено распределение мужчин и женщин в зависимости от стадии УМ. Как видно из представленных данных, женщины в 5 раз чаще мужчин обращались к врачу на 1 стадии заболевания (82,6% против 17,4%,  $p < 0,05$ ) и в 1,6 раза чаще на 2 стадии (62,1% против 37,9%;  $p = 0,07$ ).

Таблица 2- Распределение пола на разных стадиях заболевания (по Т, 8 редакция)

Пол пациента	T1 стадия	T2 стадия	T3 стадия	T4 стадия	Всего:
	Число больных (%)				
Женщины	19 (82,6)	36 (62,1)	46 (54,8)	27 (49,1)	128
Мужчины	4 (17,4%)	22 (37,9)	38 (45,2)	28 (50,9)	92
Всего:	23	58	84	55	220

В исследование включено достаточное количество больных разного пола с разными стадиями УМ для оценки значения гендерного признака в прогнозе заболевания.

### Возраст

В исследование вошли пациенты разного возраста с разными стадиями УМ, что позволяло уточнить прогностическую значимость маркера «возраст» (таблица 3).

Таблица 3 – Распределение пациентов разных возрастных групп по стадиям УМ

Возрастная группа	T1 стадия	T2 стадия	T3 стадия	T4 стадия	Всего:
	Число больных (%)				
20-35 лет	3 (13,04)	11 (18,97)	9 (10,71)	7 (12,73)	30
36-45 лет	8 (34,78)	22 (37,93)	17 (20,24)	15 (27,27)	62
46-60 лет	11 (47,83)	24 (41,38)	36 (42,86)	22 (40,00)	93
61-75 лет	0 (0,00)	1 (1,72)	18 (21,43)	10 (18,18)	29
76+ лет	1 (4,35)	0 (0,00)	4 (4,76)	1 (1,82)	6
Всего:	23	58	84	55	220

Распределение пациентов с 1 стадией заболевания, представленное в таблице 2, позволяет думать о том, что УМ достоверно чаще всего манифестирует на 5-й декаде жизни. Именно в возрасте 46-60 лет диагностировано 47,83% больных с 1 стадией УМ ( $p < 0,05$ ). В целом в группе УМ доминируют пациенты 45+ лет: 129 против 91 (Таблица 4,  $p < 0,05$ ).

Таблица 4 – Распределение пациентов с разными стадиями УМ  
в зависимости от фактора 45<sup>+</sup> лет

Возрастная группа	T1 стадия	T2 стадия	T3 стадия	T4 стадия	Всего:
	Число больных (%)				
< 45 лет	11 (47,83)	33 (56,90)	26 (30,95)	21 (38,18)	91
≥ 45 лет	12 (52,17)	25 (43,10)	58 (69,05)	15 (27,27)	129
Всего:	23	58	84	55	220

Как видно из представленных данных, в исследование вошли достаточное количество больных разного возраста и стадий заболевания, что позволяло оценить возраст в качестве фактора риска метастазирования при УМ

#### *Локализация опухоли*

Фактор локализации имел для нас особый научно-практический интерес с учетом появившихся доказательств повышенного метастатического потенциала меланом цилиарного тела (ЦТ). Согласно анатомическому разделению сосудистая оболочка глаза делится на 3 части: хориоидею, цилиарное тело и радужку. Соответственно, и опухоли, развившиеся в этих компартментах, традиционно подразделяются на меланомы радужки, меланомы цилиарного тела и хориоидальные меланомы. Меланома цилиарного тела признана независимым маркером высокого риска метастазирования (при n=8000; уровень доказательности AJCC: I) [152]. Мы не исключали, что такими свойствами могут обладать меланомы других областей глаза. В связи с чем, мы проанализировали этот фактор с разных сторон: оценили его метастатический потенциал в случае исходного развития опухоли в радужке и вращая ее в ЦТ (*1 вариант*), случаи изолированного поражения меланомой ЦТ (*2 вариант*), случаи изначального развития опухоли в ЦТ и распространения в сторону экватора (*3 вариант*),. Мы также анализировали потенциал экваториальной меланомы, развившейся изначало в хориоидее на экваторе без распространения в ЦТ (*4 вариант*), а также случаев, когда опухоль развивается исходно в хориоидее позади экватора растет в сторону ДЗН, но не достигает ДЗН (*5 вариант*), когда развивается в хориоидее и распространяется от периферии к заднему полюсу и достигает ДЗН (*6 вариант*) и когда развивается юкстапапиллярно вокруг ДЗН (*7 вариант*). Заметим, 1, 2, 3 и 4 варианты опухолей вошли у нас в подгруппу преэкваториальных (см рисунок 1), при этом, в 1, 2 и 3 варианте вовлечено цилиарное тело, в 4-ем – не вовлечено. Варианты 4, 5, 6 и 7 – это постэкваториальные меланомы, при этом только 6 и 7 – касается ДЗН. УМ, изначало развивающиеся в юкстапапиллярной зоне, рассматривали отдельно, оценивая их самостоятельный и независимый метастатический потенциал. Локализацию первичную определяли морфометрически по месту проекции максимальной толщины опухоли.



Рисунок 1 - Возможные места развития меланом и их распределение на подгруппы с учетом фактора «локализация» при анализе выживаемости по Каплан-Мейеру.

Таким образом, дополнительно выделяли 4 подгруппы больных УМ в зависимости от топографии опухоли по отношению к экватору глаза - линии, соединяющей точки наибольшей окружности глазного яблока во фронтальной плоскости, находящейся 10—12 мм позади края роговицы. Так, в исследование вошли 109 преэквиаториальных (Таблица 5) меланом, из них у 20 пациентов была меланома радужки, в 73 случаях – меланома вовлекала ЦТ; в 123 глазах опухоль захватывала экватор, в 161 случае УМ располагалась позади экватора; из них в 73 случаях достигала края ДЗН.

Таблица 5 - Распределение больных с разными стадиями УМ в зависимости от локализации

Локализация опухоли	T1 стадия	T2 стадия	T3 стадия	T4 стадия	Всего:
	Число больных (%)				
<i>Преэквиаториальные</i>	4 (17,39)	11 (19,0)	47 (56,0)	47 (85,5)	109
Радужка	8 (34,8)	4 (6,9)	3 (3,6)	5 (9,1)	20
Цилиарное тело	6 (26,1)	19 (32,8)	27 (32,1)	21 (38,2)	73
<i>Эквиаториальные</i>	0 (0,0)	16 (27,6)	56 (66,7)	51 (92,7)	123
<i>Постэквиаториальные</i>	14 (60,9)	47 (81,03)	56 (66,7)	44 (80,0)	161
Достигают края ДЗН	7 (30,4)	22 (37,9)	28 (33,3)	16 (26,1)	73

Меланомы указанных локализаций находились на разных стадиях заболевания, что позволяло оценить статистически фактор «локализации» как самостоятельный и независимый фактор, участвующий в прогнозе и высчитать коэффициент корреляции с прогнозом, необходимый для создания модели заболевания. Таким образом, в исследование вошло достаточное количество больных с УМ различной локализации и стадией заболевания

#### *Клинические признаки*

При анализе клинического симптомокомплекса опухолей хориоидеи учитывали такие симптомы, как характер пигментации, разрыв мембраны Бруха, отсевы клеток в стекловидном теле, кровоизлияния на поверхности опухоли (Таблица 6).

Таблица 6 - Частота выявления разных клинических признаков на разных стадиях УМ (8 редакция)

Клинический признак	T1 стадия	T2 стадия	T3 стадия	T4 стадия	Всего:
	Число больных (%)				
Офтальмогипертензия	1 (4,4)	4 (6,9)	24 (28,6)	26 (47,3)	55
Кровоизлияния	2 (8,7)	6 (10,3)	11 (13,1)	6 (12,7)	25
Прорыв мембраны Бруха	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (5,5)	3
Всего:	23	58	84	55	220

Анализировали форму УМ (грибовидная, чечевицеобразная, куполообразная), поверхность опухоли (гладкая, бугристая), границы опухоли (четкие, размытые).

Мы проанализировали такой клинический фактор, как офтальмогипертензия во взаимосвязи с прогнозом УМ. Рассматривали его как потенциально самостоятельный и независимый фактор риска развития метастазов УМ. Достоверно чаще офтальмогипертензия развивалась на поздних стадиях заболевания: в 47,3% ( $p = 0,001$ ; Таблица 5). Она присутствовала на 55 глазах.

*Гистологические признаки: пигментация*

Выделяли 4 степени пигментации: беспигментную, слабопигментированную, умеренно пигментированную и интенсивно пигментированную УМ (Таблица 7). На каждой стадии заболевания присутствовали все типы пигментации. Это позволяло оценить тип пигментации в качестве самостоятельного и независимого фактора риска.

Таблица 7 – Характер пигментации в УМ в зависимости от стадии заболевания

Характер пигментации	1 стадия	2 стадия	3 стадия	4 стадия	Всего:
	Число больных (%)				
Беспигментная	2 (8,7)	15 (25,9)	11 (13,1)	5 (9,1)	33
Слабо-пигментированная	9 (39,1)	17 (29,3)	15 (17,9)	14 (25,5)	55
Умеренно-пигментированная	8 (34,8)	17 (29,3)	30 (35,7)	16 (29,1)	71
Интенсивно пигментированная	4 (17,4)	9 (15,5)	28 (33,3)	20 (36,4)	61
Всего:	23	58	84	55	220

В исследовании присутствовали опухоли разной степени пигментации на разных стадиях заболевания, что позволяло оценить прогностическое значение этого клинко-морфологического признака в прогнозе УМ.

*Тип клеточного строения меланомы*

В таблице 8 представлено распределение УМ разных клеточных типов на разных стадиях заболевания. Веретенноклеточные А, В и эпителиоидные УМ присутствовали в количестве: 44 : 45 : 117. В 14 случаях тип опухоли определить не удалось из-за выраженного некроза.

Таблица 8 – Распределение УМ разных клеточных типов в зависимости от стадии заболевания

Гистологический тип строения УМ	1 стадия	2 стадия	3 стадия	4 стадия	n
	Число больных (%)				
Веретенноклеточный А	2 (8,70)	11 (87,50)	15 (17,86)	16 (29,09)	44
Веретенноклеточный В	5 (21,74)	10 (87,50)	20 (23,81)	10 (18,18)	45
Эпителиоидный	16 (69,57)	37 (63,79)	44 (52,38)	20 (36,36)	117
Некротический	0,00	0,00	5 (5,95)	9 (16,36)	14
Всего:	23	58	84	55	220

На 21 глазу (9,5% случаев) с УМ обнаружены эпибульбарные узлы, мы проанализировали их в качестве фактора риска неблагоприятного прогноза (Таблица 9).

Таблица 9 – Частота выявления эпибульбарных узлов на разных стадиях УМ (по Т).

Признак	1 стадия	2 стадия	3 стадия	4 стадия	Всего:
	Число больных (%)				
Эпибульбарные узлы	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (6,6)	16 (26,1)	21 (9,5%)
Всего:	23	58	84	55	220

В таблице 10 представлено распределение УМ по толщине в соответствии с 8 редакцией классификации UICC TNM (2017г).

Таблица 10 - Распределение опухолей по толщине на разных стадиях УМ

Толщина меланомы	1 стадия	2 стадия	3 стадия	4 стадия	Всего:
	Число больных (%)				
<3,0 мм	8 (34,78)	1 (1,72)	0 (0,00)	0 (0,00)	9
3,1 -6,0 мм	11 (47,83)	36 (62,07)	3 (3,57)	3 (5,45)	53
6,1-9,0 мм	4 (17,39)	20 (34,48)	51 (60,71)	23 (41,82)	98
9,1-12,0 мм	0 (0,00)	1 (1,72)	18 (21,43)	13 (23,63)	32
12,1-15,0 мм	0 (0,00)	1 (1,72)	11 (13,10)	9 (16,36)	20
>15 мм	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,19)	7 (12,73)	8
Всего:	23	58	84	55	220

Как видно из представленных данных в каждой выделенной подгруппе присутствовало достаточное количество глаз, что позволяло рассчитать сопряженную связь маркера «толщины» УМ с заболеванием в целом и с выживаемостью, в частности, и высчитать коэффициенты корреляции с прогнозом, необходимые для моделирования.

Адекватное распределение опухолей по наибольшему диаметру основания на разных стадиях заболевания также позволяло считать, что возможен качественный статистический анализ такого известного маркера прогноза, как больший диаметр основания (Таблица 11).

Таблица 11- Распределение больных по большему диаметру основания УМ на разных стадиях заболевания (8-я классификация)

Диаметр основания УМ	1 стадия	2 стадия	3 стадия	4 стадия	Всего:
	Число больных (%)				
≤3,0 мм	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0
3,1 -6,0 мм	8 (34,8)	3 (5,2)	1 (1,2)	0 (0,0)	12
6,1 -9,0 мм	10 (43,5)	15 (25,9)	1 (1,2)	1 (1,8)	27
9,1-12,0 мм	3 (4,8)	28 (45,2)	30 (48,4)	1 (1,6)	62
12,1-15,0 мм	2 (6,9)	11 (37,9)	15 (51,7)	1 (3,5)	29
15,1-18,0 мм	0 (0,0)	1 (1,6)	26 (41,3)	36 (57,1)	63
>18 мм	0 (0,0)	0 (0,0)	11 (40,7)	16 (59,3)	27
Всего:	23	58	84	55	220

Как известно, это маркер хорошо «работает» в ближайшем прогнозе – до 5 лет, но его возможности в отдаленном прогнозе > 5 лет и более 10 лет практически не изучены. Вместе с тем, наряду с такими маркерами как «толщина» и «больший диаметр основания» по 8 редакции, в целях повышения силы связи с прогнозом, мы разработали собственные маркеры, отражающие высоту и диаметр основания. Так, на этапе планирования исследования были предложены несколько индексных показателей, повышающих надежность статистических оценок. Так, из-за невозможности вычислить точный объем внутриглазной опухоли при УМ различной конфигурации нами был предложен индекс объема опухоли, определяемый по ранговым показателям независимо от оценки ее высоты и диаметра. Для этого на первом этапе высота опухоли ранжировалась на пять градаций: первая градация соответствовала высоте опухоли ≤2 мм, вторая – 2,1–5 мм, третья – 5,1–10 мм, четвертая – 10,1–15 мм и пятая – >15 мм (наблюдалось при выходе опухоли за пределы глаза). Аналогично использовали принцип ранжирования при диаметре опухоли <7 мм – 1 градация, 7,1–10 мм – 2; 10,1–15 мм – 3, 15,1–

20 мм – 4; при диаметре >20 мм – 5. Для каждого пациента персонально высчитывали сумму градаций высоты и диаметра опухоли.

В таблице 12 представлено распределение УМ с персонализированным показателем суммарного индекса, отражавшего толщину и диаметр основания его УМ, на разных стадиях заболевания. Статистически этот показатель имел высоко сопряженную связь со стадией заболевания (8-я редакция;  $p < 0,001$ ).

Таблица 12 - Распределение УМ по суммарному индексу на разных стадиях заболевания

Суммарный индекс УМ	1 стадия	2 стадия	3 стадия	4 стадия	Всего:
	Абс. число больных (%)				
2	6 (26,1)	1 (1,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	7
3	4 (17,4)	1 (1,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	5
4	7 (30,4)	10 (17,2)	1 (1,2)	0 (0,0)	18
5	3 (13,0)	32 (55,2)	1 (1,2)	0 (0,0)	37
6	3 (13,0)	12 (20,7)	32 (38,1)	4 (7,3)	51
7	0 (0,0)	2 (3,5)	35 (41,7)	18 (32,7)	55
8	0 (0,0)	0 (0,0)	15 (17,9)	16 (29,1)	31
9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	13 (23,6)	13
10	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (5,5)	3
<b>Всего:</b>	23	58	84	55	220

Наряду с суммарным индексом мы ввели 3 ранга объема опухоли: объем опухоли признавали малым, если сумма градаций ее высоты и диаметра не превышала 4х единиц, средним – при сумме градаций от 5 до 8; большим, при  $\geq 8$ . В таблице 13 представлено распределение присвоенных рангов объема УМ на разных стадиях заболевания (8-я редакция).

Таблица 13 - Распределение ранга объема на разных стадиях УМ

Объем УМ	1 стадия	2 стадия	3 стадия	4 стадия	Всего:
	Абс. число больных (%)				
Малый	17 (73,9)	12 (20,7)	1 (1,2)	0 (0,0)	30
Средний	6 (17,4)	46 (79,3)	83 (98,8)	39 (70,9)	174
Большой	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	16 (29,1)	16
<b>Всего:</b>	23	58	84	55	220

Сроки наблюдения за пациентами варьировались от 12 месяцев до 18 лет. В таблице 13 представлено распределение пациентов по срокам наблюдения. Согласно этим данным, 27

пациентов (12,3%) наблюдали 1 год наблюдения, 64 человека (29,1%) – 3 года, 71 пациент (32,3%) – 5 лет и 28 (12,7%) – 10 лет и 30 пациентов (13,6%) – более 10 лет.

Таблица 14 - Распределение больных с разными стадиями (по T) УМ по срокам наблюдения

Срок наблюдения	T1 стадия	T2 стадия	T3 стадия	T4 стадия	n
	Число больных (%)				
12 мес	1 (4,35)	3 (5,17)	11 (13,10)	12(21,82)	27
≤36 мес	10 (43,48)	15 (25,86)	21 (25,00)	18 (32,73)	64
≤60 мес	9 (39,13)	27 (46,55)	23 (27,38)	12 (21,82)	71
≤120 мес	3 (13,04)	4 (6,90)	15 (17,86)	6 (10,91)	28
>120 мес	0 (0,00)	9 (15,52)	14 (16,67)	7 (12,73)	30
Всего:	23	58	84	55	220

Медиана наблюдения за больными УМ составила 108 месяцев. Таким образом, присутствие достаточного количества больных с разными сроками наблюдения, позволяло решить поставленные задачи ближайшего (до 12 мес), среднего (3 года) и отдаленного прогнозирования .

### 2.3 Методы диагностики

Пациентов с УМ обследовали офтальмологическими методами. Определяли максимально скорректированную остроту зрения по общепринятой методике: монокулярно в стандартных условиях освещенности. Поля зрения анализировали методом стандартной кинетической периметрии на полушаровидном проекционном периметре фирмы «Карл Цейс Йена» (Германия) при мезопическом освещении. Периметрию проводили на белый цвет. Тонometriю проводили бесконтактным методом (прибор Rhiton) трижды, высчитывая усредненный показатель. Передний отрезок глаза оценивали биомикроскопически (щелевая лампа Shin-Nippon/Naag-Streit BC 900, х ув. x10, x15).

Состояние угла передней камеры и клинические признаки преэкваatorialных УМ (опухоли радужки и цилиарного тела) анализировали также гониоскопически с помощью трехзеркальной линзы Гольдмана. Границы опухоли определяли дополнительно с помощью трансиллюминации.

Клинические симптомы/признаки опухолей постэкваatorialной локализации оценивали офтальмоскопически с помощью прямой и обратной офтальмоскопии, также применяли

фундус-линзы Майнстера (110° и 130°). Стекловидное тело и глазное дно анализировали в условиях максимального мидриаза.

Ультразвуковые методы исследований применяли для определения размеров опухоли. Исследование проводили с помощью ультразвукового комбайна «Voluson 730-Real Time 4D» (фирма-производитель: Kgetz, страна-производитель: Austria). Прибор представляет собой диагностическую систему высокого класса разрешения с возможностями объемного сканирования. Использовали мультислотный датчик с фазированной решеткой 4-10 МГц и 10-16 МГц. Получали высоко качественное изображение объекта исследования на дисплее монитора, кот архивировали в базе для последующего анализа информации.

Глазное яблоко и орбитальное пространство исследовали через верхнее веко. При этом использовали обычный контактный гель (Aquasonic фирмы «Parker», USA). Глубина сканирования составляла 6-7 см, а минимальное значение фильтра - 50 Гц.

Анатомическими объектами исследования служили: глазное яблоко, ретробульбарное пространство, зрительный нерв, сосудистая оболочка глаза, а также узел опухоли в топографическом взаимоотношении с другими структурами глаза. Для идентификации объекта исследований, прибегали к комбинированным режимам, позволяющим не только уточнить уровень поражения (сетчатка, хориоидея и т.д.), но и более точно измерить вертикальный и горизонтальный размеры изучаемого объекта, в также его истинный объем, эхографическую структуру, также визуализировать ангиоархитектонику новообразованных сосудов опухоли. Проводимые таким образом УЗ-исследования позволяли не только подтвердить клинический диагноз опухоли хориоидеи, но и стадировать заболевание на догоспитальном этапе (Т1-4). Это позволяло наметить объем предполагаемого хирургического вмешательства.

Опухоли радужки и цилиарного тела визуализировали с помощью ультразвуковой биомикроскопии. Ультразвуковую биомикроскопию проводили на приборе Р 40 UBM фирмы ОТИ (страна - производитель: Канада). Применяли специальные датчики для ультразвуковой биомикроскопии: 8, 35, 50 и 80 МГц. 3-х-мерная УЗ-биомикроскопия с реконструкцией изображения в реальном масштабе времени с одновременным применением А-режима позволяла не только точно измерить диаметр основания и толщину опухоли, но и дифференцировать кисту от опухоли, изучить ее структуру, состояние структур угла передней камеры и цилиарного тела, включая его отростки, характер вовлечения этих структур в неопластический процесс, изучить глубину инфильтрации склеры.

На этапе подготовки к госпитализации ко всем больным подходили как к пациентам хирургического профиля. В соответствие с Федеральными клиническими рекомендациями (№17/2-3-4 от 10 апреля 2020г) проводили не только диагностическое инструментальное, но и общее лабораторное, а также общее клиническое обследование. Оно включало: общий анализ

крови; анализ крови на сахар, общий анализ мочи, анализ на RW, HBs, HCV, ВИЧ, рентгенографию грудной клетки, ЭКГ, осмотр терапевта с установкой терапевтического статуса больного. Для уточнения клинической стадии онкологического процесса и исключения метастатического процесса, в обследование пациентов включали УЗИ или компьютерную томографию органов грудной клетки /МРТ органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, а также биохимическое исследование крови с определением щелочной фосфатазы, печеночных ферментов ГГТ, АСТ, АЛТ, ЛДГ, общего билирубина. При необходимости выполняли ПЭТ. Клинико-инструментальные данные позволяли уточнить стадию заболевания и выбрать адекватный объем хирургического вмешательства.

#### 2.4 Методы лечения больных УМ

Всем пациентам провели хирургическое лечение, объем которого определяли в соответствии со стадией заболевания и локализацией опухоли. В 16 случаях была выполнена блокэксцизия опухоли в объеме иридэктомии, в 26 – иридоциклэктомия и в 1 случае иридоциклхориоидсклерэктомия (всего: n=43). У 172 пациентов выполнили энуклеацию глаза, пораженного опухолью. В 5 случаях из-за прорастания опухолью фиброзной оболочки глаза и выхода в орбиту проводили экзентерацию (Таблица 15).

Таблица 15 - Виды операций у пациентов с УМ

Вид операции	Количество больных	
	Абс. число	Процент
Иридэктомия	16	7,3
Иридоциклэктомия	26	11,8
Иридоциклохориоидсклерэктомия	1	0,5
Энуклеация	172	78,2
Экзентерация	5	2,3
<b>Всего:</b>	220	100,0

При выявлении первых признаков генерализации пациенты направлялись в специализированные профильные онкологические учреждения г Москвы для проведения комплексного лечения (таргетной терапии и/или радиохирургического лечения и др.)

#### 2.5. Иммунологические методы исследования

В порядке альтернативы ИГХ-методу изучали возможности количественной оценки ангиогенеза методом проточной цитофлуориметрии.

В 9 образцах стекловидного тела (СТЖ) глаз, пораженных меланомой, определяли концентрацию 8 ключевых цитокинов и ростовых факторов, потенциально участвующих в ангиогенезе. Объектом исследования служили 9 глаз с УМ (стадия Т3-Т4), энуклеированных по

причине невозможности применения органосохранного лечения. Стекловидную жидкость отсасывали сразу после удаления глазного яблока обычной иглой на шприце, помещали в пробирку и замораживали в морозильной камере при температуре  $-40^{\circ}\text{C}$ . Разморозку осуществляли однократно непосредственно перед исследованием.

Исследование было одобрено Этическим комитетом ЦКБ РАН. У всех пациентов получено информированное согласие на проведение операции и биопсию стекловидного тела, а также использование данных исследования в научных целях.

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 небольшом объеме жидкости - 50 мкл СТЖ. Концентрацию цитокинов определяли с помощью бус, покрытых антителами к цитокинам IL-8 (ИЛ-8), ангиогенину, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , VEGF, bFGF, TGF $\beta$ , 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 перекрывания бус по размерам, цитокины были сгруппированы следующим образом:

1. IL-8 (бусы А9), TNF- $\alpha$  (бусы С4), IFN- $\alpha$  бусы (В8)
2. VEGF (бусы В8), bFGF (бусы С5), angiogenin (бусы С4)
3. IFN- $\gamma$  (бусы В8)
4. TGF- $\beta$  (бусы В6)

**Первая панель - анализ содержания IL-8 (А9), TNF- $\alpha$  (С4), IFN- $\alpha$  (В8):**

Измеряли на восьмицветном проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Beckton Dickinson, США). Данные по прямому и боковому светорассеянию исследуемых бус отражались на двумерной гистограмме FSC/SSC (Рисунок 2), полученной с монитора цитофлуориметра. Затем выделяли облако бус гейтом Р7, а затем события из гейта Р7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (Рисунок 3). В каждом гейте замеряли интенсивность флуоресценции по каналу PE и определяли концентрацию цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

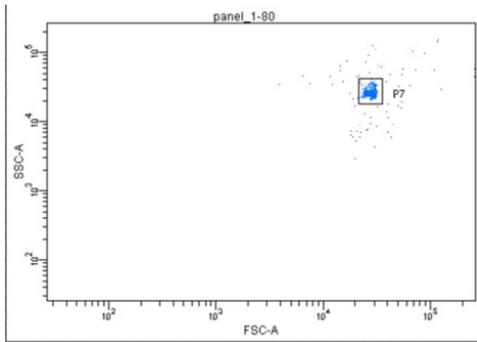


Рисунок 2 - Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

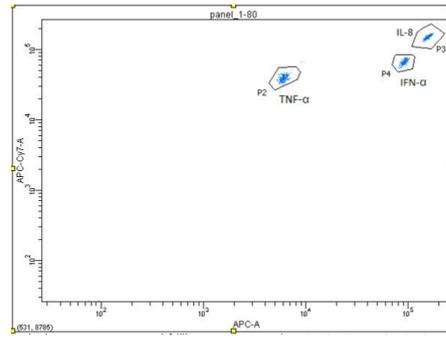


Рисунок 3 – Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7

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

Данные по прямому и боковому светорассеянию исследуемых бус отражали на двумерной гистограмме FSC/SSC (Рисунок 4). Затем выделяли облако бус гейтом P7, а затем события из гейта P7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (Рисунок 5). В каждом гейте измеряли интенсивность флуоресценции по каналу PE для определения концентрации цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

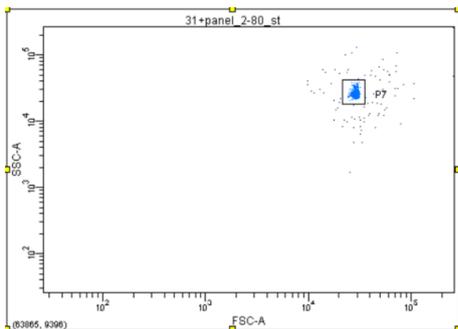


Рисунок 4 – Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

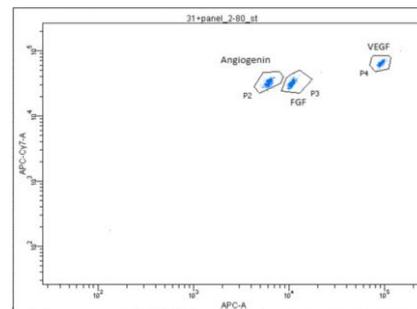


Рисунок 5 – Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7.

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

Данные по прямому и боковому светорассеянию исследуемых бус отражали на двумерной гистограмме FSC/SSC (Рисунок 6). Затем выделяли облако бус гейтом P7, а после события из гейта P7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (Рисунок 7). В каждом гейте измеряли интенсивность флуоресценции по каналу PE для определения концентрации цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

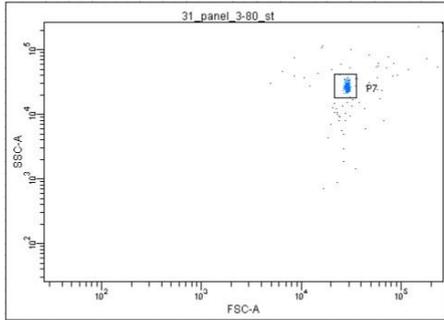


Рисунок 6 – Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

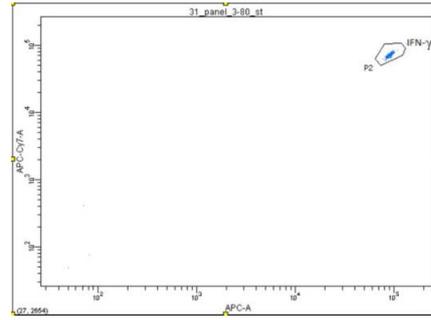


Рисунок 7 – Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7

#### Четвертая панель - анализ содержания TGF- $\beta$ (B6):

Данные по прямому и боковому светорассеянию исследуемых бус отражали на двумерной гистограмме FSC/SSC (Рисунок 8). Затем выделяли облако бус гейтом P7, а затем события из гейта P7 отображали на двумерной гистограмме APC/APC-Cy7 (Рисунок 9). В каждом гейте измеряли интенсивность флуоресценции по каналу PE для определения концентрации цитокина по сравнению со стандартом, поставляемым производителем.

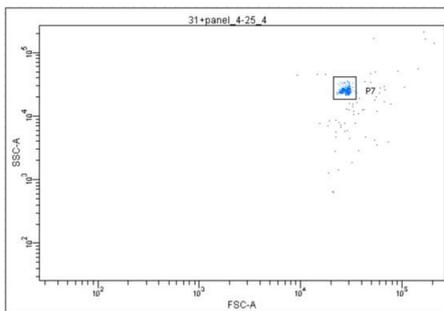


Рисунок 8 – Двумерная гистограмма в координатах FSC/SSC

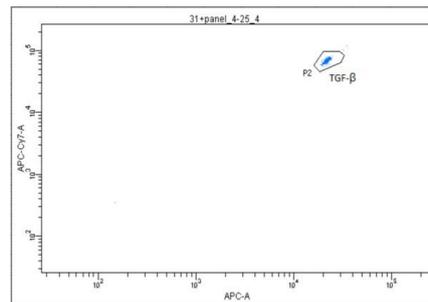


Рисунок 9 – Распределение бус из гейта P7 в координатах APC/APC-Cy7

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

#### 2.6 Морфологические методы исследования.

После хирургического лечения удаленные единым блоком ткани после блокэксцизии или энуклеированный глаз подвергали традиционному гистологическому исследованию с целью верификации клинического диагноза, уточнения радикальности проведения операции и выбора дальнейшей тактики ведения пациента. При гистологическом исследовании определяли особенности конкретной опухоли. С этой целью блок иссеченных тканей фиксировали в 10 % формалине, обезвоживали в спиртах восходящей крепости (96 – 100%). После заливки в

парафин, с каждого блока с помощью микротомы готовили срезы, толщиной 5 микрон. Окрашивали препараты гематоксилином-эозином. Просмотр препаратов и фоторегистрацию осуществляли под микроскопом AxioPlan-2 («Zeiss», Германия), оснащенной телевизионной приставкой MC 200 СНР. Использовали увеличения  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$ . Гистологический диагноз ставили в соответствии с классификацией ВОЗ (4-е издание, 2018 г). Выделяли: эпителиодноклеточную меланому (8771/3), веретенноклеточную меланому тип А и В (8773/3), рисунки 10,11.

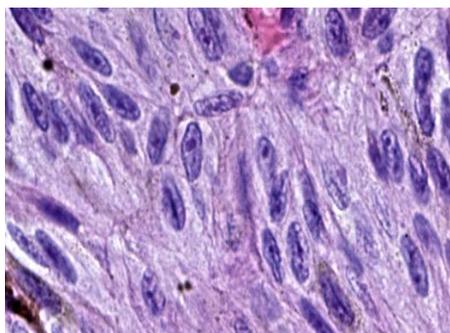


Рисунок 10 - Веретенноклеточная УМ тип В. Гистол. №8773/3

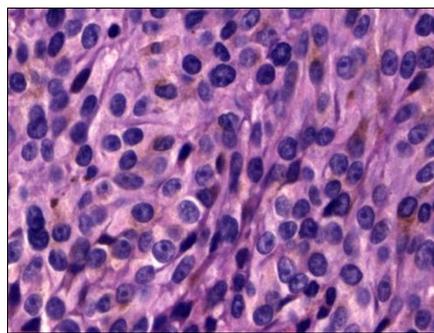


Рисунок 11 - Эпителиодноклеточная УМ Гистол. 8771/3.

Далее на срезах с парафиновых блоков УМ проводили ИГХ анализ с маркерами ангиогенеза (Таблица 16).

Таблица 16 - Панель использованных антител при ИГХ исследовании

Антитело	Клон	Разведение	Фирма-производитель
CD31	JC70A	1:40	DAKO
CD34	QVEnd 10	1:50	DAKO
VEGF	C-1	1:100	Santa Cruz Biotech
Flt-1	Козьи поликлональные	1:100	Santa Cruz Biotech
Flk-1	Козьи поликлональные	1:100	Santa Cruz Biotech

Использовали первичные антитела (АТ) к эндотелиальным клеткам CD31 и CD34, к ключевой молекуле ангиогенеза VEGF и ее рецепторам Flt-1 и Flk-1.

Перед ИГХ исследованием парафиновые срезы выдерживали в термостате при 37°C 40 минут, после чего депарафинировали в ксилоле дважды по 10 минут, регидратировали в 96° спирте х трижды по 3 минуты, трижды промывали в дистиллированной воде и в 3% перекиси водорода. "Демаскировку" АГ достигали, прогревая срезы 45 минут на водяной бане в нагретом до 95-99°C цитратном буфере. Затем их охлаждали 20 минут при комнатной температуре, промывали в дистиллированной воде и фосфатном буфере TRIS-HCL. Раскапывали первые АТ автоматическими дозированными пипетками объемом 40 мкл. Инкубация с первыми АТ длилась 40 минут во влажной среде. Затем срезы промывали трижды в TRIS-HCL буфере. Инкубацию со вторыми АТ [LSAB<sup>®</sup>+kit, DAKO] проводили при комнатной температуре в течение 30 минут, и затем срезы промывали 3 раза по 5 минут в TRIS-HCL буфере. Инкубация с АТ, меченными стрептавидином, [LSAB<sup>®</sup>+kit, DAKO], проводили при комнатной температуре в течение 20 минут, и затем срезы промывали 3 раза по 5 минут. Для визуализации ИГХ-реакции использовали DAB+ систему [DAKO]. Реакцию проводили в темноте в течение 2-х минут. После чего их промывали в 3-х сменах дистиллированной воды. Срезы докрашивали гематоксилином Майера, промывали под проточной водой 3 минуты, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, затем помещали в ксилол. Применяли 3 смены по 5 минут, после чего, заключали в канадский балзам под покровные стекла. Негативным контролем служила ИГХ реакция без добавления первичных АТ. Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа «Carl Zeiss» axiolab E-re (Германия) под увеличением x100, x200, x400. Для всех маркеров указывали место окрашивания (ядро, цитоплазма, мембрана) в клетке (Рисунок 12).

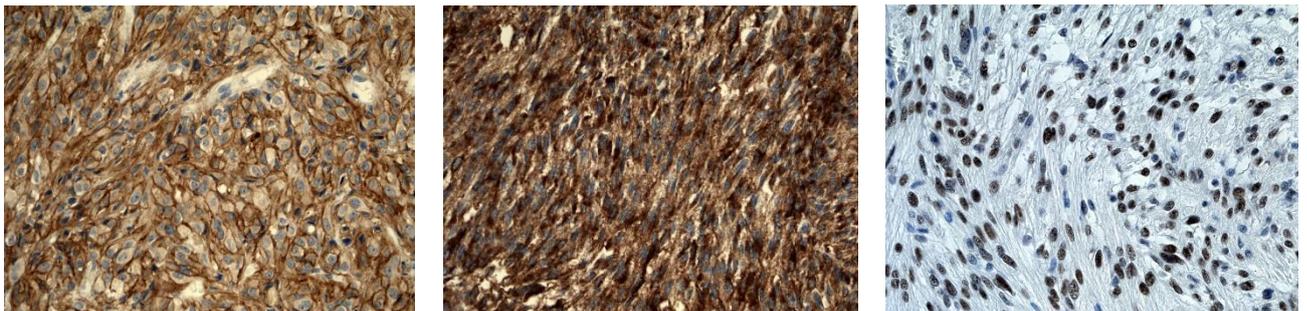


Рисунок 12 - Типы ИГХ-реакций в опухолевых клетках :

А) Мембранная ИГХ-реакция    Б) Цитоплазматическая ИГХ-реакция    В) Ядерная ИГХ-реакция

ИГХ-реакцию градировали на 4 степени: *отрицательной* считали реакцию в случае отсутствия специфического окрашивания клеток УМ или при окрашивании менее 10% клеток на срезе; *слабо положительной* считали реакцию при окрашивании от 10 до 30% (+) опухолевых клеток на срезе. *умеренно положительной* считали реакцию при экспрессии

маркера от 30 до 75 % (++) клеток; экспрессию маркера более 75% клеток расценивали как *выраженную реакцию* (+++).

Опухоли, окрашенные АТ к CD34 или CD31, градируют по 3 степеням, по аналогии с классическим показателем MVD: 1 степень присваивали УМ при визуализации 1–2 сосудов; 2 степень - при окраске 3 – 9 сосудов; 3 – при окраске 9 и более сосудов в 10 полях зрения (при увеличении  $\times 400$ ) [13].

Ангиогенный ИГХ паттерн оценивали после ИГХ реакции с CD34 или CD31. ИГХ-паттерн также градируют на 3 типа по аналогии с классическим показателем MVD [13]

ИГХ паттерн 1 типа присваивали УМ с 1-2 окрашенными сосудами в 10 полях зрения при просмотре под микроскопом с ув.  $\times 400$ .

ИГХ паттерн 2 типа присваивали УМ при окрашивании 3-9 сосудов;

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

**Объектом ИГХ-исследований** с маркерами ангиогенеза служили 98 архивных блоков, отобранных из 220 образцов УМ по причине хорошей сохранности тканей и пригодности к ИГХ анализу.

## 2.7 Методы статистического анализа

Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета прикладных статистических программ SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., США) с применением стандартных алгоритмов вариационной статистики. В частности, для показателей, измеренных по интервальной (количественной) шкале (например, возраст, срок наблюдения, индекс массы тела, высота и диаметр опухоли и т.п.), рассчитывали среднее значение, среднее квадратическое отклонение и ошибку среднего. Для показателей, измеряемых по номинальной шкале («наличие/отсутствие») или по ранговой шкале (больше двух различных ранговых оценок) определяли частоту выявления показателя в процентах или частоту обнаружения ранговых показателей. При этом к номинальным (качественным) показателям относятся, например, факт выявления того или иного фактора (метастазов, смерти, экспрессии того или иного маркера и т.п.). К ранговым (порядковым) показателям относятся такие полуколичественные показатели, для которых увеличение ранга прямо ассоциируется с увеличением значения самого показателя (например, стадия заболевания, степень пигментации опухоли, плотность сосудов (MVD), ИГХ-реакция для изучаемых маркеров и т.п.).

Межгрупповые различия показателей, измеренных по интервальной шкале, анализировали с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок по соответствующим формулам. Достоверность связи между показателями, измеренными по

номинальной или ранговой шкале, оценивали с помощью таблиц сопряженности с расчетом нескольких модификаций критерия Хи-квадрат, коэффициентов сопряженности Крамера и др.

Анализ выживаемости больных УМ выполняли по Каплан-Мейеру, выполняя графическое построение кривых выживаемости. Под выживаемостью понимали процент цензурированных пациентов с УМ, переживающих определенный период времени с момента постановки диагноза, например, 1, 3 года, 5, 10 или 15 лет. Анализ выживаемости позволял ответить на поставленные вопросы «Сколько процентов пациентов с УМ в возрасте, скажем, 65+ переживает 5-летний срок?»; а также высчитать «медиану общей выживаемости» этой когорты больных. Медиана общей выживаемости соответствует периоду времени, который переживает половина пациентов с определенным диагнозом. Анализ выживаемости позволял моделировать процессы наступления терминальных (критических) событий для элементов той или иной совокупности (изначально — «меланома-ассоциированной смерти» - обратной стороны выживаемости). Так, в рамках наших исследований анализ выживаемости мог ответить на вопросы: «Какова будет доля выживших пациентов спустя энуклеации в случае присутствия у них того или иного показателя?», «Каковы темпы смертности (выбывания) будут наблюдаться среди выживших в случае отсутствия показателя?», «Какие факторы определяют шансы больного к выживанию?» и пр. Анализ выживаемости **может быть осуществлён только для цензурированных наблюдений (!)**. Наблюдения называются цензурированными, если интересующая зависимая переменная представляет момент наступления терминального события, а длительность исследования ограничена по времени. Иными словами, цензурированные наблюдения, - те, что выполнены не до окончания периода исследования, а только до какого-то срока, причём этот срок для разных объектов может быть различным. Например, анализируем 5-летний срок выживаемости. При этом, известно, что пациент прожил после энуклеации пять лет, но потом выбыл из поля зрения врачей. Либо (1) сменил место жительства и/или клинику и врача и его текущий статус неизвестен. Либо (2) он погиб в результате несчастного случая. Либо после энуклеации прошло пять лет и пациент до сих пор жив, но он уже принимает таргетную терапию или антиметастатический курс (3). Во всех трёх случаях имеет место цензурирование (censoring), то есть мы не можем приписать данному пациенту в качестве продолжительности жизни после операции пять лет, поскольку: 1) он, возможно, жив до сих пор; 2) возможно, был бы жив, не случись несчастного случая; 3) определённо жив. Однако мы должны каким-то образом учесть информацию о том, что после операции он прожил по меньшей мере пять лет.

По результатам анализа выживаемости строилась кривая на графике, на котором по оси X – было отложено время, а по оси Y — вероятность, или функция выживаемости. Линия,

проходящая через вероятность 0,5, пересекала кривые выживаемости в их медианном значении: до этого срока дожила половина объектов.

Выживаемость в группах сравнивали с помощью специального Logranktest (Mantel-Cox test, в русск. логрангового критерия или критерия Мантела — Кокса, представляющего собой непараметрический критерий. Этот критерий является наиболее сильным в случае, если выживаемость подчиняется экспоненциальному распределению или распределению Вейбулла, а также в ситуациях со случайным, но равным по числу цензурированных наблюдений в группах сравнения. Мы также применяли критерий Гехана —Бреслоу — Уилкоксона, который обычно обобщает критерий Уилкоксона на случай цензурированных данных. Он необходим в случае, когда выживаемость подчиняется логарифмически нормальному распределению, но может сильно терять в мощности в случае большой доли цензурированных наблюдений. Все три критерия очень близки и все аппроксимируются распределением хи-квадрат с одной степенью свободы. Различия в тестах касаются весов, приписываемых отказам по цензурированию на разных сроках наблюдения. Критерий Гехана придаёт больший вес отказам на ранних сроках. Логранговый критерий придаёт всем отказам равный вес, Критерий Тарона — Вэра занимает промежуточное положение

Для глубокого вскрытия сопряженности связи и повышения качества стат.анализа использовали специальный углубленный тест с комбинацией неблагоприятных факторов риска; в частности, таким фактором риска служила «офтальмогипертензия». С ее помощью мы «отягощали» модель заболевания и проверяли собственный потенциал маркера как самостоятельный, так и в комбинации с офтальмогипертензией.

Во всех случаях различия и связь между показателями считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ . Если же наблюдали более слабую статистическую значимость  $p < 0,1$ , то говорили о наличии явной тенденции. Далее, на основе корреляционного анализа создавали регрессионные линейные модели с формулами для расчета выживаемости и возможного срока развития первого метастаза на основе персонализированных клинических показателей и ИГХ-маркеров ангиогенеза.

### ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМОЙ, ОЦЕНКА КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ВЫСОКОГО РИСКА В КАЧЕСТВЕ ПРЕДИКТОРОВ ПРОГНОЗА

В настоящей главе проводили ретроспективный анализ клинических и морфологических факторов риска развития метастазов УМ с оценкой их достоверности и надежности как предикторов ближайшего и отдаленного прогноза.

#### 3.1 Оценка клинико-морфологических показателей в качестве маркера прогноза УМ

Возраст пациентов с УМ, вошедших в наше исследование колебался от 30 до 84 лет (медиана: 55,1±1,7). Подавляющее большинство пациентов вошло в возрастную группу 40-60 лет. Для детального анализа роли возрастного фактора в качестве предиктора прогноза и корреляционного анализа разбили пациентов на 5 групп (Таблица 20): 1 - от 20 до 35 лет включительно; 2 – от 36 до 45 лет включительно; 3 – от 46 до 60 лет включительно; 4 – 61-75 лет включительно; 5 - старше 75 лет. Выживаемость как и частота развития метастазов прямо зависела от возраста пациента. Максимальное количество метастазов (90,9%) развилось у пожилых больных (60+ лет). В таблице 17 представлены показатели в 5 возрастных подгруппах.

Таблица 17 – Выживаемость в различных возрастных группах по цензурированным наблюдениям

Возрастные группы	Всего	Число мтса	Число без мтса	Процент выживших
1	16	1	15	93,8
2	36	8	28	77,8
3	65	19	46	70,8
4	25	9	16	64,0
5	4	2	2	50,0
Все	146	39	107	73,3

Процент выживших в общей группе цензурированных наблюдений, соответственно снижался с 93,8% до 50% при переходе от 1 к 5 подгруппе. Это говорило о высоко сопряженной корреляционной связи возраста с выживаемостью.

В таблице 18 представлены средние значения и медиана выживаемости в разных возрастных подгруппах. Наименьшие показатели оказались в 5 подгруппе (75+ лет). Достоверность сравнений подтверждена всеми тестами: Mantel-Cox Breslow и Tarone-Ware ( $p_1=0,008$ ;  $p_2=0,004$ ,  $p_3=0,004$ , соответственно).

Таблица 18 - Средние значения и медианы выживания (в рангах) в разных возрастных группах

Возрастн ые группы	Среднее <sup>а</sup>				Медиана			
	Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
1	4,83	0,15	4,54	5,13	4.25	0,35 .	4,5	5,1
2	4,55	0,18	4,21	4,90	4,75	0,22	4,0	4,9
3	4,19	0,18	3,85	4,53	4,25	0,32	3,8	4,5
4	3,86	0,29	3,30	4,42	4,00	0,67	2,69	5,3
5	2,75	0,31	2,15	3,35	3,00	0,76	1,50	4,50

Примечание: а. Если выполняется цензурирование, оценка ограничена наибольшим временем выживания. Ед. измерения выживаемости представлена в рангах; 5 рангов выживаемости 1- до 12 мес включительно, 2 - более 12 до 36 мес включительно, 3 - более 36 до 60 мес включительно, 4 - более 60 до 120 мес включительно, 5 - более 120 мес.

Высоко достоверную, сопряженную связь возраста с выживаемостью ( $p=0,004$ ) наглядно демонстрируют кривые выживаемости по Каплан-Мейеру, представленные на Рисунок 13. Так, к 60 месяцам наблюдения (5 лет) в 5 возрастной группе (75+ лет) осталось всего 38% больных УМ (желтая линия), остальные выбыли по причине меланомы-ассоциированной смерти. К этому же сроку в группе 1 (20-35 лет, голубая линия) не произошло выбывания пациентов, а в группе 2 (от 35 до 45 лет, красная линия) выбыло только 18% больных. Разница в показателях цензурированной 5-летней выживаемости высоко достоверна ( $p=0,008$ ). Указанные факты позволили причислить возраст - к факторам риска развития метастазов и снижения выживаемости.

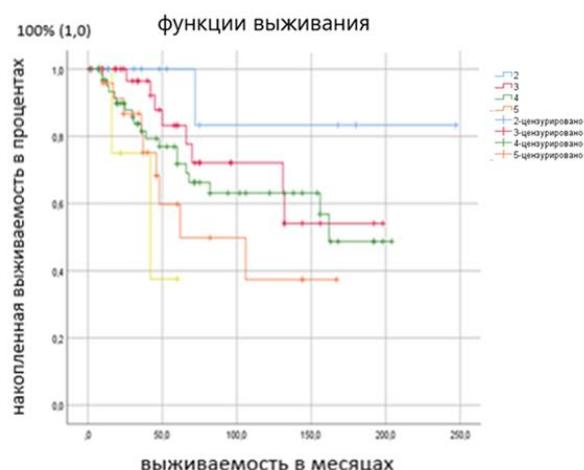


Рисунок 13 – График выживаемости цензурированных наблюдений по Каплан-Мейеру в разных возрастных группах. По оси X – отложено время в месяцах, а по оси Y — функция выживаемости. 1 группа (от 20 до 35 лет) - голубая линия, 2 группа (от 35 до 45 лет) - красная линия, 3 группа (от 46 до 60 лет включительно)- зеленая линия; 4 (61-75 лет включительно) – оранжевая линия; 5 (старше 75 лет) - желтая линия.

В таблице 19 представлен расчет 95% ДИ с оценкой возраста в качестве фактора риска.

Таблица 19 - 95% ДИ при оценке возраста как предиктора прогноза

Показатели относительного риска		Границы 95% ДИ	
		Левая	Правая
Odds-ratio	0,074	0,016	0,342
Risk-ratio	0,469	0,350	0,630

Примечание:  $p = 0,00002$  ( $p < 0,0001$ ).

Как видно из статистических расчетов 95% ДИ, возраст пациента является надежным и высоко точным предиктором витального прогноза при УМ. Мы полагали, что этот маркер может быть полезен в прогнозе выживаемости. Однако, кривые выживаемости по Каплан-Мейеру свидетельствуют о том, что при сроках наблюдения выше 10 лет, этот предиктор (65+) перестает работать в полной мере. Большинство пациентов (73%) этой подгруппы к этому сроку выбывает по причине УМ-ассоциированной смертности.

*Пол пациента.* Гендерная принадлежность не признана COMS фактором, влияющим на прогноз заболевания. Мы это проверили в собственном исследовании. Как видно из представленных в таблице 20 данных, статистической разницы в показателях частоты метастазирования и выживаемости среди больных УМ мужского и женского пола не найдено.

Таблица 20 – Частота метастазирования среди больных УМ мужского и женского пола при одинаковых сроках наблюдения

Пол	Всего	Кол-во мтса	Кол-во выживших и цензурированных наблюдений без мтса	
			Абс число	Процент
Женщины	86	21	65	75,6
Мужчины	60	18	42	70,0
Все	146	39	107	73,3

Не различались и медианы выживаемости мужчин и женщин (Таблица 21) больных УМ.

Таблица 21 - Средние значения и медианы выживания в степенях (1-5 степеней)

Пол	Среднее <sup>a</sup>				Медиана			
	Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
Женщины	4,30	0,14	4,02	4,584	4,0	0,1	4,0	4,6
Мужчины	4,22	0,17	3,89	4,551	4,2	0,2	3,9	4,6

Примечание: а. Если выполняется цензурирование, оценка ограничена наибольшим временем выживания. Ед. измерения – 5 степеней выживаемости 1 - до 12 мес включительно, 2 - более 12 до 36 мес включительно, 3 - более 36 до 60 мес включительно, 4 - более 60 до 120 мес включительно, 5 - более 120 мес.

Таким образом, нами было установлено, что гендерная принадлежность не играла роли в прогнозе выживаемости при УМ.

*Размеры опухоли: высота*

Анализировали высоту опухоли по персонализированным количественным показателям. Использовали несколько технических приемов. Вначале распределяли больных на подгруппы согласно последней классификации (8 редакция). В 1 подгруппу вошли опухоли толщиной  $\leq 3$  мм, во 2 подгруппу – вошли УМ от 3,1 – 6,0 мм включительно, в 3 подгруппу – 6,1 -9,0 мм включительно, 4 подгруппу – 9,1-12,0 мм включительно, 5 подгруппу -12,1 -15,0 мм и 6 подгруппу -  $\geq 15$  мм.

Таблица 22 – Средние показатели толщины в подгруппах, распределенных по высоте УМ (в мм) на основании классификации (8 редакция)

Показатель	1 подгруппа	2 подгруппа	3 подгруппа	4 подгруппа	5 подгруппа	6 подгруппа
	N=22	N=51	N=51	N=51	N=18	N=7
Среднее	2,4±0,7	4,8±0,8	8,0±0,9	10,7±0,9	13,7±0,7	18,6±6,0
Min	0,6	3,4	6,2	9,2	13,0	15,4
Max	3,0	6,0	9	12,0	15,0	32
Кол-во неблагоприятных исходов	2	6	9	15	2	4

Средние значения и медианы выживания, представленные в таблице 23, свидетельствуют о том, что 6 подгруппа сопряжена с риском короткой выживаемости.

Таблица 23 - Средние значения и медианы выживания по цензурированным наблюдениям в подгруппах, распределенных по высоте УМ

Возрастные группы	Среднее <sup>a</sup>				Медиана			
	Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
1	111,0	7,4	96,5	125,5	.	.	.	.
2	174,5	11,7	151,5	197,4	167,0	10,0	151,0	196,0
3	172,2	20,2	132,5	211,8	162,0	19,0	132,5	211,8
4	117,9	11,9	94,5	141,3	131,0	12,0	94,5	141,3
5	160,1	18,5	133,9	206,3	145,0	19,0	134,0	206,3
6	91,0	31,0	30,2	151,8	18,0	15,0	11,0	151,0

*Примечание: если выполняется цензурирование, оценка ограничена наибольшим временем выживания.*

В таблице 24 представлен сводный отчет по цензурированным наблюдениям с указанием процентов выживших в подгруппах цензурированных наблюдений

Таблица 24 - Сводный отчет по цензурированным наблюдениям в подгруппах, распределенных по высоте на основании классификации (8 редакция)

Подгруппа	Всего:	Число метастазов	Число ВЫЖИВШИХ	Процент
1	22	2	20	90,9
2	51	6	45	88,2
3	51	9	42	82,4
4	51	15	36	70,6
5	18	2	16	88,9
6	7	3	4	57,1

Анализ распределений показателей выживания для различных подгрупп не продемонстрировала снижение выживаемости по идеальной экспоненциальной кривой, хотя различия между 1,2,3,4,5 и 6 подгруппами достоверны. Вместе с тем, показатели 5 подгруппы выбиваются из общей закономерности. Анализировали выживаемость по Каплан –Мейеру среди цензурированных наблюдений (Рисунок 14)

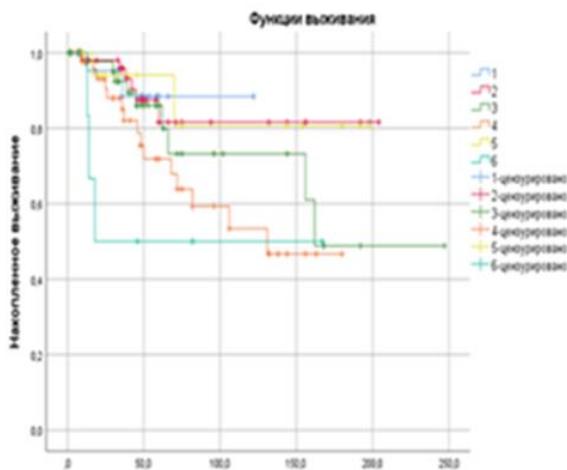


Рисунок 14 – График выживаемости цензурированных наблюдений по Каплан-Мейеру в подгруппах, выделенных по  $h$  опухоли (8 редакция). По оси X – время в месяцах, а по оси Y — функция выживаемости. 1 подгруппа ( $h \leq 3$  мм, синяя линия), 2 подгруппа ( $h$  от 3,1 до 6,0 мм, красная линия), 3 (от 6,1 до 9,0 мм, зеленая линия); 4 (от 9,1 до 12,0 мм, оранжевая линия); 5 (от 12,1 до 15,0 мм, включительно, желтая линия); 6 подгруппа ( $\geq 15$  мм, голубая линия).

Мы также применили несколько собственных ранжированных показателей. Так на этапе планирования были введены ранги высоты 1-2-3-4-5 (код INDEX\_H); 1 ранг соответствовал высоте опухоли  $\leq 2$  мм, 2 – 2,1–5 мм, 3 – 5,1–10 мм, 4 – 10,1–15 мм и 5 –  $>15$  мм (наблюдали при выходе опухоли за пределы глаза). Как видно из представленных в таблице 25 данных, частота метастазирования экспоненциально возрастает с увеличением ранга толщины опухоли, а выживаемость снижается.

Таблица 25 - Сводный отчет по цензурированным наблюдениям при разных индексах толщины УМ

Ранг толщины УМ	Всего:	Число больных УМ с мтса	Число больных УМ без мтса	
			Абс число	Процент
1	6	1	5	-
2	51	2	49	96,1
3	86	19	67	77,9
4	50	12	38	76,0
5	7	3	4	57,1

Тесная обратная корреляционная связь прослеживается по показателям выживаемости в подгруппах, различающихся индексом толщины (таблица 26).

Таблица 26 - Средние значения и медианы выживания (в мес) в подгруппах, выделенных по рангу высоты

Индекс толщины УМ	Среднее значение в мес				Медиана			
	Оценка	Станд. Ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. Ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
1	36,0	0,0	36,0	36,0	36,0	.	.	.
2	196,3	5,4	185,8	206,8	.	.	.	.
3	159,7	15,8	128,7	190,6	162,0	21,7	119,6	204,4
4	133,9	14,6	105,3	162,5	.	.	.	.
5	91,0	31,0	30,2	151,8	18,0	44,0	0,0	146,2

Кривые выживаемости цензурированных наблюдений по Каплан-Мейеру, представленные на рисунке 15, демонстрируют достоверные различия в подгруппах с разным рангом высоты УМ. К 5 годам наблюдения выжили всего 42,9% больных УМ с толщиной > 15 мм против 72,6% выживаемости при УМ толщиной от 5,1 до 10 мм ( $p=0,031$ ). Межгрупповые различия в средних сроках выживаемости между этими группами также достоверны:  $40,7 \pm 9,7$  мес против  $56,1 \pm 1,6$  мес. ( $p=0,031$ )

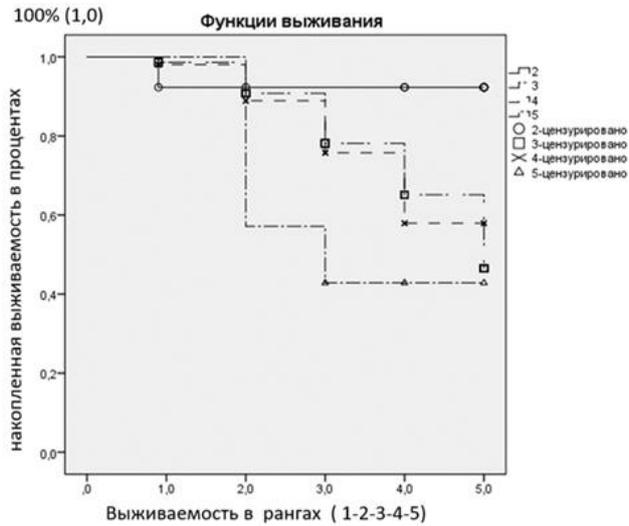


Рисунок 15 - График выживаемости по Каплан-Мейеру при разных рангах высоты УМ. По оси X – выживаемость в степенях от 1 до 5: 1- до 12 мес включительно, 2 - более 12 до 36 мес включительно, 3 - более 36 до 60 мес включительно, 4 - более 60 до 120 мес включительно, 5 - более 120 мес. По оси Y –кумулятивная выживаемость в процентах.

#### Размеры опухоли: диаметр основания

Анализировали информативность, надежность и достоверность персонализированного показателя – большего диаметра основания УМ, распределяя больных на подгруппы согласно рекомендациям последней классификации (8 редакция, табл 27). ). В 1 подгруппу вошли опухоли с диаметром основания  $\leq 3$  мм, во 2 подгруппу – вошли УМ от 3,1 до 6,0 мм включительно, в 3 подгруппу – от 6,1 до 9,0 мм включительно, 4 подгруппу – от 9,1 до 12,0 мм включительно, 5 подгруппу –от 12,1 до 15,0 мм и 6 подгруппу –от 15,1 до 18,0 мм включительно и 7 подгруппу от 18 мм. Процент выживших, представленный в сводном отчете цензурированных наблюдений в выделенных подгруппах, свидетельствует о наличии четко прослеживающейся закономерности.

Таблица 27 – Показатели в 7 подгруппах, распределенных по большему диаметру основания УМ

Показатель	Номер подгруппы						
	1	2	3	4	5	6	7
	n=1	n=4	n=10	n=40	n=62	n=39	n=44
Среднее	3	5,9±0,2	8,6±0,7	10,8±1,0	13,9±0,9	17,0±0,7	20,6±1,5
Min	3	5,6	7,0	9,2	12,4	15,5	18,8
Max	3	6,0	9,0	12,0	15,0	18	25,0
Кол-во неблагоприятных исходов	0	1	0	6	10	7	13

Однако анализ достоверности различий не продемонстрировал высокой значимости ( $p=0,09$ ).

Таблица 28 - Сводный отчет по цензурированным наблюдениям в подгруппах, распределенных по диаметру основания по классификации (8 редакция)

Подгруппа	Всего:	Число метастазов	Число выживших	Процент
1	1	0	1	-
2	4	1	3	-
3	10	0	10	100,0
4	40	6	34	85,0
5	62	10	52	83,9
6	39	7	32	82,1
7	44	13	31	70,5

Мы также провели сравнительный анализ кривых выживаемости цензурированных наблюдений по Каплан-Мейеру (Рисунок 16).

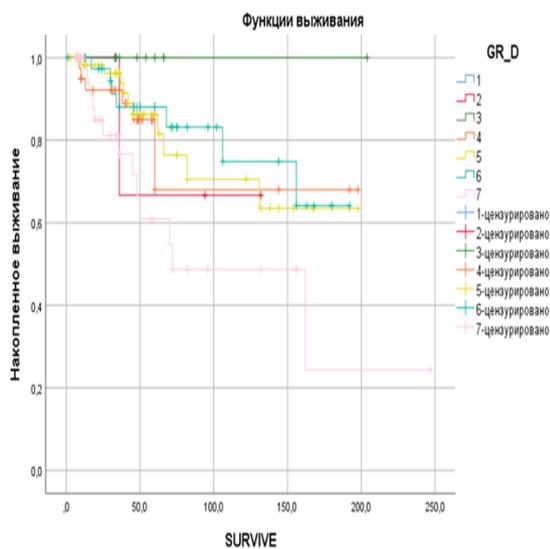


Рисунок 16 – Кривые выживаемости по Каплан-Мейеру в 6 подгруппах, выделенных по диаметру основания УМ. 1 подгруппа ( $\leq 3$  мм), синяя линия, 2 (от  $3,1 \leq 6,0$  мм), красная линия, 3 (от  $6,1 \leq 9,0$  мм), зеленая линия; 4 (от  $9,1 \leq 12,0$  мм), оранжевая линия; 5 (от  $12,1 \leq 15,0$  мм), желтая линия; 6 ( $15,1 \leq 18,0$  мм)- голубая линия, 7 подгруппа ( $>18,0$  мм) фиолетовая линия. По оси X – время наблюдения в мес, по оси Y — функция выживаемости в процентах.

Кривые выживаемости, представленные на рисунке 15, демонстрируют четкую закономерность к сопряженной связи между большим диаметром основания УМ и выживаемостью. На отдаленных сроках наблюдения ( $>150$  мес), из-за малого количества выживших в подгруппе 7 анализируемый маркер становится малопригоден к прогнозированию. В эти сроки кривые проходят очень близко друг к другу...

В связи с чем, для повышения надежности маркера «диаметр» мы прибегли к ранжированию на 5 рангов (Таблица 29).

Таблица 29 - Сводный отчет по выживаемости цензурированных наблюдений в подгруппах с разным рангом большего диаметра основания УМ

Ранг диаметра основания УМ	Всего	Число больных с мтса	Частота выживших без мтса	
			Абс число	Проценты
1	3	1	2	66,7%
2	10	1	9	90,0%
3	52	15	37	71,2%
4	67	15	52	77,6%
5	14	7	7	50,0%
Все	146	39	107	73,3%

Присваивали 1 ранг УМ диаметром основания  $\leq 7$  мм, 2 ранг - от 7,1 до 10 мм; 3 ранг - от 10,1 до 15 мм, 4 ранг - от 15,1 до 20 мм; 5 -  $>20$  мм. В таблице 29 представлена выживаемость в подгруппах, распределенных с учетом ранга диаметра опухоли.

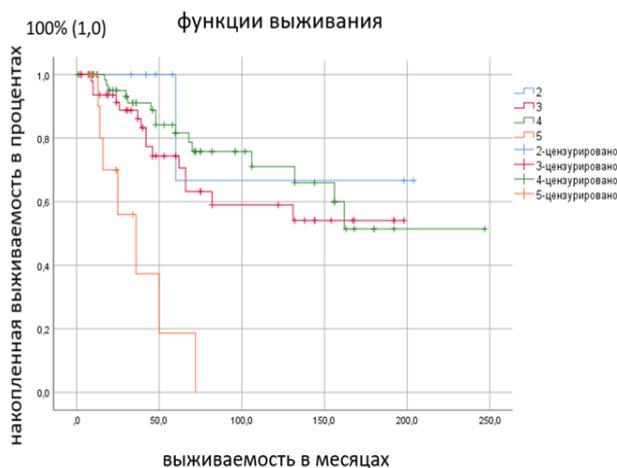


Рисунок 17 - График выживаемости цензурированных наблюдений по Каплан-Мейеру в 5 подгруппах, различающихся рангом диаметра основания УМ. 1 ранг - диаметр  $\leq 7$  мм, 2 -  $>7,1$  до 10 мм (голубая линия); 3 -  $>10,1-15$  мм (красная линия), 4 - от 15,1 до 20 мм (зеленая линия); 5  $>20$  мм (оранжевая линия). По оси X - сроки наблюдения в мес. По оси Y - кумулятивная частота выживаемости.

Кривые выживаемости цензурированных наблюдений на рисунке 17 демонстрируют ускоренное выбывание по причине меланома-ассоциированной смертности в 5 подгруппе. Практически уже к 60 мес. наблюдения (5 лет) в этой подгруппе не осталось ни одного пациента. В то время как в 3 группе (красная линия) к этому сроку выжило 65% больных УМ. Различия более значимы статистически ( $p=0,005$ ), чем при традиционном маркере.

#### *Размеры опухоли: объем*

С целью отбора наиболее тесно сопряженного с прогнозом показателя, отражающего персонализированные размеры УМ, и последующего его применения в регрессионных моделях мы ввели несколько собственных показателей, обеспечивающих надежность статистических оценок. Так, из-за невозможности вычислить объем УМ различной конфигурации мы

использовали **ОБЪЕМ**, определяемый независимо от классических показателей высоты и диаметра [19]. Вначале высота опухоли ранжировалась на 5 рангов: 1 ранг соответствовал высоте опухоли  $\leq 2$  мм, второй – 2,1–5 мм, третий – 5,1–10 мм, четвертый – 10,1–15 мм и пятый –  $>15$  мм. Затем ранжировалась по диаметру основания: при диаметре опухоли  $<7$  мм присваивали 1 ранг, 7,1–10 мм – 2 ранг; 10,1–15 мм – 3 ранг, 15,1–20 мм – 4 ранг; при диаметре  $>20$  мм – 5 ранг. Объем опухоли признавали малым, если сумма градаций ее высоты и диаметра не превышала 4 единиц, средним – при сумме градаций от 5 до 8; большим, если указанная сумма превышала 8. В таблице 30 представлено распределение выживших цензурированных наблюдений в 3 подгруппах, различающихся рангом объема УМ. Как видно из табл 30 данных, при 3 ранге объема частота развития метастазов выше, а выживаемость хуже; разница достоверна :  $p=0,02772$ .

Таблица 30 – Выживаемость цензурированных наблюдений в подгруппах больных УМ с разным рангом объема УМ к концу срока наблюдения

Ранг объема УМ	Всего: 146	Число случаев мтса	Число случаев выживших без мтса	
			Абс. число	Проценты
1	7	1	6	85,7
2	124	30	94	75,8
3	15	8*	7	46,7

Примечание: достоверность различий между подгруппой с 2 и 3 рангом объема \*-  $p < 0.05$

Это отразилось на показателях средней выживаемости в 3 выделенных подгруппах (см табл 31). Анализ полных сравнений свидетельствует о высокой надежности этого маркера в прогнозе ( $p < 0,001$ ); по сути, он оказался надежнее традиционных маркеров, таких как «высота» и «наибольший диаметр основания» УМ.

Таблица 31 - Средние значения и медианы выживания (в мес.) для разных рангов объема УМ

Объем УМ	Среднее				Медиана			
	Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
1	170,40	30,05	111,50	229,30	190,0	27,1	112,0	230,0
2	166,85	11,66	144,01	189,69	168,0	14,0 .-	145,0-	190,0 -
3	45,08	7,77	29,86	60,31	50,00	20,1	10,64	89,36

Мы проанализировали кривые выживаемости по Каплан-Мейеру в трех подгруппах больных УМ, различающихся рангом объема (рисунок 18).

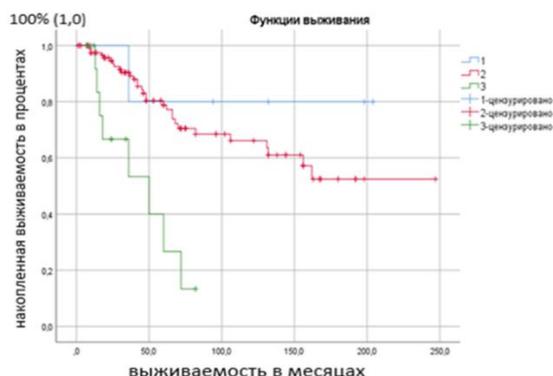


Рисунок 18 - График выживаемости по Каплан-Мейеру цензурированных наблюдений в подгруппах с разным рангом объема опухоли. По оси X – сроки наблюдения в месяцах. По оси Y – кумулятивная частота выживаемости в процентах. 3 ранга объема: 1 ранг – голубая линия; 2 ранг – красная линия; 3 ранг – зеленая линия.

Кривые выживаемости на Рисунок 18 демонстрируют ускоренное выбывание в группе с 3 рангом объема опухоли (зеленая линия). Так к 75 мес наблюдения осталось в живых только 17% больных в этой подгруппе УМ, что устраняло всякую возможность использования созданного нами показателя ОБЪЕМ в качестве предиктора отдаленного прогноза УМ. При этом, этот предиктор прекрасно работал в сроки наблюдения до 5 лет. В группе с 1 рангом объема УМ к 36 мес наблюдения (3 года) выбыло по причине метастазирования только 20% и далее процесс выбывания прекратился. В целом веерное распределение трех кривых на графике свидетельствует о четкой закономерности: выживаемость тесно связана с объемом УМ ( $p=0,0001$ ). В пользу этого утверждения говорят и сроки дожития. Так, средние сроки дожития при 3 ранге объема УМ достоверно ниже показателей 2 ранга:  $M_{ср.} \pm m = 45,1 \pm 7,7$  мес. против  $166,8 \pm 11,7$  мес. (Таблица 30;  $p < 0,001$ )

#### *Стадия заболевания*

Метастазы достоверно чаще развивались на более поздней стадии заболевания (8 редакция, код STAGE\_N) (Таблица 32). Соответственно, выживаемость при этом на более продвинутых стадиях снижалась.

Таблица 32 – Распределение частоты метастазов и выживших цензурированных больных УМ без метастазов на разных стадиях УМ

Стадия заболевания по T	Всего: 146	Число случаев мтса	Число выживших без мтса	
			Абс число	Процент
1	5	3	2	40,0
2	23	3	20	87,0
3	66	17	49	74,2
4	52	16	36	69,2

Данные, представленные в таблице 33 демонстрируют экспоненциальное снижение средних сроков дожития при менее продвинутой к более продвинутой.

Таблица 33 – Средние сроки дожития на разных стадиях заболевания (по T, в мес)

Стадия УМ	Среднее <sup>a</sup>				Медиана			
	Срок мес.	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
1	192,2	18,2	184,2	226,8	202,2	24,2	184,2	226,8
2	177,0	14,2	149,1	204,8	192,0	26,2	149,1	204,8
3	140,6	11,2	118,6	162,6	152,6	11,2	118,6	162,6
4	130,9	19,8	92,0	169,8	134,0	36,3	59,9	202,1

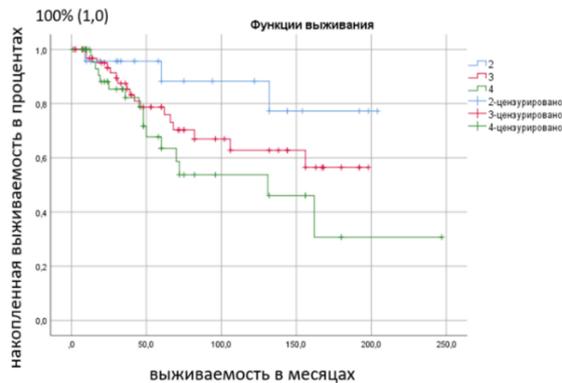


Рисунок 19 - График выживаемости по Каплан-Мейеру цензурированных наблюдений на разных стадиях заболевания (2-3-4 стадии по T). По оси X – сроки наблюдения в мес. По оси Y – кумулятивная частота выживаемости в процентах. T2 – голубая линия, T3 – красная линия, T4 – зеленая линия.

Кривые выживаемости на рисунке 19 наглядно демонстрируют ускоренное выбывание пациентов по причине меланома-ассоциированной смертности на T4 стадии заболевания. Так, к 180 месяцам наблюдения (15 лет) выжило 30% больных УМ с 4 стадией заболевания (зеленая линия) против 56% больных с 3 стадией заболевания (по T) ( $p=0,024$ ). Различия в сроках выживаемости в этих группах были достоверны (табл: 33).  $130,9 \pm 19,9$  мес на T4 против  $140,6 \pm 11,2$  мес. на T3 ( $p_1 = 0,002$ ) и против  $177,0 \pm 14,2$  мес. на T2 ( $p_2 = 0,001$ ). Таким образом, стат. анализ показал потенциальную пригодность стадии заболевания в качестве предиктора ближайшего и отдаленного прогноза

### Тип клеточного строения УМ

Оценивали прогностический потенциал для маркера - тип клеточного строения УМ, определяя тип по классификации ВОЗ (2018 г). Выделяли: эпителиодноклеточную (1), веретенноклеточную УМ тип А и В (2 и 3). В таблице 34 представлена частота выживаемости и метастазирования при разных клеточных типах УМ.

Таблица 34 – Сводный отчет по цензурированным наблюдениям в подгруппах с разным клеточным типом строения УМ

Тип УМ	Всего	Число случаев мтса	Число случаев без мтса	Процент
Веретеночклеточная тип А	42	5	37	88,1
Веретеночклеточная тип В	61	20	41	67,2
Эпителиоидная	30	9	21	70,0

За вычетом некротической УМ (n=14), при которой невозможно было верифицировать исходный тип клеток в УМ, для стат. оценки цензурированных пациентов программа SPSS выбрала 133 пациента. Преобладал веретеночклеточный тип В– 61 пациент (46%), пациентов с веретеночклеточным типом А было 42 (31,6%) и с эпителиоидным типом -30 (22,4%) (Таблица 34).

Среднее время дожития пациентов с веретеночклеточной УМ тип А (тип 1) составляло 170 мес (14 лет) (95% ДИ: 144-196 мес.), пациентов с эпителиоидной УМ (тип 3) – 128 мес.(11 лет) (95% ДИ: 96-160 мес.), пациентов с веретеночклеточным типом Б (тип 2 ) – 125 мес.(10 лет) (95% ДИ: 101-148 мес.) (табл 35). Сравнение показателей выживаемости больных с разными типами клеточного строения УМ достоверно различались во всех трех тестах (Log Rank, Breslow и Tarone-Ware,  $p < 0,0005$ ).

Таблица 35 – Средние значения выживаемости (в мес) и их медианы при разных типах клеточного строения УМ

Тип УМ	Среднее <sup>а</sup>				Медиана			
	Срок мес.	Станд.ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд.ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
1	170,0	13,4	143,7	196,3	173,0.	15,2	34,6	193,0.
2	124,7	12,0	101,3	148,2	162,0	59,1	46,2	177,9
3	128,2	16,2	96,4	160,0	156,0	26,5	82,0	176,2

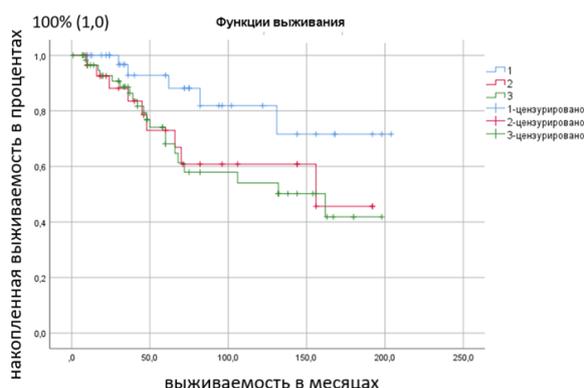


Рисунок 20 – Кривые выживаемости цензурированных больных при разных типах клеточного строения УМ: веретеночклеточный тип А (1, голубая линия), ветереночклеточный тип В (2, зеленая линия) и эпителиоидный тип (3, красная линия). По оси Х – сроки наблюдения в мес. По оси Y – кумулятивная частота выживаемости в %.

Если кривая выживаемости (Рисунок 20) пациентов с меланомой веретеночлеточного типа А демонстрирует явно лучшие показатели, по сравнению с двумя другими клеточными типами, то показатели выживаемости больных с эпителиоидной и веретеночлеточной УМ типа В были достаточно близки; менее 50% пациентов обеих групп имели сроки дожития более 150 месяцев (13 лет). Близкое распределение кривых не позволяет надеяться на высокую достоверность, информативность и надежность этого персонализированного показателя в качестве предиктора отдаленного прогноза.

*Фактор риска: локализация*

Согласно анатомическому разделению сосудистая оболочка глаза делится на 3 части: хориоидею, цилиарное тело и радужку. Соответственно, и опухоли, развившиеся в этих компартментах, традиционно подразделяются на меланомы радужки, меланомы цилиарного тела и хориоидальные меланомы (МХ). Цилиарные меланомы признаны согласно последней ревизии COMS опухолями повышенного риска развития метастазов. А меланомы радужки, напротив, прогностически благоприятными. Также известно, что клеточные структуры юкстапапиллярной хориоидеи на высоком уровне секретируют проангиогенные факторы, а, следовательно, теоретически могут быстрее и чаще метастазировать. В связи с чем, мы проанализировали метастатический потенциал опухолей всех возможных локализаций. При этом, исключили из сравнительного анализа выживаемости меланомы радужки. Для уточнения собственного метастатического потенциала цилиарных меланом (код CIL\_LOC) мы проанализировали сравнительную выживаемость по отношению к объединенной группе УМ всех других локализаций (Таблица 36, 37 и Рисунок 20). Как видно из представленных данных в табл 36, различий в количестве выживших не выявлено.

Таблица 36 - Сводный отчет по цензурированным наблюдениям при цилиарных меланомах против увеальных меланом других локализаций

Цилиарная УМ	Всего	Кол-во мтса	Кол-во без мтса	Проценты
-	86	21	65	75,6
+	48	12	36	75,0

Несмотря на то, что, на первый взгляд (таблица 37), средние значения выживаемости больных цилиарной меланомой отличаются от показателей меланом других локализаций, детальный статистический анализ в программе SPSS различий не подтвердил ( $p=0,38$ , н.д).

Таблица 37 – Средние значения (в мес) и медиана выживаемости при цилиарных меланомах против УМ всех других локализаций

Цилиарная УМ	Среднее <sup>а</sup>				Медиана			
	Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
-	174,406	13,000	148,925	199,887	.	.	.	.
+	120,339	13,116	94,631	146,048	131,00	.	.	.
Все	167,174	11,184	145,254	189,094	.	.	.	.

Отсутствие значимых различий демонстрируют и кривые выживаемости по Каплан Мейеру, представленные на рисунке 21 .

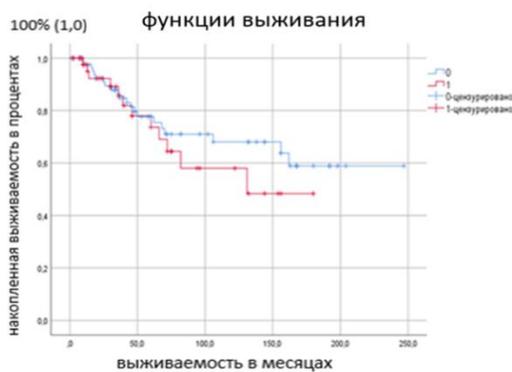


Рисунок 21 - Выживаемость цензурированных больных с цилиарной меланомой (красная линия) в сравнении с УМ всех других локализаций (голубая линия) по Каплан-Мейеру. Меланомы радужки исключены из анализа. По оси X – сроки наблюдения в месяцах. По оси Y – кумулятивная частота выживаемости

Кривая на рисунке 21 демонстрирует практически одинаковое выбывание пациентов с цилиарной меланомой с УМ других локализаций в первые 60 месяцев наблюдения (5 лет). Небольшие недостоверные различия начинают проявляться в к 100 мес. наблюдения, различия сохраняются до 175 мес.

Известно, что цилиарные меланомы могут распространяться с цилиарного тела на хориоидею, при этом, теоретически злокачественный потенциал опухоли может как усиливаться, так и ослабевать. Поэтому мы проанализировали отдельно преэкваториальную меланому, сравнивая ее с меланомами других локализаций, предварительно исключив из анализа меланому радужки (Таблица 38).

Таблица 38 – Сводный отчет по цензурированным наблюдениям при преэкваatorialных меланомах против увеальных меланом других локализаций

Преэкваatorialная УМ	Всего	Кол-во мтса	Кол-во выживших без мтса	Процент
-	50	6	44	88,0
+	84	27	57	67,9
<b>Всего:</b>	134	33	101	75,4

Оказалось, что при таком развитии событий, в реалиях появляются статистически значимые различия в выживаемости (Таблица 39, 40,  $p=0,001$ ).

Таблица 39 - Средние значения (в мес) и медиана выживаемости преэкваatorialных меланом против УМ всех других локализаций

Преэкваatorialная УМ	Среднее <sup>a</sup>				Медиана			
	Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
-	178,8	9,6	160,1	197,5	180,0	12,6	160,1	198,0
+	130,0	15,2	100,2	159,7	140,0	9,6	130,0	160,0

Верное распределение кривых выживаемости цензурированных наблюдений по Каплан-Мейеру имело место буквально с первых месяцев наблюдения (Рисунок 22). Различия в выбывании пациентов начинали проявляться, начиная с 50 мес наблюдения (5 лет), достигая достоверных значений к 156 мес (13 лет) ( $p=0,001$ ).

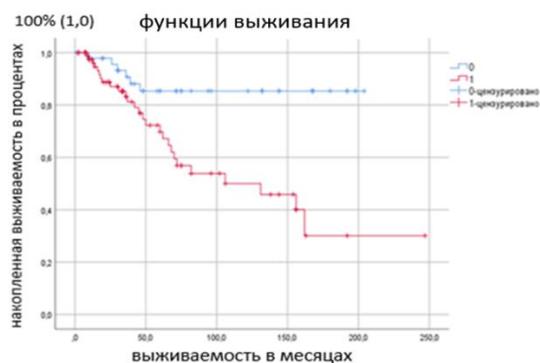


Рисунок 22 - Выживаемость цензурированных больных с преэкваatorialной меланомой (красная линия) в сравнении с УМ всех других локализаций (голубая линия) по Каплан-Мейеру. Меланомы радужки исключены из анализа. По оси X – сроки наблюдения в месяцах. По оси Y – кумулятивная частота выживаемости в процентах.

Таким образом, выделение подгруппы преэкваatorialной меланомы оказалось более значимым в отдаленном прогнозе, чем цилиарной меланомы. Говоря иными словами,

распространение меланомы с цилиарного тела на хориоидею сопровождается усилением метастатического потенциала.

Мы попытались дифференцировать злокачественный потенциал меланом хориоидеи (МХ) в зависимости от близости опухоли к ДЗН. Для этого были выделены 3 клинические подгруппы: экваториальные, постэкваториальные и юкстапапиллярные МХ

Вначале анализ выживаемости был проведен для экваториальных меланом (код ECV\_LOC, см главу 2), не распространяющихся на цилиарное тело, и не достигающих ДЗН. Получены статистически значимые межгрупповые различия в показателях (табл 40, 41, Рисунок 23-24).

Таблица 40 - Сводный отчет по цензурированным наблюдениям при экваториальных меланом в сравнении с объединенной группой меланом всех других локализаций

Экваториальная УМ	Всего: 134	Кол-во мтса	Кол-во выживших без мтса	Процент
-	37	5	32	86,5
+	97	28	69	71,1

Таблица 41 - Сводный отчет по цензурированным наблюдениям при постэкваториальных меланом в сравнении с объединенной группой УМ других локализаций

Постэкваториальная УМ	Всего: 134	Кол-во мтса	Кол-во выживших без мтса	Процент
-	32	9	23	71,9
+	102	24	78	76,5

Таблица 42 - Сводный отчет по цензурированным наблюдениям при юкстапапиллярных меланом

Юкстапапиллярные УМ	Всего:134	Кол-во мтса	Кол-во без мтса	Проценты
-	84	22	62	73,8
+	50	11	39	78,0

В таблице 43 для сравнения представлены средние показатели выживаемости и медиана в каждой из выделенных подгрупп. Достоверность некоторых межгрупповых различий статистически значима (см результаты тестов под таблицами).

Таблица 43 - Средние значения и медиана выживания при экваториальных, постэкваториальных и юкстапапиллярных меланомах

Локализация	Среднее <sup>a</sup>				Медиана			
	Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
Преекваториальная меланома хориоидеи								
-	178,8	9,6	160,1	197,5	184,0	15,6	160,0	202,4
+	130,0	15,2	100,2	159,7	131,0	41,7	49,3	212,8
Экваториальная меланома хориоидеи								
-	173,3	12,5	148,8	197,7	175,0	16,5	148,8	201,5
+	151,1	13,8	123,9	178,2	162,0	43,0	77,8	246,2
Постэкваториальная меланома хориоидеи								
-	130,2	21,5	89,1	171,4	155,5	23,5	88,0	172,0
+	150,4	9,2	132,4	168,4	156,0	46,2	65,4	246,6
Юкстапапиллярная меланома хориоидеи								
-	142,4	16,2	110,7	174,2	165,0	24,8	108,2	175,0
+	159,4	11,7	136,6	182,2	155,0	24,9	107,3	204,7

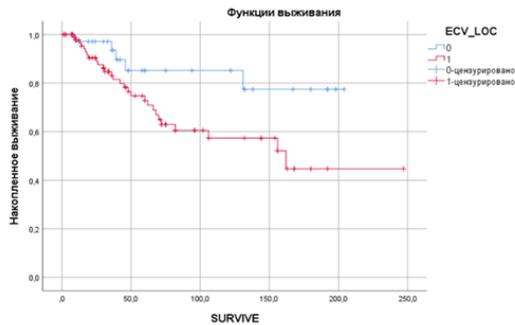


Рисунок 23 – Кривые выживаемости по Каплан-Мейеру при экваториальных меланом (красная линия) и объединенной группе УМ всех других локализаций (синяя линия). Меланомы радужки исключены из анализа. По оси X – сроки наблюдения в месяцах. По оси Y – кумулятивная частота выживаемости.

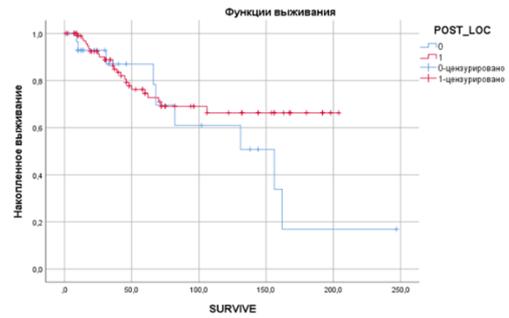


Рисунок 24 – Кривые выживаемости больных с постэкваториальной меланомой (красная линия) и объединенной группе УМ всех других локализаций. Меланомы радужки исключены из анализа. По оси X – сроки наблюдения в месяцах. По оси Y – кумулятивная частота выживаемости.

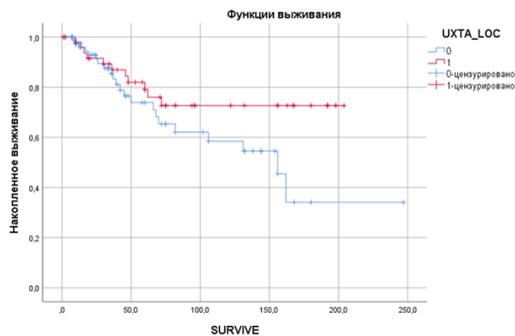


Рисунок 25 – Кривые выживаемости по Каплан-Мейеру больных с юкстапапиллярными меланомами (красная линия) и в объединенной группе УМ других локализаций. Меланомы радужки исключены из анализа. По оси X – сроки наблюдения в месяцах. По оси Y – кумулятивная частота выживаемости.

Кривые выживаемости на рисунке 25 наглядно демонстрируют отсутствие различий в скорости выбывания юкстапапиллярных УМ в первые 5 лет наблюдения по сравнению с пациентами УМ всех других локализаций. Достоверные различия появляются в отдаленные сроки – спустя 15 лет наблюдения. К этому времени выживаемость юкстапапиллярных УМ составляет 70%. В то время, как в группе сопоставления остается в живых 38% больных.

Большой совокупный процент агрессивных гистологических типов УМ среди анализируемых опухолей усиливал вероятность развития метастатического процесса в группе в целом.

При учете фактора локализации определено, что метастазы чаще развивались при преэкуаториальных меланом, а также опухолях, распространяющихся в угол передней камеры, захватывающих корень радужки и/или так называемых анулярных меланом. Преэкуаториальных меланом в анализируемой группе было 22 случая, 36 обширных меланомы распространялись от ДЗН до цилиарного тела и также захватывали эту зону.

### Клинический фактор риска: офтальмогипертензия

В анализ вошло 146 цензурированных пациентов, из которых у 52 была офтальмогипертензия. Распределение выживаемости для групп с наличием и отсутствием офтальмогипертензии статистически достоверно отличалось (Таблица 44;  $p < 0,05$ ).

Таблица 44 - Частота развития метастазов УМ при офтальмогипертензии

Офтальмогипертензия	Всего	Кол-во мтса	Кол-во выживших без мтса	Проценты
-	94	20	74	78,7
+	52	19	33	63,5
Всего:	146	39	107	73,3

Среднее время дожития пациентов без офтальмогипертензии составило 181 месяц (15 лет) (95% ДИ: 157-205 мес.) против 97 мес 97 мес. (8 лет) сроки дожития пациентов с офтальмогипертензией (95% ДИ: 68-126 мес.) (Таблица 45).

Таблица 45 – Средние значения и медиана выживания больных УМ с офтальмогипертензией и без нее

Офтальмогипертензия	Среднее <sup>a</sup>				Медиана			
	Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
-	180,75	12,13	156,97	204,53	168,8	25,6	155,0.	202,8
+	96,861	14,827	67,800	125,923	60,000	12,51	35,47	84,53

Медиана времени дожития у пациентов с офтальмогипертензией составила 60 мес.(5лет) (95% ДИ: 35-85 мес.), в то время, как у 60% пациентов с отсутствием офтальмогипертензии время дожития превысило 20 лет (см.график на рисунке 26).

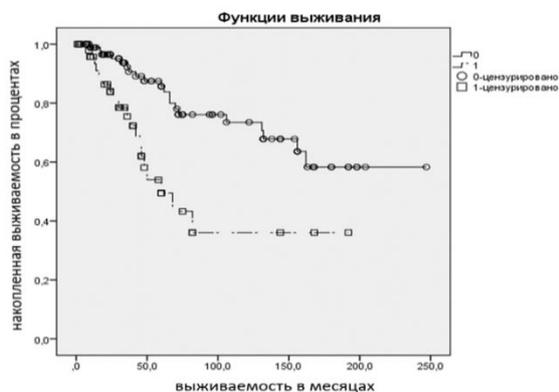


Рисунок 26 –Кривые выживаемости по Каплан-Мейеру больных с офтальмогипертензией (квадраты+линия) и без офтальмогипертензии (кружок+ линия). По оси X – сроки наблюдения в месяцах. По оси Y – кумулятивная частота выживаемости.

Выявлена коррелятивная, слабой силы, но высоко достоверная связь между фактором внутриглазной гипертензии и вероятностью развития метастазов ( $k= 0,2789$ ,  $p=0,02$ ).

*Фактор риска: эпibuльбарные узлы*

Мы проанализировали достоверность и надежность другого фактора клинического риска развития метастазов – эпibuльбарных узлов в ближайшем и отдаленном прогнозе.

Таблица 46 - Частота развития метастазов УМ при наличии эпibuльбарных узлов

Эпibuльбарные узлы	Всего	Кол-во мтса	Кол-во без мтса	Проценты
-	124	33	91	73,4
+	18	6	12	66,7
Всего:	142	39	103	72,5

Как видно из статистического анализа, межгрупповые различия в распределении выживаемости в группах с наличием «эпibuльбарных узлов» и их отсутствием не были высоко достоверны, но как стратификационная переменная этот фактор оказывал значимое влияние на время дожития при факторе офтальмогипертензия (см табл .47).

Присутствие двух клинических факторов риска качественно меняет ситуацию. Выявляются достоверные различия в выживаемости между группами с присутствием и отсутствием комбинации двух факторов. Показатели выражены в степенях .

Таблица 47– Средние значения (ср градация) и медианы выживания больных УМ с офтальмогипертензией и эпibuльбарными узлами и в отсутствие обоих факторов риска

Эпibuльбарные узлы	Офтальмогипертензия	Среднее значение <sup>a</sup>				Медиана			
		Оценка	Стан. Ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд Ошибка	95% ДИ	
				Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
-	-	4,50	0,12	4,31	4,76	4.2	0,5.	4.0	4,8.
	+	3,70	0,25	3,26	4,23	4,0	0,8	2,4	5,6
+	-	4,20	1,00	3,30	4,60	4,0	0,7	3,0	5,0
	+	2,7	0,16	2,38	3,02	2,9	0,2	2,4	3,2

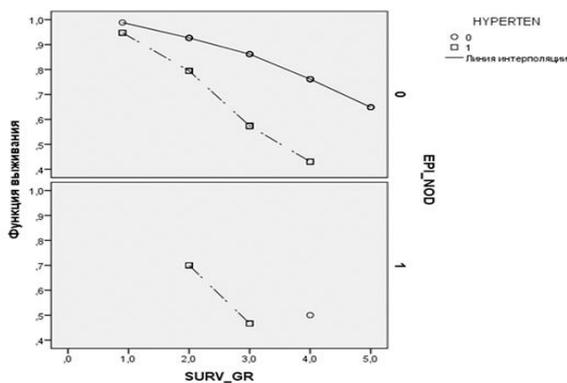


Рисунок 27 - Выживаемость по Каплан-Мейеру среди больных УМ с наличием офтальмогипертензии и эпибульбарных узлов и без этих факторов риска.

Кривые выживаемости демонстрируют ускоренное выбывание пациентов с комбинацией указанных факторов риска.

### 3.2 Оценка силы корреляционной связи клинико-морфологических показателей с прогнозом

В рамках поставленных задач настоящей работы необходимо было проанализировать силу корреляционных связей каждого из клинических, морфологических факторов с ближайшим и отдаленным прогнозом. Это было необходимо для составления регрессионных моделей заболевания, в которые вносят наиболее тесно связанные с прогнозом маркеры. Как правило, предикторы для составления моделей заболевания выбирают на основе коэффициентов корреляции, отражающих силу их связи с прогнозом. Под термином «прогноз» понимали выживаемость больных и развитие метастазов - 2 главных показателя всех онкологических исследований. Под ближайшим прогнозом понимали сроки 12 и 36 мес. (отрезные точки), под отдаленным прогнозом 60 и более 120 месяцев.

Маркеры представлены в таблице 48

Таблица 48 – Коэффициенты корреляции с прогнозом различных маркеров

Маркер	Коэфф. корреляции с прогнозом, достоверность p			
	Выживаемость ≤ 12 мес	Выживаемость ≤ 36 мес	Выживаемость 5 лет	Выживаемость 10 лет и более
Пол	0,048, н/д	-0,076, н/д	0,068, н/д	0,056; н/д
Возраст	-0,296, p=0,04	-0,258; p=0,025	-0,189, p=0,005	-0,255, p=0,05
Ранг возраста	-0,317, p<0,05=			-0,155, p =0,03
Стадия T (8 редакция)	0,299, p=0,0001	0,275, p=0,0012	0,200, p =0,005	-0,224, p=0,001
Стадия T4	0,177, p=0,005	0,200, p=,005	-0,640, p=0,063	-0,725, p=0,03
Учет стадии и подстадии T	0,293, p=0,001	0,175; p=0,013	0,197; p =0,005	0,164 P =,020
Высота УМ	0,323, p=0,001	0,171, p=0,015	0,449, p<0,05	-0,171, p=0,015
Индекс высоты	0,247, p=0,005	0,178, p =0,01	0,691, p=0,039	-0,205; P =0,004
Диаметр основания УМ	0,146, p=0,03	0,187, p=0,008	-0,197, p=0,005	-0,201, p=0,027
Индекс основания	0,178 P=0,011	0,199 p=0,011	0,203, p=0,007	-0,209, p =0,005
Объем опухоли	0,152, p=0,05	0,189, p=0,03	0,209, p=0,007	-0,223, p=0,004
<i>Локализация УМ</i>				
Радужка	-0,118, p=0,08	-0,023, н/д	-0,046, н/д	0,046, н/д
Цилиарное тело	0,178, p=0,12	0,189, p=0,007	-0,152, p<0,05	-0,147, p=0,06
Юкстапапиллярная	0,165, p=0,014	0,114, p=0,092	0,214, p=0,003	0,229, p<0,001
Преэквиаториальная	-0,149, p=0,04	-0,252, p=0,003	-0,147, p=0,038	-0,223, p= 0,008
Экваториальная	0,151, p=0,03	0,158, p =0,026	-0,163, p=0,021	-0,187, p =0,018
Постэквиаториальная	0,241, p=0,001	0,219, p=0,001	0,227, p=0,03	0,625, p<0,05
Эпibuльбарные узлы	0,259, p=0,001	-0,120, p=0,08	-0,132, p=0,056	-0,206, p<0,05
Эпителиоидный тип	0,093, н/д	-0,051, н/д	0,112, н/д	-0,085, н/д
Некротический тип	0,248, p=0,002	0,145, p=0,076	-0,276, p=0,002	-0,282, p<0,001
Геморрагии на поверхности УМ	0,249, p=0,001	0,179, p=0,008	0,091, н/д	-0,124, p=0,05
Офтальмогипертензия	0,408, p=0,003	-0,223, p=0,01	-0,247, p<0,08	-0,175, p=0,089

Примечание: цветом выделены строки с собственными маркерами прогноза

### **Резюме**

Проведенные исследования позволили просчитать и оценить силу корреляционной связи традиционных клинико-морфологических маркеров и собственных маркеров с прогнозом с целью последующего использования их в регрессионных моделях УМ и создания формулы расчета выживаемости и срока развития первого метастаза прогноза.

Установлено, что фактор риска «ОФТАЛЬМОГИПЕРТЕНЗИЯ» может работать как «верификатор» отягощающего прогноз потенциала других клинических факторов.

## ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ АНГИОГЕНЕЗА УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ. ПОИСК И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРЕДИКТОРОВ ПРОГНОЗА СРЕДИ МАРКЕРОВ АНГИОГЕНЕЗА

В настоящей главе изучали ангиогенез УМ с помощью гистологических (MVD) и ИГХ клеточных (CD31, CD34) и молекулярных (VEGF, Flt, Flk) маркеров, анализировали силу корреляционной связи маркеров ангиогенеза с классическими клинико-морфологическими предикторами прогноза УМ. Исследования проводили на 98 архивных блоках УМ, пригодных к ИГХ анализу.

### 4.1 Изучение васкуляризации в увеальной меланоме гистологическими методами

На первом этапе изучали ангиогенез 98 образцов УМ классическим гистологическим методом, подсчитывая количество видимых под микроскопом сосудов на срезе опухоли в 10 полях зрения (x 400 ув. HRM, см главу 2). При 1-2 сосудах в поле зрения на срезе УМ опухоли присваивали 1 тип васкуляризации, при 3-9 сосудах – 2 тип, а при более 9 сосудах – 3 тип (см главу 2) [13].

В подавляющем большинстве случаев (78,5%) УМ имели 2 и 3 тип васкуляризации (Таблица 49).

Таблица 49 - Распределение типов васкуляризации в УМ по данным гистологических исследований (MVD)

Тип васкуляризации	Количество УМ	Процент
1 тип MVD	21	21,5
2 тип MVD	51	52,0
3 тип MVD	26	26,5
Всего:	98	100

Гистологический тип васкуляризации УМ не коррелировал с возрастом, гендерной принадлежностью пациента или стадией заболевания.

Выявлена слабая корреляционная связь типа васкуляризации с клеточным строением УМ. Веретеночеточные УМ типа А достоверно чаще имели слабую васкуляризацию, эпителиодноклеточные - умеренную и интенсивную васкуляризацию (Таблица 50). Коэффициент корреляции по Спирману  $r_s = 0,32$  ( $p=0,02$ ).

Таблица 50 - Распределение гистологических типов васкуляризации в зависимости от клеточного строения увеальной меланомы

Тип клеточного строения	Абсолютное число: n	Гистологический тип васкуляризации		
		1 тип	2 тип	3 тип
Веретенноклеточная А тип	13	6	4	3
Веретенноклеточная В тип	51	8 (15,7%)	30 (58,8%)	13 (25,5%)
Эпителиоидная	34	5 (14,7%)	23 (67,6%)	6 (17,7%)
Всего:	98			

Примечание: достоверность различий веретенноклеточных от эпителиоидных УМ \* -  $p < 0,05$ .

Интенсивность васкуляризации нарастала по мере усиления клеточной атипии УМ (коэфф корреляции Спирмана  $r_s = 0,39$ ;  $p=0,05$ ).

Тип васкуляризации прямо коррелировал с пигментацией УМ по клиническим / офтальмоскопическим (коэфф. корр. по Спирману  $r_s = 0,42$ ;  $p=0,001$ ) и гистологическим данным ( $r_s = 0,45$ ;  $p=0,001$ ).

Интенсивность васкуляризации коррелировала с толщиной опухоли (коэфф. корреляции Спирмена:  $r_s = 0,49$ ;  $p=0,001$ ). Связь имела среднюю силу и была двусторонней, что наглядно демонстрирует линия тренда на рисунке 28 .

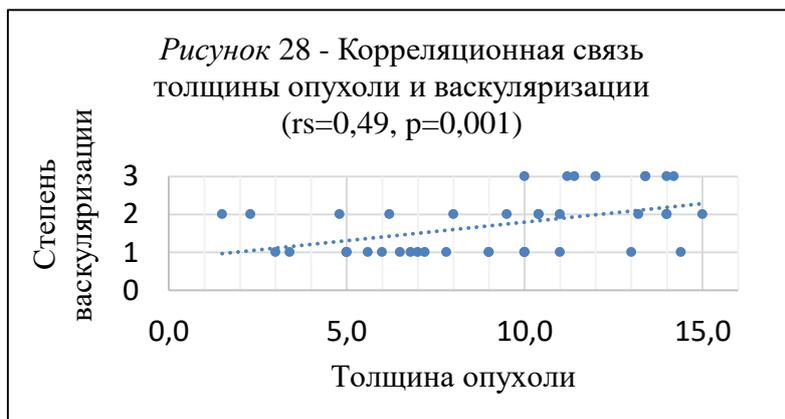


Рисунок 28 – Корреляционная связь толщины опухоли и васкуляризации. По оси X – отложена толщина опухоли в мм, а по оси Y — степень васкуляризации.

Заметим, интенсивно васкуляризованные УМ (3 тип) отличались интенсивной пигментацией (коэфф. корр. Спирмена  $r_s = -0,39$ ;  $p=0,002$ ), наличием областей с высокой митотической активностью (Спирмена  $r_s = 0,43$ ;  $p=0,02$ ) и наличием апоптотических областей (коэфф. корр Спирмена  $r_s = -0,44$ ;  $p=0,01$ ).

Тип васкуляризации по MVD в УМ слабо коррелировал с развитием метастазов и выживаемостью больных УМ: коэфф. корреляции Спирмена  $r_s = 0,35165$ ;  $p=0,006$  и  $r_s =$

0,44969;  $p=0,005$ , соответственно. Выявлена также достоверная, слабая отрицательная связь 3 типа васкуляризации с выживаемостью (коэфф. корр по Спирмену  $r_s = 0,23972^-$ ;  $p=0,05$ ,  $r_s = 0,37669^-$ ;  $p=0,003$ , соответственно).

Однако при анализе выживаемости по Каплан-Мейеру эта связь не нашла статистического подтверждения, возможно из-за цензурированности наблюдений (Таблица 52)

При этом выживших пациентов с 3 типом васкуляризации оказалось достоверно меньше ( $p= 0, 0,00006$ ), чем с 1 типом.

Таблица 51 – Сводный отчет по цензурированным наблюдениям в подгруппах, распределенных на основании типа васкуляризации (MVD) УМ

Тип васкуляризации	Всего	Число случаев мтса	Число выживших без мтса	Проценты
1	21	0	21	100,0
2	51	14	37	72,5
3	26	14	12	53,8
Всего:	98			

Сроки дожития при 3 типе васкуляризации также были почти в 2 раза короче, чем при 2 типе (Таблица 52), хотя высоко достоверной разницы не получено ( $p=0,07$ , 3 теста сравнения ).

Таблица 52 -Средние значения и медианы времени выживания при 2 и 3 типах гистологической васкуляризации (MVD)

Тип	Среднее <sup>a</sup>				Медиана			
	Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
2	162,67	13,17	136,85	188,49	155,5	35,8	77,8	185,9
3	88,50	22,26	44,86	132,14	72,00	34,64	4,10	139,90

Примечание: а. Если выполняется цензурирование, оценка ограничена наибольшим временем выживания.

Поскольку при 1 типе васкуляризации выбывания не выявлено, кривые выживаемости цензурированных наблюдений по Каплан-Мейеру были построены по цензурированным наблюдениям среди больных со 2 и 3 типом васкуляризации. Кривые демонстрируют появление достоверных различий **только к 60 мес после энуклеации и отсутствие таковых в более ранние сроки наблюдения** (Рисунок 29)

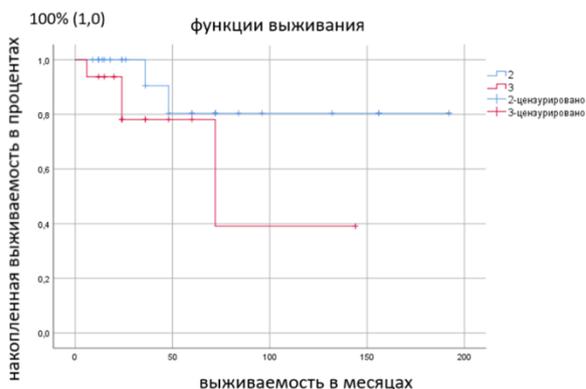


Рисунок 29 – График выживаемости по Каплан-Мейеру при 2 (синяя линия) и 3 (красная линия) типе васкуляризации (по MVD). По оси X – отложено время в месяцах, а по оси Y — вероятность, или функция выживаемости.

Таким образом, гистологический тип васкуляризации УМ по MVD – информативный показатель, ассоциированный с выживаемостью, а, следовательно, потенциально пригодный для прогнозирования.

#### 4.2 Изучение васкуляризации увеальной меланомы по ИГХ-экспрессии клеточных маркеров эндотелиальных клеток CD31 и CD34

Ангиогенез УМ изучали с помощью ИГХ методов исследований и клеточных маркеров эндотелиальных клеток - **CD34** и **CD31**.

Маркеры ЭК CD31 и CD 34 экспрессировались во всех (100%) УМ. В таблице 53 представлено распределение ИГХ-паттернов по экспрессии CD31 и CD34.

По аналогии с гистологическим показателем MVD градировали 3 типа ИГХ-паттернов: 1 тип присваивали УМ при малом количестве ИГХ-окрашенных сосудов: 1-2 сосуда в 10 полях зрения; 2 тип присваивали УМ при окрашивании 3-9 сосудов в 10 полях зрения; 3 тип - при окрашивании  $\geq 9$  сосудов в 10 полях зрения (при увеличении микроскопа  $\times 400$ ).

Как видно из представленных в табл 53 данных, CD34 и CD31 одинаково часто формировали I тип ИГХ-паттерна. При визуализации сосудов маркером CD34 III тип ИГХ-паттерна обнаруживали в 1,3 раза чаще по сравнению с CD31.

Не выявлено достоверной связи между ИГХ паттерном УМ по экспрессии CD31 или CD34, с одной стороны, и возрастом, гендерной принадлежностью и/или стадией заболевания, с другой стороны.

Таблица 53 - Частота распределения типов ИГХ-паттерна по экспрессии CD31 и CD34

Тип ИГХ-паттерна	Экспрессия CD31		Экспрессия CD34	
	Абс.число	%	Абс.число	%
I тип	21	21,4	21	21,4
II тип	51	52,6	45	45,9
III тип	26	27,1	32	32,6
Всего:	98	100,0	98	100,0

Однако такая связь выявлена с гистологическим типом УМ: в веретенноклеточных УМ достоверно чаще выявляли I тип ИГХ паттерна как по экспрессии CD34, так и экспрессии CD31: 46,1% и 69,2% против 28,6% и 28,6% при эпителиоидных, соответственно ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ; Таблица 54)

Таблица 54 - Распределение ИГХ-паттернов в зависимости от типа клеточного строения УМ

Тип клеточного строения	n	ИГХ-паттерн по экспрессии CD34			ИГХ-паттерн по экспрессии CD31		
		I (%)	II (%)	III (%)	I (%)	II (%)	III (%)
Веретенноклеточная А	13	6 *	3	4	9 **	0	4
Веретенноклеточная В	51	6 (11,8)	39 (76,5)	6 (11,8)	18 (35,3)	25 (49,0)	8 (15,7)
Эпителиоидная	34	10 (29,4)	12 (35,3)	12 (35,3)	10 (29,4)	12 (35,3)	12(35,3)
<b>Всего:</b>	98						

Примечание: достоверность различий между веретенноклеточными и эпителиоидными \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,05$ .

ИГХ-паттерн увеличивался по мере нарастания ядерной атипии в УМ (Таблица 55). Коэффициент корреляции по Спирману:  $r_s = 0,43$  ( $p < 0,01$ )

Экспрессия CD31 нарастала по мере увеличения толщины опухоли. Связь была умеренной, достоверной: коэфф. корреляции по Спирману ( $r_s = 0,4662$  ( $p = 0,021$ ))

Таблица 55- Распределение ИГХ-паттернов в зависимости от степени ядерной атипии в УМ

Атипия ядер	Абс. число: n	ИГХ-паттерн по экспрессии CD34			ИГХ-паттерн по экспрессии CD31		
		I тип (%)	II тип (%)	III тип (%)	I тип	II тип	III тип
Слабая	13	13*	0	0	13*	0	0
Умеренная	48	14 (29,2)	27 (56,3)	7 (14,6)	11(22,9)	26 (54,2)	11 (22,9)
Выраженная	37	0	16 (43,2)	21 (56,8)	7 (18,9)	7 (18,9)	23 (62,2)
Всего:	98						

Примечание: достоверность различий между слабой атипией и выраженной \*  $p < 0,01$ ;

Угол наклона линии тренда на рисунке 30 демонстрирует устойчивую прямую, высоко достоверную, корреляционную связь умеренной силы: усиление градации ИГХ-паттерна от 1 к 3 (ось Y) с увеличением толщины опухоли (ось X). Коэфф. корр. по Спирману:  $r_s = 0,46662$ ;  $p = 0,0021$ ).

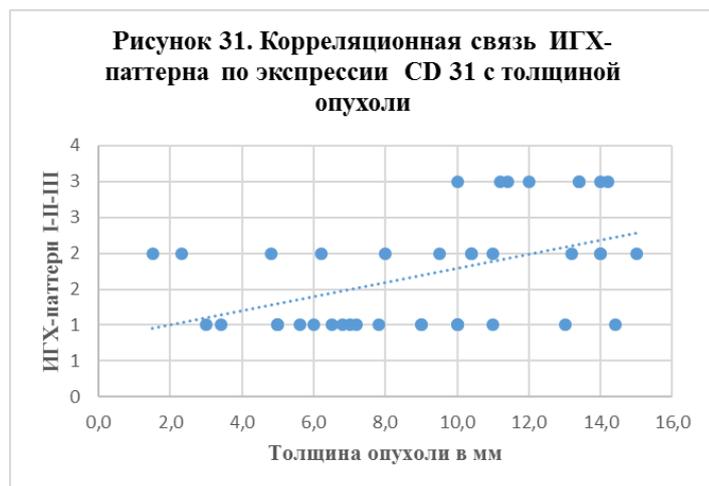
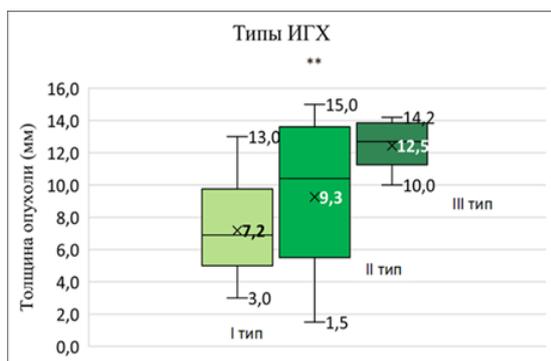


Рисунок 31. Корреляционная связь ИГХ-паттерна экспрессии CD31 с толщиной опухоли. По оси X – отложена толщина в мм, а по оси Y — паттерн ИГХ.

Аналогичная прямая связь между высотой УМ и типом ИГХ-паттерна прослеживается по экспрессии CD 34 (коэфф. Спирмена  $r_s = 0,44$ ;  $p = 0,01$ , Рисунок 32). 1 тип ассоциировался с УМ толщиной от 3,0 до 13,0 мм (медиана 7,2 мм), 2 тип – для опухолей толщиной от 1,5 до 15,0 мм (медиана 9,3 мм), 3 тип – для толстых УМ 10-14,2 мм (медиана 12,5 мм).



Примечание: \*\*  $p < 0,001$

Рисунок 32 - Взаимосвязь ИГХ-паттерна по экспрессии CD 34 с толщиной опухоли. По критерию Манна-Уитни (U-test) разница достоверна между 1 и 3 типами ИГХ. Между 1–2 и 2–3 типами нет достоверной разницы.

ИГХ-Паттерн усиливался с увеличением объема опухоли (Рисунок 33) (коэфф. Спирмана: 0,76;  $p < 0,001$ ). Связь заключалась в повышении частоты гиперэкспрессии CD31 эндотелиальными клетками при повышении объема УМ (рисунок 33)

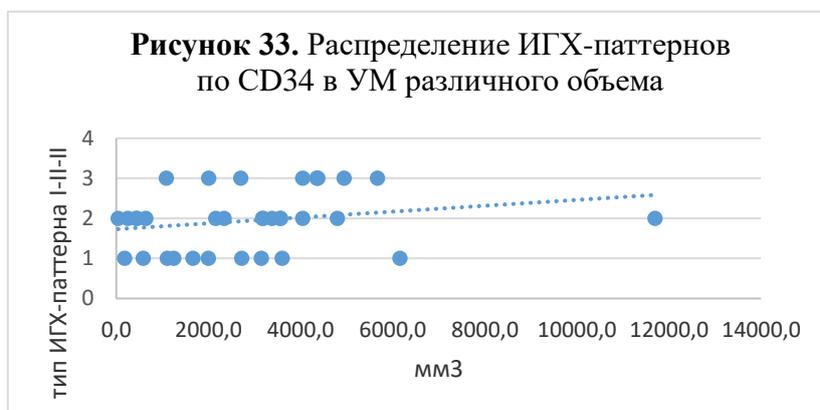


Рисунок 33 – Распределение ИГХ-паттернов по CD34 в УМ различного объема. По оси X – отложен объем в мм<sup>3</sup>, а по оси Y — паттерн ИГХ.

В таблице 56 представлены выявленные корреляционные связи между экспрессией CD31 и CD34 и клинико-морфологическими признаками УМ.

Таблица 56 – Коэффициенты корреляции между экспрессией маркеров CD31 и CD34 и клинико- морфологическими показателями

Показатель	Экспрессия CD31	Коэффициент корреляции: r	Экспрессия CD34	Коэффициент корреляции: r
Васкуляризация по MVD	0,63	<0,0001	0,53	<0,001
Митотическая активность	0,2	0,21	0,47	<0,01
Ядерная атипия	0,43	<0,01	0,41	<0,05
Геморрагии в УМ	0,33	<0,05	0,45	<0,01
Экспрессия CD34	0,84	<0,0001	-	-
Толщина опухоли	0,49	0,001	0,33	0,06
Объем опухоли	0,38	0,01	0,76	<0,001

Интенсивность экспрессии маркеров ЭК CD31 и CD34 прямо коррелировала со степенью пигментации УМ.

Информативность, надежность и точность маркеров CD31 и CD34 в оценке ангиогенеза УМ проверили, сопоставив гистологический показатель васкуляризации УМ MVD с ИГХ-типом. Достоверность совпадения высокая (см. таблицу 57).

Таблица 57 - Сопоставление гистологического показателя плотности сосудов MVD с ИГХ-паттерном по CD34 и CD31 в УМ

Тип MVD	ИГХ-паттерн по экспрессии CD31 Абс число (%)			ИГХ-паттерн по экспрессии CD34 Абс число (%)		
	1 тип	2 тип	3 тип	1 тип	2 тип	3 тип
I	8 *	3*	1	6	4	2
II	4 (12,9%)	22 (70,9%)	5 (16,2%)	4 (13,0%)	20 (64,5%)	7 (22,5%)
III	0 (0,0%)	6 (37,5%)	10 (62,5%)	1 (6,2%)	2 (12,5%)	13 (81,3%)
Всего: 98	12	31	16	11	26	22

Примечание: \*-  $p < 0.05$  по сравнению с аналогичным показателем в группе сопоставления с маркером CD31. Вместе с тем, коэффициенты корреляции между MVD (плотность сосудов в УМ) и ИГХ-паттерном по CD31 или CD34 не достаточно высоки:  $r_1 = 0,63$ ,  $r_2 = 0,53$ , соответственно. Причины следующие...

Установлено, что на световом уровне в каждой третьей опухоли (33,4%) идентифицировать и/или подсчитать точно количество сосудов на срезе не удастся по причине компрессии сосудов опухолевыми клетками или пребывания их в начальной стадии ангиогенеза – на этапе сборки сосуда и подготовки к запуску кровотока (Рисунок 34).

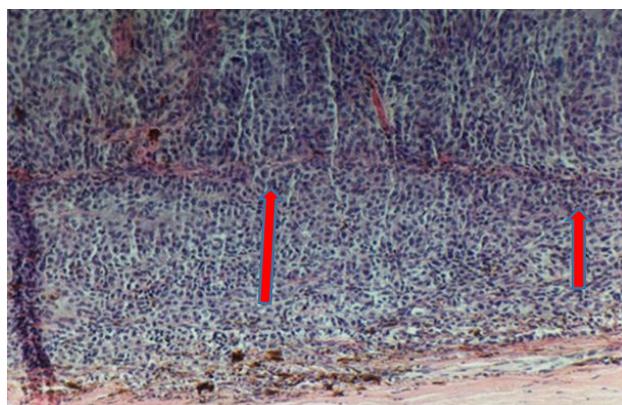
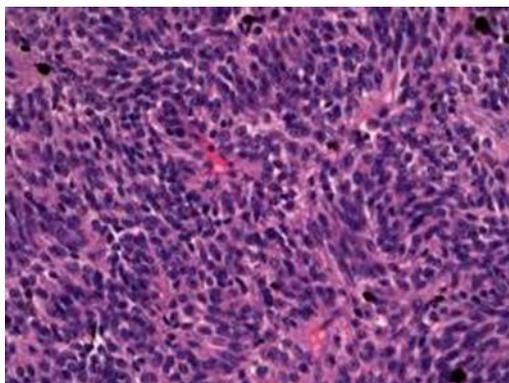


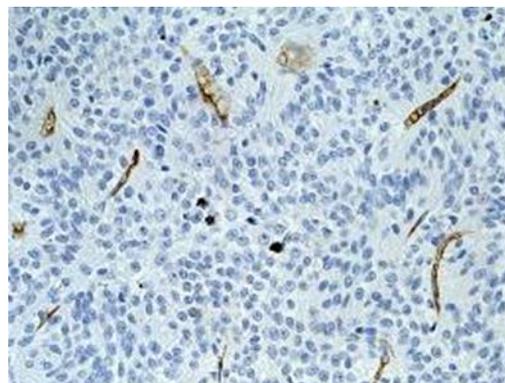
Рисунок 34 - Компрессия и облитерация сосудов в основании меланомы опухолевым пролифератом (Гистолог. 62359, гематоксилин и эозин, x100).

В таких случаях, благодаря ИГХ-окрашиванию маркерами CD34 и CD31 скрытые и компрессированные сосуды визуализируются (Рисунок 34). Такой подход обеспечил в 8,4%

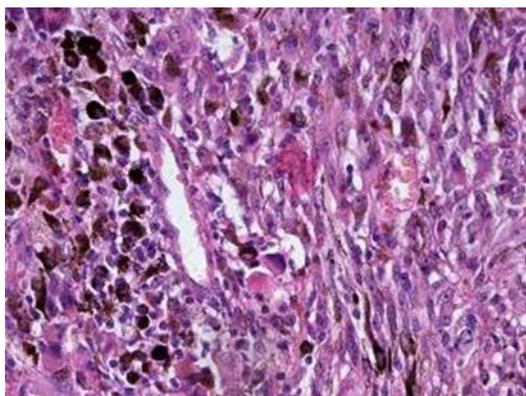
случаев с I типом васкуляризации выявить невидимые на световом уровне сосуды и отнести УМ к 3 типу ИГХ-паттерна, а еще 25% - ко 2 типу ИГХ-паттерна по CD31: процент повышения градации ИГХ-паттерна по CD34 и вовсе составил 16,6% и 33,4%, соответственно. То есть, в реальных количествах интратуморальных сосудов на единицу площади в зоне просмотра ИГХ реакций превышало показатели MVD. (Таблица 57) При III типе васкуляризации данные гистологии и ИГХ совпали только в 81,3% УМ по данным CD34 и 62,5% по данным CD31.



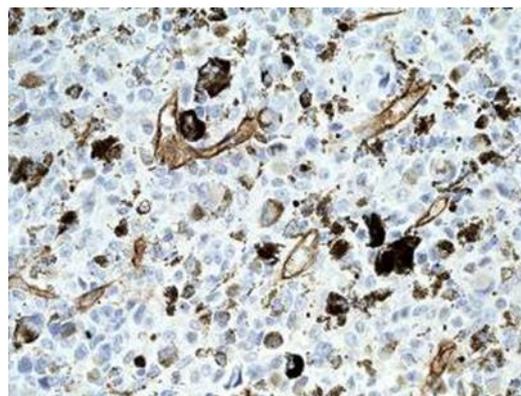
А: Гематоксилин-эозин, слабая васкуляризация УМ, I тип MVD, x400 ув.



Б; ИГХ-реакция с CD31 (++) в УМ, представленной на рис 1А, x400; соответствует 2 типу ИГХ-паттерна



В: Гематоксилин-эозин, II тип MVD, x400 ув.



ИГХ-реакция с CD31 (++) в УМ, представленной на рис 1А, x400; соответствует 2 типу ИГХ-паттерна

Рисунок 35 - Сопоставление гистологических типов васкуляризации по MVD с ИГХ-паттерном по CD 31 и CD34.

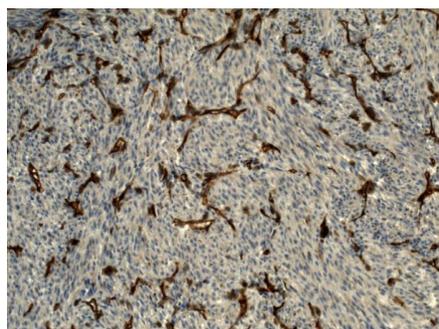
Представленные корреляционные данные свидетельствуют о хорошей чувствительности и специфичности маркеров ЭК и их высоком потенциале в визуализации скрытых сосудов в опухоли. В этом аспекте при визуализации скрытых или компрессированных сосудов CD31 был менее чувствителен. Заметим, в ИГХ-анализе зафиксированы случаи как повышения градации в сторону более высокого ИГХ-паттерна по обоим маркерам (15,2% и 22% по CD31 и CD34), так и понижения (17,9 и 11,8%, соответственно). В 17,9% УМ, из-за слабой экспрессии CD31 произошло снижение градации и перевод со II типа васкуляризации на 1 тип ИГХ-паттерна и с

III типа на 2 тип ИГХ паттерна. При III типе васкуляризации совпадение с 3типом ИГХ-паттерна по CD34 имело место в 81,3% УМ, а по CD 31 – в 62,5%.

Полагаем, что менее высокая **чувствительность CD31**, по сравнению с CD34, объясняется несколькими причинами. Ключевым отличием маркера CD31 является тот факт, что CD31 не окрашивает предшествующие ангиобласты, но окрашивает зрелые ЭК сосудистой стенки. Второй причиной может быть высокая **специфичность CD31 к непрерывному эндотелию**. Между тем, известно, что ангиогенез в опухоли – непрерывный циклический процесс, во время которого зрелые сосуды сосуществуют с незрелыми сосудами, пребывающим на стадии «сборки», и характеризующимися неполной выстилкой стенки ЭК. На этом этапе CD31 может демонстрировать ложно-негативные результаты ИГХ-окрашивания. Кроме того, как известно, сосуды в УМ могут иметь фенестры, что также снижает чувствительность ИГХ-окрашивания CD31. И этот факт может быть третьей причиной.

Следует отметить, что при использовании маркера CD34 в 11,9% УМ также произошло снижение ранга васкуляризации. Однако в случае экспрессии CD34 этот феномен был обусловлен сосудистой мимикрией, при которой опухолевые сосуды вовсе не имеют эндотелиальной выстилки, а ее функции выполняют базальные мембраны опухолевых клеток. Такие сосуды развиваются чаще при меланоме цилиарной и цилиохориоидальной локализации.

По нашим данным ИГХ-возможности CD34 по визуализации сосудов намного шире. Маркер CD34 окрашивает практически все структуры сосудистой стенки, включая не только эндотелиальную выстилку, но и базальную мембрану сосуда (рис 36Б).



А: ИГХ-экспрессия CD34 в УМ, № 56861,ув x 200      Б: ИГХ-экспрессия CD34 в УМ №56967, ув x 200

Рисунок 36 – ИГХ-визуализация сосудов увеальной меланомы с маркерами CD34

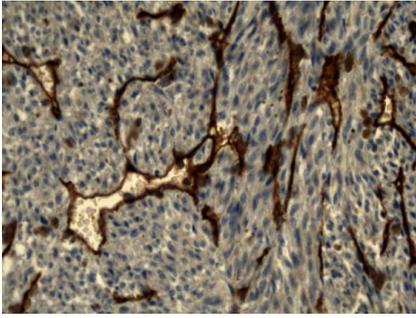


Рисунок 36 - В: визуализация сосудов с помощью ИГХ-реакции с помощью маркера CD34. Отчетливо видны ответвления более мелких сосудов от главного крупного дилатированного сосуда; №64854, ув x 400.

При ИГХ-окрашивании CD34 сосуды визуализировались более контрастно и появилась возможность изучить форму сосуда внутри опухоли, его ветви и его контакты с прилежащими питающими (фидерными) сосудами (Рисунок 36В). Выявлена слабая, отрицательная, но достоверная корреляционная связь между выживаемостью и наличием III типа ИГХ-паттерна по экспрессии CD31 (коэфф. корр. по Спирмену  $r_s = 0,39442$  ( $p < 0,05$ )).

Экспрессия CD34 по III типу ИГХ-паттерна также коррелировала с выживаемостью: коэфф. корр. по Спирмену  $r_s = 0,30086$ , ( $p = 0,05$ ), соответственно.

Ниже представлены средние сроки и медиана выживаемости по экспрессии CD34 (табл 58) и CD31 (табл 58)

Таблица 58- Средние сроки выживаемости и медиана по 2 и 3 ИГХ-типу (маркер CD34)

Тип	Среднее <sup>a</sup>				Медиана			
	Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
2	158,03	21,52	115,85	200,20	175,0	35,6	115,6	202,0
3	62,40	12,14	38,60	86,20	72,0	20,0	40,8	85,6

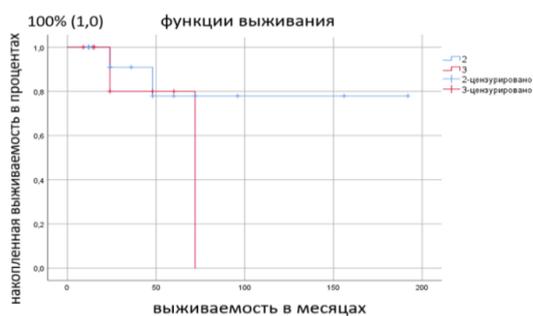


Рисунок 37 – Кривые выживаемости цензурированных наблюдений по Каплан-Мейеру по экспрессии CD34. По оси X – отложено время в месяцах, а по оси Y – вероятность, или функция выживаемости. Голубая линия – кривая при 2 типе ИГХ-паттерна, красная линия – при 3 типе.

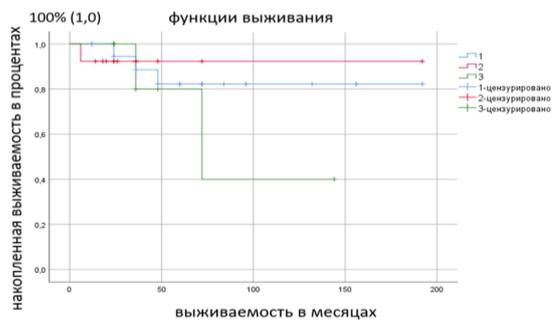


Рисунок 38 – Кривые выживаемости по Каплан-Мейеру при разных ИГХ-типах экспрессии CD31. По оси X – отложено время в месяцах, а по оси Y – вероятность, или функция выживаемости. Голубая линия – кривая при 1 ИГХ-паттерне, красная линия – при 2 типе, и зеленая – при 3 типе.

Для уточнения информативности и достоверности количественной оценки экспрессии CD34 в качестве самостоятельного и независимого маркера витального прогноза **традиционно** использовали сравнительный анализ 5-летней выживаемости цензурированных пациентов. Больных УМ со 2 типом экспрессии маркера (10 человек, голубая линия) сравнивали с выживаемостью в когорте больных УМ с умеренной и выраженной экспрессией CD34 (25 человек, красная линия) Из приведенного графика отчетливо видно, что выживаемость при 2 типе экспрессии CD34 в УМ составила 90 % к 5 годам наблюдения, а при 3 типе – всего 10 % при том же сроке наблюдения (рисунок 37). Заметим, этот клеточный маркер не «сработал» в отдаленном прогнозе по причине меланома-ассоциированной смерти всех больных.

Кривые выживаемости на рисунке 38 также демонстрируют более быстрое выбывание больных с 3 ИГХ-типом экспрессии CD31 в первые 60 мес наблюдения. К 5-летнему сроку выбыло 60% больных с 3 ИГХ-типом экспрессии УМ, в то время как среди больных с 2 типом выбыло только 18% и при 1 типе - 8%. При этом достоверность различий не подтверждена статистически.

#### 4.3 Изучение ИГХ-экспрессии молекулярного маркера VEGF в увеальной меланоме

Нами было установлено, что продуцентами молекулы VEGF являются две популяции клеток: опухолевые клетки и эндотелиальные клетки. Экспрессия VEGF опухолевыми клетками (ОК) начиналась в УМ, менее 2 мм толщины. Экспрессия VEGF эндотелиальными клетками (ЭК) опаздывала и начиналась когда пролиферат УМ превышал по высоте 2 мм. С целью понимания значения этого феномена мы рассматривали эти события как две различных характеристики одного процесса.

### Исследование экспрессии VEGF в клетках увеальной меланомы

Большинство (63,0%) УМ экспрессируют VEGF в опухолевых клетках (ОК). Количество VEGF+ ОК в поле зрения варьируется от опухоли к опухоли в широком коридоре значений: от 0 до 70. Наибольшая численность (70,0%) популяции VEGF+ ОК зафиксирована на начальных стадиях роста УМ – Т1. По мере прогрессирования неопластического процесса от Т1 к → Т4 количество VEGF+ОК сокращалось в 2 раза. Высоко достоверна разница в ИГХ показателях на ранних и поздних стадиях ( $p < 0,001$ ). (Рисунок 39)



Рисунок 39 - Кинетика VEGF – положительных клеток на разных стадиях УМ (синий цвет – опухолевые клетки, голубой – эндотелиальные клетки).

### Экспрессия VEGF в эндотелиальных клетках интратуморальных сосудов УМ

Экспрессия VEGF в эндотелиальных клетках (ЭК) интратуморальных сосудов имела место в 32,3% УМ, в половине из них все (100%) ЭК экспрессировали VEGF. Как видно из Рисунок 39 ЭК приступили к экспрессии VEGF позже ОК – на стадии Т<sub>2</sub> УМ. Обе популяции клеток стали равнозначными продуцентами на стадии Т<sub>4</sub> при выходе опухоли за пределы фиброзной оболочки глаза. Заметим, если сравнивать «вклад» 2 популяций клеток в продукцию VEGF, то доминируют в этом процессе, безусловно, ОК УМ, а не ЭК сосудов (Рисунок 40).

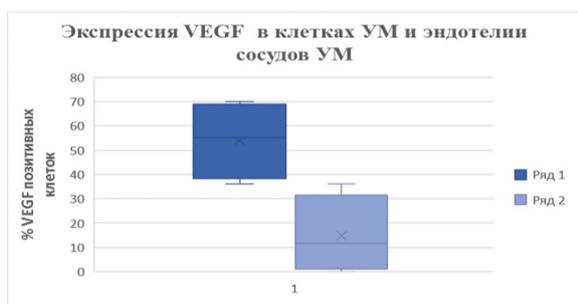


Рисунок 40 – Процентное соотношение VEGF+ опухолевых (синий цвет) и эндотелиальных клеток (голубой цвет) в УМ. Достоверна межпопуляционная разница VEGF+ клеток ( $p \leq 0,001$ ).

Наряду с количеством VEGF+ клеток в качестве критерия оценки уровня экспрессии использовали показатели средне-групповой интенсивности ИГХ-окрашивания клетки, оценивая ее в баллах. В целом по УМ градацию I выявляли в 31,3% случаев, градацию II - в 12,5%, и градация III - в 18,8% (Таблица 60). 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%) (Таблица 60). Численность популяции опухолевых клеток, умеренно и интенсивно экспрессирующих VEGF сокращалась при переходе от стадии Т<sub>2</sub> к стадии Т<sub>4</sub>, популяция слабо экспрессирующих VEGF ОК росла.

Таблица 60 - Экспрессия VEGF на разных стадиях УМ

Показатель экспрессии	Экспрессия VEGF в опухолевых клетках УМ		Экспрессия VEGF в эндотелиальных клетках	
	% VEGF+ клеток	Средне-групповая интенсивность в баллах	% VEGF+ клеток	Средне-групповая интенсивность в баллах
Всего: n=98				
Слабая экспрессия градация I	61,7	2,5±0,7	4,3	1,4±0,7
Умеренная экспрессия градация II	18,8		9,4	
Гиперэкспрессия градация III	19,5		17,7	
<b>Стадия заболевания: T<sub>1</sub></b>				
Слабая экспрессия градация I	25,0	2,3 ±0,6	0,0	0,0
Умеренная экспрессия градация II	35,0		0,0	
Гиперэкспрессия градация III	45,0		0,0	
<b>Стадия заболевания: T<sub>2</sub></b>				
Слабая экспрессия градация I	33,4	1,3±0,5	5,3	1,0±0,2
Умеренная экспрессия градация II	33,3		0,0	
Гиперэкспрессия градация III	33,3		0,0	
<b>Стадия заболевания: T<sub>3</sub></b>				
Слабая экспрессия градация I	64,8	1,7±0,2	88,2	0,8±0,5
Умеренная экспрессия градация II	17,2		10,2	
Гиперэкспрессия градация III	18,0		1,6	
<b>Стадия заболевания: T<sub>4</sub></b>				
Слабая экспрессия градация I	72,2	0,6±0,2	0,0	1,5±0,9
Умеренная экспрессия градация II	12,0		15,8	
Гиперэкспрессия градация III	15,8		54,5	

Кинетика экспрессии VEGF ОК в баллах на различных стадиях заболевания, высчитанная по средне-групповым показателям интенсивности, свидетельствовала о цикличности с уменьшением интенсивности экспрессии по мере прогрессирования онкологического процесса. Пик интенсивности ( $M \pm m$ ) зафиксирован при начальной меланоме T<sub>1</sub> ( $M_{ср.} = 2,3 \pm 0,6$ ), снижение экспрессии имело место на стадии T<sub>2</sub> ( $M_{ср.} = 1,3 \pm 0,5$ ), умеренный «всплеск» продукции ( $M_{ср.} = 1,7 \pm 0,2$ ) – на стадии T<sub>3</sub>, и спад ( $M_{ср.} = 0,6 \pm 0,2$ ) – при массивном прорастании опухоли фиброзной оболочки глаза. Рисунок 41 наглядно демонстрирует выявленную закономерность. Кинетика интенсивности экспрессии VEGF ЭК на графике выглядит как «зеркальное отражение» ОК.



Рисунок 41 - Кинетика интенсивности экспрессии VEGF на разных стадиях заболевания в клетках увеальной меланомы (синяя линия) и эндотелиальных клетках (оранжевая линия).

Выявлены корреляции клинических и морфологических показателей с ИГХ-показателями экспрессии VEGF. Так, достоверна прямая связь экспрессии VEGF в ЭК сосудов со стадией заболевания и гистологическими показателями. Экспрессия VEGF ОК зависела от типа клеточного строения УМ. Эпителиодно-клеточные УМ экспрессировали более интенсивно, чем веретенноклеточные УМ (Таблица 61). Разница в экспрессии, по-видимому, отражала интенсивность ангиогенеза в УМ различных клеточных типов.

Таблица 61 - Показатели экспрессии VEGF в зависимости от типа клеточного строения УМ

Показатель	Экспрессия VEGF в опухолевых клетках УМ		Экспрессия VEGF в эндотелиальных клетках	
	% VEGF+ клеток	Средне-групповая интенсивность в баллах	% VEGF+ клеток	Средне-групповая интенсивность в баллах
Веретенноклеточные А	37,4	1,1 ± 0,1	17,9 ± 7,0,	0,7 ± 0,1
Веретенноклеточные Б	50,4 ± 7,7	1,3 ± 0,2	12,4 ± 4,2%	1,1 ± 0,2
Эпителиоидные	43,8 ± 9,3	1,5 ± 0,5	17,1 ± 5,4%	1,3 ± 0,5
Всего: 98				

Корреляционный анализ выявил достоверные корреляции показателей экспрессии VEGF с классическими общепризнанными предикторами прогноза, как стадия заболевания (только ЭК), толщина (ОК/ЭК), локализации (ОК/ЭК), клеточный тип строения (только по ОК) и наибольший диаметр основания УМ (ОК/ЭК) (таблица 64)

Таблица 62 - Коэффициенты корреляции показателей экспрессии VEGF с клиническими и гистологическими показателями

Показатель	Коэфф. корреляции , р			
	Интенсивность экспрессии VEGF	Достоверность связи: р	Процент VEGF <sup>+</sup> клеток	Достоверность связи: р
<b>Экспрессия VEGF в эндотелии сосудов</b>				
Стадия УМ	k=0,47635	<0,01	k=0,43981	<0,05
Максимальный диаметр	k=0,53523	<0,001	k=0,6234	<0,001
Толщина	k=0,53523	<0,001	k=0,6234	<0,001
Локализация	k=0,4832	<0,01	k=0,5451	<0,01
Клеточный тип строения	k=0,2371	н/д	k=0,2682	н/д
<b>Экспрессия VEGF в опухолевых клетках</b>				
Стадия УМ	k=0,27612	н/д	k=0,23981	н/д
Максимальный диаметр	k=0,53523	<0,001	k=0,6234	<0,001
Толщина	k=0,7245	<0,001	k=0,6823	<0,001
Локализация	k=0,4832	<0,01	k=0,5451	<0,01
Клеточный тип строения	k=0,6371	<0,001	k=0,5822	<0,001

**Экспрессия VEGF в ЭК** прямо коррелировала с **максимальным диаметром** основания опухоли: с его увеличением увеличивался процент VEGF-позитивных клеток и средне-групповая интенсивность ИГХ экспрессии. Гиперэкспрессия VEGF в ЭК сосудов ассоциировалась с поздними стадиями УМ с высоким риском метастазирования. Кроме того, экспрессия VEGF ЭК ассоциировалась с **локализацией опухоли**. Эндотелий в сосудах меланом радужки и меланом цилиарного тела не экспрессировал этот цитокин. Количество VEGF<sup>+</sup> эндотелиальных клеток в меланомах хориоидеи резко возрастало при вовлечении в процесс

экваториальной зоны. Гиперэкспрессия VEGF ЭК ассоциировалась с прогрессированием УМ по протяженности с вовлечением новых зон глаза, ростом в высоту, с инвазией склеры и выходом за пределы глаза, то есть, с показателями, традиционно считающимися прогностически неблагоприятными и относящимися к клиническим факторам повышенного риска метастазирования (табл 62).

**Экспрессия VEGF в ОК** также прямо коррелировала с наибольшим диаметром основания, но еще более значимо с высотой опухоли, ее клеточным типом строения. При этом достоверная связь со стадией заболевания отсутствовала (Таблица 62).

### *Резюме*

Уvealная меланома — злокачественная опухоль, формирующая «ангиогенный фенотип» на базовом уровне (T1) и экспрессирующая VEGF двумя популяциями клеток — опухолевыми и эндотелиальными. Изучены и описаны общие закономерности экспрессии VEGF на разных стадиях заболевания. Корреляционная связь экспрессии VEGF опухолевыми клетками с клеточным строением УМ, а также прямая связь экспрессии VEGF эндотелиальными клетками сосудов со стадией заболевания позволяют рассчитывать на прогностический потенциал показателей экспрессии VEGF. Однако эта гипотеза нуждалась в проверке.

#### **4.4 Изучение экспрессии рецептора VEGFR-2/Flk-KDR-1**

Невозможно переоценить роль VEGF в развитии любой опухоли. VEGF способствует выживанию клеток эндотелия и опухолевых клеток, запуская выработку белков-ингибиторов апоптоза Bcl-2, A1 и сурвивина; VEGF проявляет митогенные эффекты, вызывает хемотаксис моноцитов [15]. VEGF активирует экспрессию оксида азота, простаглицлина и других цитокинов, способствующих вазодилатации. Однако все эти эффекты возможны только при наличии высоко афинной связи с соответствующими мембранными или растворимыми рецепторами: Flk-KDR-1 и Flt. Поэтому, экспрессию VEGF целесообразно изучать в тандеме с ключевыми рецепторами.

В анализе экспрессии использовали 2 показателя: процент иммунопозитивных клеток и интенсивность ИГХ-окрашивания ЭК (в баллах).

В ходе наших исследований было установлено, что рецептор VEGFR-2/Flk-KDR-1 экспрессируется в 22,1% УМ **исключительно эндотелием сосудов** в опухоли (Рисунок 43). Собственно опухолевые клетки не экспрессировали рецептор VEGFR-2/Flk-KDR-1 (далее: Flk). 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 экспрессией и гиперэкспрессией Flk (4,2% и 3,2%, соответственно) (Рисунок 42).

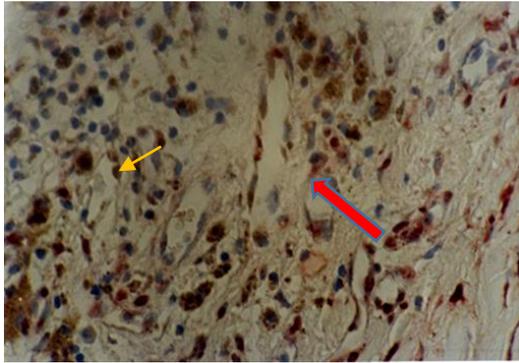


Рисунок 42 - ИГХ реакция с рецептором Flk в опухолевых сосудах (Гистол. № 59799,×400) (Желтые стрелки указывают на иммунопозитивные ЭК; красная стрелка – демонстрирует нарушение целостности выстилки и стенки сосуда).

#### Выявлены общие закономерности экспрессии рецептора Flk-KDR-1 в УМ:

- Отсутствовала базовая экспрессия рецептора (на стадии T1)
- Пик экспрессии по количеству иммунопозитивных клеток наблюдали на стадии T2, на следующих двух стадиях имел место спад. Так, средний процент Flk+ клеток на стадии T2 составлял  $15,0 \pm 11,0\%$ , к стадии T4 он снижался до  $8,8 \pm 5,5\%$ , составляя при инвазии склеры на 75% по толщине -  $2,6 \pm 2,2\%$ .

- Средне-групповая ИГХ-интенсивность 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, где эндотелиальная выстилка на стенках сосуда прерывалась или была разрушена сама стенка сосуда (Рисунок 42).

Таблица 63 - Экспрессия рецептора Flk на различных стадиях УМ

Стадия УМ	Асб. число УМ	Средний процент Flk + клеток (M±m)	Средняя интенсивность ИГХ-экспрессии Flk (M±m)
T <sub>1</sub>	9	-	-
T <sub>2</sub>	25	$15,0 \pm 11,0$	1,6
T <sub>3</sub>	36	$13,7 \pm 6,6$	1,3
T <sub>4</sub>	28	$8,8 \pm 5,5$	1,0

Обнаружена связь экспрессии рецептора Flk с локализацией опухоли. Установлено, что меланомы радужки и иридоцилиарные меланомы не экспрессируют этот рецептор. 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 T1). Но, возможно, причина и в другом. Отсутствие рецепторов Flk в меланомах радужки препятствует развитию интратуморальной сети сосудов. В свою очередь, отсутствие хорошо развитой собственной сосудистой сети тормозит рост меланом в передней камере глаза и создает препятствие на пути к метастазированию. Мы также не исключаем супрессию экспрессии Flk каким-либо природным пептидом с ангиостатическими свойствами, находящимся во влаге передней камеры (феномен иммунной привилегии, ассоциированный с передней камерой -ACAID).

Максимальный процент Flk+ клеток зафиксирован в меланомах, распространяющихся на экватор ( $M_{ср.}=16,7\pm 8,7\%$ ). Как ни странно, но преэкваatoriальные меланомы не отличались большим количеством Flk иммунопозитивных ЭК. Возможно, из-за того, что характер построения сосудистой сети преэкваatoriальных УМ принципиально иной. Возможно, что их кровоснабжение осуществляется за счет развивающихся анастомозов с собственной сосудистой сетью хориоидеи, то есть, 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  $15,1\pm 5,1\%$ . При увеличении протяженности до III градации рецепция Flk снижалась до  $7,4\pm 4,7\%$ , при более обширных меланомах (градация IV) вновь возрастал до  $14,4\pm 6,6\%$  (Таблица 64).

Таблица 64 - Экспрессия Flk в УМ различного гистологического строения

Гистологический тип УМ	Средний процент Flk+ клеток ( $M\pm m$ )	Средняя интенсивность ИГХ-окрашивания
Веретеночлеточные А (n=33)	$15,9\pm 5,4\%$	1,6
Веретеночлеточные Б (n=35)	$12,8\pm 5,2\%$	1,3
Эпителиоидные (n=30)	$3,7\pm 2,4\%*$	1,1*

Примечание: достоверность различий \* между веретеночлеточными и эпителиоидными УМ  $p<0,01$

Установлена высоко коррелятивная связь между клеточным типом меланомы и продукцией Flk: средний процент Flk-позитивных клеток в веретеночлеточной А УМ  $-15,9\pm 5,4$ ;

средняя интенсивность – 1,6; а в эпителиоидной –  $3,7 \pm 2,4\%$  ( $p < 0,01$ ) и 1,1. Результаты свидетельствуют, что более агрессивная эпителиоидная УМ экспрессирует рецептор Flk на низком уровне (Таблица 64). Экспрессия Flk обратно коррелировала с возрастом пациента. Чем старше был больной, тем слабее экспрессировался рецептор Flk ( $k = -0,4388$ ,  $p < 0,01$ ).

### *Резюме*

В небольшом проценте УМ (в 22,1%) экспрессируется эндотелиальными клетками мембранный рецептор Flk. Чаще его экспрессия встречается в меланоммах хориоидеи, что позволяет думать о том, что УМ этой локализации в своем ангиогенезе используют механизм рекрутинга и мобилизации циркулирующих предшественников ЭК костномозгового происхождения – ПЭК.

## **4.5 Изучение экспрессии рецептора VEGFR-1/Flt-1**

Наши ИГХ исследования показали, что экспрессия рецептора VEGF R-1/Flt-1 происходит на очень высоком уровне в **опухолевых клетках УМ**. Это говорит о высокоангиогенном фенотипе опухоли и зависимости ее ангиогенеза от экспрессии молекулы VEGF. При анализе экспрессии Flt-1 было обращено внимание на то, что в одних УМ наблюдается селективная рецепция Flt в ядре (Flt N), в других - в цитоплазме (Flt C), в-третьих УМ, рецепция происходит в обоих компартментах опухолевой клетки.

Для уточнения роли этого феномена мы рассматривали рецепцию Flt в цитоплазме и ее рецепцию в ядре как два самостоятельных независимых ИГХ показателя; оценивая этот феномен традиционно двумя экспертными показателями (количество иммунопозитивных клеток и интенсивность ИГХ окрашивания); наряду с этим, дополнительно были введены индексы их соотношения: Flt цитоплазмы/Flt ядра (Flt C/Flt N) и Flt ядра/Flt цитоплазмы (Flt N/Flt C) с их градациями  $\leq 1$ ,  $>1$  но  $< 3$  и  $\geq 3$ .

Анализировали взаимосвязь между данными ИГХ в качестве показателя ангиогенеза, с одной стороны, и клиническими симптомами или морфологическими характеристиками УМ, с другой стороны.

Большинство (80%) УМ экспрессировали *Flt в цитоплазме*, в 54,3% УМ все (100%) опухолевые клетки в поле зрения экспрессировали рецептор Flt. Более половины опухолей (56%) экспрессировали Flt в *ядре*, из них в 18,7% тестируемых УМ во всех (100%) опухолевых клетках зафиксировано ИГХ-окрашивание.

Поиск закономерностей экспрессии рецептора Flt вели по трем основным показателям: усредненному максимальному проценту иммунопозитивных клеток в срезах УМ (1), средне-групповому показателю интенсивности экспрессии, рассчитанному на каждой стадии (2) и усредненному индексу соотношений (3).

Выявлены следующие **общие закономерности экспрессии Flt** в клетках УМ (табл 65):

Таблица 65 -- Показатели экспрессии Flt на разных стадиях УМ

Показатель	Ядерная экспрессия Flt		Цитоплазматическая экспрессия Flt	
	% Flt + клеток	Средняя интенсивность экспрессии в баллах	% Flt + клеток	Средняя интенсивность экспрессии в баллах
<b>Всего: n=98</b>				
<b>Стадия заболевания: T<sub>1</sub></b>	<b>N=9</b>			
Слабая экспрессия градация I	5 (n)	1,5	3 (n)	1,8
Умеренная экспрессия градация II	1 (n)		1 (n)	
Гиперэкспрессия градация III	3 (n)		3 (n)	
<b>Стадия заболевания: T<sub>2</sub></b>	<b>N=25</b>			
Слабая экспрессия градация I	12,0%	2,5	8,0%	2,9
Умеренная экспрессия градация II	16,0%		16,0%	
Гиперэкспрессия градация III	72,0%		76,0%	
<b>Стадия заболевания: T<sub>3</sub></b>	<b>N=36</b>			
Слабая экспрессия градация I	19,4%	1,7	0,0%	2,2
Умеренная экспрессия градация II	64,0%		71,4%	
Гиперэкспрессия градация III	16,6%		28,6%	
<b>Стадия заболевания: T<sub>4</sub></b>	<b>N=28</b>			
Слабая экспрессия градация I	85,7%	1,1	71,4%	1,2
Умеренная экспрессия градация II	14,3%		14,3%	
Гиперэкспрессия градация III	0,0		14,3%	

✓ **Базовая экспрессия** рецептора имела место в самых маленьких пролифератах УМ. Так, гиперэкспрессия (градация III) Flt в ядре (3 из 9) и цитоплазме (3 из 9) имела место практически в каждой третьей УМ в стадии T<sub>1</sub>..

✓ **Пик рецепции** в целом по максимальному среднему проценту позитивных клеток ( $M \text{ ср.} \pm m$ ) и усредненной клеточной ИГХ-градации экспрессии зафиксирован **на стадии T<sub>2</sub>**, после чего происходил медленный спад до стадии T<sub>4</sub>. (Таблица 65).

✓ **Пик ядерной и цитоплазматической экспрессии Flt** по количеству иммунопозитивных клеток зафиксирован на стадии T<sub>2</sub>.

✓ Средне-групповой показатель интенсивности ( $M \text{ ср.} \pm m$ ) ядерной и цитоплазматической рецепции, представленный в таблице 66, подтверждал базовую экспрессию (на стадии T<sub>1</sub>), пик экспрессии на стадии T<sub>2</sub> и последующее снижение (на стадии T<sub>4</sub>)

Кинетика **интенсивности ИГХ-экспрессии** в цитоплазме (Flt C) и ядре (Flt N) на разных стадиях заболевания, практически повторяла кинетику другой характеристики - **процента иммунопозитивных клеток**, экспрессирующих рецептор в ядре и цитоплазме Flt C/Flt N (Рисунок 43).

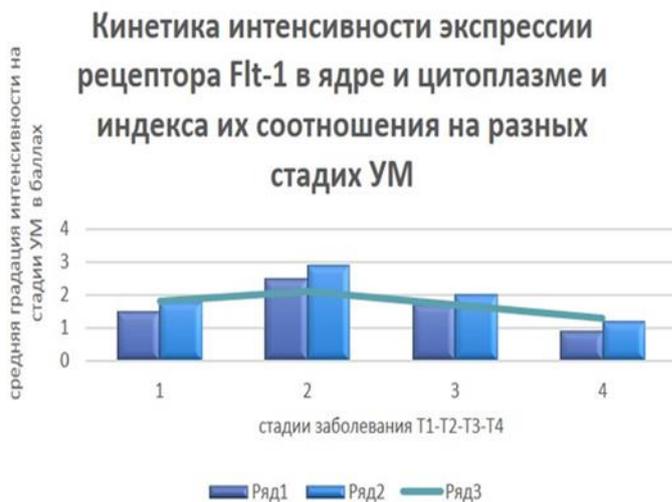


Рисунок 43 – Кинетика средне-группового показателя интенсивности ядерной (темно-синий цвет столбцов) и цитоплазматической (голубой цвет столбцов) экспрессии в клетках УМ. Голубая линия над столбцами демонстрирует кинетику индекса соотношения (Flt N/Flt C) на разных стадиях УМ. На оси абсцисс - стадии УМ: T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>-T<sub>3</sub>-T<sub>4</sub> (1-2-3-4). На оси ординат – средняя градация интенсивности экспрессии в баллах.

Цитоплазматическая экспрессия доминировала над ядерной по всем трем ИГХ-показателям: по количеству Flt+клеток, средне-групповому показателю экспрессии и индексу соотношения Flt C/Flt N.

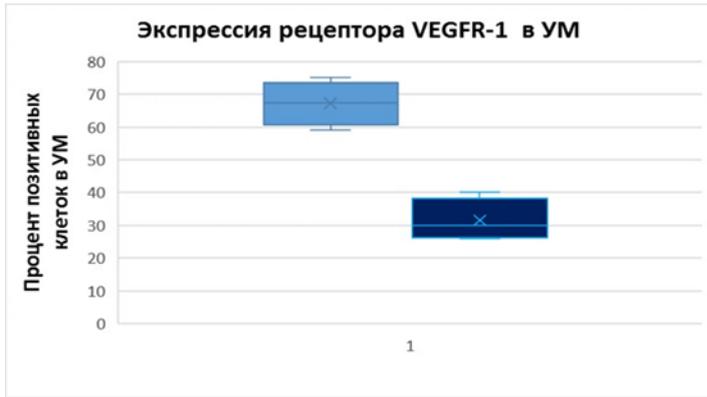


Рисунок 44 - Диаграмма демонстрирует размах численности популяции иммунопозитивных клеток УМ, экспрессирующих Flt C (голубой цвет) и Flt N (синий цвет) на разных стадиях УМ и доминирование клеток УМ, экспрессирующих Flt C ( $p < 0,01$ ).

Профиль рецепции зависел от типа гистологического строения УМ. В эпителиодных УМ количество Flt-иммунопозитивных клеток в поле зрения, экспрессирующих ядерный рецептор, превышало показатели веретенноклеточных меланом ( $p \leq 0,05$ ). При этом клеточном типе 41% опухолей избирательно экспрессировал Flt в ядре, что достоверно отличалось от УМ веретенноклеточного строения ( $p < 0,01$ ). Селективная рецепция Flt C чаще (в 60%) встречалась среди веретенноклеточных УМ ( $p < 0,01$ ) (Таблица 66).

Таблица 66 - Экспрессия Flt в зависимости от гистологического строения УМ

Гистологический тип УМ	Средний процент Flt C-позитивных клеток ( $M \pm m$ )	Средний процент Flt N-позитивных клеток ( $M \pm m$ )
Веретенноклеточные А (n=33)	72,3±6,7	28,6±7,5
Веретенноклеточные В (n=35)	64,1±6,4	27,9±6,4
Эпителиодные (n=30)	51,1±9,9	49,7±12,4*

Примечание: достоверность различий Flt N\*- между веретенноклеточными и эпителиодными УМ  $p=0,05$

Обнаружена корреляционная связь между экспрессией Flt C/Flt N, с одной стороны, и клиническими показателями, с другой стороны. Так, экспрессия Flt обратно коррелировала с объемом опухоли (Таблица 67). По мере увеличения объема УМ снижалась как цитоплазматическая экспрессия Flt C, так и ядерная Flt N ( $p=0,0023$  и  $p=0,00018$ ).

Таблица 67 - Корреляционная связь экспрессии Flt с клиническими и гистологическими показателями УМ

Показатель	Коэфф. корреляции., степень достоверности p			
	Процент Flt+клеток в цитоплазме		Процент Flt+ клеток в ядре	
Стадия УМ	k=0,6272	<0,05	k=0,6881	<0,001
Объем УМ	k=- 0,5245	<0,01	k= - 0,6823	<0,001
Пигментация УМ	k=0,1928	н.д	k=0,3511	<0,05
Локализация УМ	k= - 0,3965	<0,01	k= -0,5451	<0,001
Клеточный тип	k=0,4371	<0,01	k=0,5822	<0,001
Возраст	k= - 0,3871	<0,05	k= - 0,2222	н\д

Высоко достоверная ( $p=0,0116$ ) обратная связь слабой силы выявлена между интенсивностью рецепции Flt C и возрастом пациента. С возрастом снижалась цитоплазматическая экспрессия Flt, ядерная экспрессия практически не менялась (н/д).

Выявлена коррелятивная связь рецептора Flt с *локализацией опухоли*. Так, меланома радужки отличалась присутствием клеток, избирательно экспрессирующих высокие уровни Flt C (градация III, 50,0% клеток) на фоне отсутствия Flt N ( $k= -0,39650$ ,  $p=0,01$ ).

Наряду с этим, слабая связь обнаружена между интенсивностью ядерной экспрессии и процентом Flt N-позитивных клеток с одной стороны и пигментацией УМ, с другой ( $k=0,3511$ ,  $p=0,03$ ).

### ***Резюме***

Таким образом, в УМ экспрессируется рецептор Flt. Описаны закономерности экспрессии этого рецептора ЭК в УМ. Изучена коррелятивная связь с клиническими и морфологическими показателями УМ. Однако роль этого маркера и его потенциальная возможность применения в качестве предиктора нуждается в изучении.

## ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ АНГИОГЕНЕЗА

В настоящей главе мы анализировали корреляционную связь с прогнозом клинического течения УМ молекулярных (VEGF, Flk, Flt) показателей ангиогенеза, которые коррелировали с классическими «рабочими» маркерами выживаемости, общепризнанными в качестве предикторов прогноза выживаемости больных УМ и, по сути, лежащими в основе 8 редакции классификации УМ.

### 5.1 Оценка количественных показателей экспрессии молекулы VEGF опухолевыми клетками и эндотелием опухолевых сосудов в качестве предиктора прогноза метастазирования УМ

Исследования показали, что продуцентами ключевой молекулы ангиогенеза VEGF в УМ являются опухолевые и эндотелиальные клетки. Каждый из этих показателей мы анализировали в качестве потенциальных независимых и самостоятельных маркеров прогноза (предикторов), оценивая их возможности в ближайшем и отдаленном прогнозе. Экспрессию VEGF оценивали двумя показателями: количеством иммунопозитивных клеток и интенсивностью ИГХ-окрашивания клетки (см Главу 2 и Главу 4).

Показатели экспрессии VEGF (интенсивность или количество VEGF<sup>+</sup> ОК в УМ) в «примеряли» в качестве маркеров прогноза клинического течения заболевания, проводя корреляционно-регрессионный анализ кривых выживаемости по Каплан–Мейеру (Рисунок 46). Анализировали 2 маркера:  $\leq 50\%$  VEGF<sup>+</sup> ОК против  $> 50\%$  VEGF<sup>+</sup> ОК (1 маркер, выбран по медиане) и  $\geq 30$  VEGF<sup>+</sup> клеток против  $< 30$  VEGF<sup>+</sup> ОК в УМ.

Таблица 68 – Сводный отчет по цензурированным наблюдениям в подгруппах, распределенных по экспрессии VEGF<sup>+</sup> в ОК УМ

Тип УМ	Всего	Число случаев мтса	Число выживших без мтса	Процент
$> 50$ VEGF <sup>+</sup> клеток	38	12	26	68,5
$\leq 50$ VEGF <sup>+</sup> клеток	60	12	48	80,0
Всего:	98	24	74	75,5

Межгрупповые различия по численности выживших в выделенных подгруппах были не достоверны.

Проанализировали выживаемость цензурированных наблюдений по Каплан-Мейеру. В соответствии с медианой VEGF (маркер 50% VEGF<sup>+</sup> клеток на срезе УМ) все пациенты были

распределены на две группы – А и В. В группу А вошли 60 больных УМ с экспрессией VEGF<sup>+</sup> ≤50% позитивных клеток в поле зрения. Из них 12 человек выбыли по причине меланома-ассоциированной смерти. Сроки наблюдения за этой группой составили в среднем 82,3±6,3 месяца. Группу В составили 38 больных УМ, у которых в опухоли было выявлено > 50% VEGF<sup>+</sup> клеток в поле зрения, причем 12 из них (31,6%) умерли от той же причины при сроках наблюдения в среднем 197,3±15,0 месяцев. Кривые выживаемости демонстрируют более быстрый процесс выбывания в группе В. Заметим, различия в выбывании пациентов начинают проявляться после 60 мес (5 лет) наблюдения). Практически половина пациентов с >50% экспрессии VEGF<sup>+</sup> в ОК, умерли за 10 лет наблюдения, в то время как при VEGF ≤50%, смертность составила только 20%. Вполне очевидно, что до 5 лет наблюдения различия в экспрессии VEGF не сказываются на выбывании больных УМ. Значимые различия в выбывании пациентов начинают проявляться, начиная с 5-летнего наблюдения. В этот срок в группе В (красная линия) больные начинают стремительно выбывать, в то время как в группе А после 12,5 лет процесс смертности от УМ практически прекращается. К 16,5 годам различия становятся достоверными (р<0,05) (Рисунок 46).

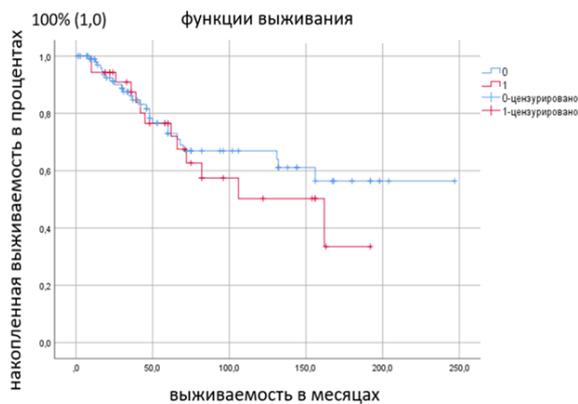


Рисунок 46 – График выживаемости цензурированных наблюдений по Каплан-Мейеру в группе А (≤50% VEGF<sup>+</sup> клеток в УМ, синяя линия) и группе Б (>50% VEGF<sup>+</sup> клеток в УМ, красная линия). По оси X – отложено время в месяцах, а по оси Y — вероятность, или функция выживаемости в процентах.

Распределение пациентов по отрезной точке ≥ 30 VEGF<sup>+</sup> клеток против < 30 VEGF<sup>+</sup> ОК (2 маркер) в УМ не улучшило результат. Достоверных межгрупповых различий также не выявлено.

Распределение выживаемости цензурированных наблюдений по маркеру >30% VEGF<sup>+</sup> ОК в УМ против ≤ 30 VEGF<sup>+</sup> ОК в УМ, продемонстрировало схожие результаты. Однако, межгрупповые различия согласно всем рекомендуемым оценочным тестам сместились с 0,241 (см Таблица 68) до 0,07), поэтому мы перешли к более точному маркеру - ≥ 30 VEGF<sup>+</sup> ОК.

Далее, для анализа глубины и силы сопряженной связи в качестве оценочного (проверочного) теста мы применили **комбинацию 2 неблагоприятных факторов риска**: офтальмогипертензию (1 фактор) и >30% VEGF<sup>+</sup> ОК в УМ (код VEGF\_TP30, 2 фактор риска). Группа больных с офтальмогипертензией использовалась нами как тестовая группа для изучения кумулятивных эффектов и выявления сопряженных связей. Сводный отчет,

представлен в таблице 69. Существенной разницы в выживаемости больных с наличием двух факторов риска против данных подгруппы с их отсутствием не получено (н/д).

Таблица 69 – Сводный отчет по цензурированным наблюдениям в подгруппах УМ, распределенных в зависимости от экспрессии  $\leq 30\%$  VEGF<sup>+</sup> ОК и наличия или отсутствия офтальмогипертензии

Показатель экспрессии	Офтальмогипертензия	Всего	Кол-во мтса	Количество выживших без	
				мтса	Процент
$\leq 30\%$ VEGF <sup>+</sup> ОК	-	43	10	33	76,7
	+	24	10	14	58,3
	n	67	20	47	70,1
$>30\%$ VEGF <sup>+</sup> ОК	-	11	1	10	90,9
	+	8	3	5	52,5
	n	19	4	15	78,9
Все	Все	86	24	62	72,1

С другой стороны, как стратификационная переменная экспрессия  $>30\%$  VEGF<sup>+</sup> ОК в УМ (VEGF\_TP30) оказывала значимое влияние на время дожития в подгруппе больных УМ с наличием уже имеющегося фактора риска – офтальмогипертензии. Это подтверждали оценочные тесты сравнения ( $p < 0,01$ ). Наряду с этим, это подтверждали кривые выживаемости цензурированных наблюдений по Каплан Мейеру, представленные на рисунке 47.

Таблица 70 – Средняя выживаемость и медиана выживаемости (в рангах) больных УМ с экспрессией  $>30\%$  VEGF<sup>+</sup> ОК в УМ и  $\leq 30\%$  VEGF<sup>+</sup> ОК в УМ

Экспрессия VEGF	Офтальмогипертензия	Среднее значение				Медиана			
		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
				Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
$\leq 30\%$ VEGF <sup>+</sup> ОК	-	4,84	0,14	4,56	5,11	5,1	0,55	4,5	5,5
	+	4,00	0,30	3,42	4,59	4,5	0,7	3,5	5,2
$>30\%$ VEGF <sup>+</sup> ОК	-	4,50	0,22	4,07	4,92	4,5	0,5	3,8	5,0
	+	3,26	0,31	2,66	3,87	4,000	0,726	2,577	5,423

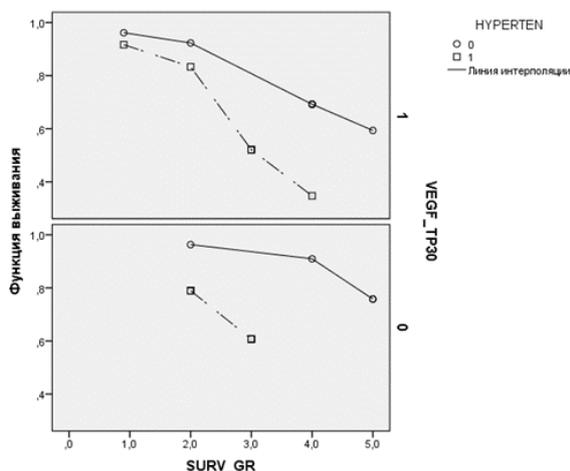


Рисунок 47 – Цензурированная выживаемость при наличии комбинации офтальмогипертензия + экспрессия >30% VEGF+ клеток в УМ. По оси X – отложено время в баллах: 1- до 12 мес включительно, 2 – более 12 до 36 мес включительно, 3 – более 36 до 60 мес включительно, 4 - более 60 до 120 мес включительно, 5 - более 120 мес. По оси Y — функция выживаемости.

Таким образом, статистический анализ выявил достоверный прогностический потенциал у показателя экспрессия >30% VEGF<sup>+</sup> клеток в УМ, который можно использовать в регрессионных моделях заболевания и для создания формулы прогноза.

### Экспрессия VEGF в эндотелиальных клетках опухолевых сосудов

Анализировали 2 характеристики экспрессии молекулы VEGF в эндотелии опухолевых сосудов УМ: **интенсивность ИГХ окрашивания** и **количество ИГХ-окрашенных VEGF<sup>+</sup> эндотелиальных клеток** в сосудистой сети УМ на срезе под ув. микроскопа x 400 (см главу 2).

#### *Интенсивность экспрессии VEGF эндотелиальными клетками сосудов УМ*

Использовали 3 градации интенсивности ИГХ-экспрессии. Распределение пациентов на подгруппы в соответствии с рангами интенсивности ИГХ-окраски представлено в таблице 71

Таблица 71 - Сводный отчет по цензурированным наблюдениям в подгруппах больных УМ, распределенных в зависимости от интенсивности экспрессии VEGF эндотелиальными клетками сосудов

Ранг интенсивности экспрессии	Всего	Число мтса	Число выживших без мтса	Процент
0	58	15	43	74,1
1	4	1	3	75,0
2	9	3	6	66,7
3	15	5	10	66,7
Все	86	24	62	72,1

Межгрупповых различий в выживаемости между подгруппами больных УМ, отличающимися интенсивностью экспрессии VEGF статистически не выявлено. В связи с чем,

на следующем этапе оценивали стратификационные характеристики маркера на проверочном тесте – в комбинации двух неблагоприятных факторов – офтальмогипертензия + гиперэкспрессия VEGF в ЭК. Как видно из данных, представленных в таблице 72, гиперэкспрессия VEGF ЭК в комбинации с офтальмогипертензией оказывала прогностически значимое влияние на выживаемость, ускоряя процесс выбывания цензурированных наблюдений в подгруппе больных с двумя факторами риска против подгруппы больных УМ, в которой экспрессии и офтальмогипертензии не выявлено. Проверочные тесты свидетельствуют с достоверности различий в подгруппах ( $p < 0,01$ ).

Таблица 72 - Сводный отчет по цензурированным наблюдениям в подгруппах больных УМ, распределенных в зависимости от интенсивности ИГХ экспрессии (ранги 0-1-2-3) и наличия (+) или отсутствия (-) офтальмогипертензии

Интенсивность экспрессии	Офтальмогипертензия	Всего	Число мтса	Число выживших без мтса	Процент
0	-	38	8	30	78,9
	+	20	7	13	65,0
	n	58	15	43	74,1
1	-	2	0	2	100,0
	+	2	1	1	50,0
	n	4	1	3	75,0
2	-	5	1	4	80,0
	+	4	2	2	50,0
	n	9	3	6	66,7
3	-	9	2	7	77,8
	+	6	3	3	50,0
	n	15	5	10	66,7
Все	Все	86	24	62	72,1

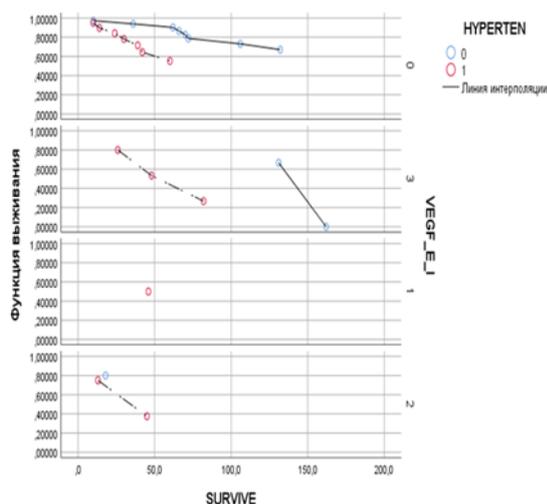


Рисунок 48 - Выживаемость цензурированных наблюдений по Каплан-Мейеру при наличии комбинации офтальмогипертензия + интенсивность экспрессия VEGF+ЭК в УМ. По оси X – отложено время в месяцах, по оси Y — функция выживаемости.

Как стратификационная переменная **маркер «интенсивность экспрессии»** в ЭК оказывала значимое влияние на время дожития в присутствии фактора гипертензия (тест, рисунок 47).

#### *Процент VEGF-позитивных эндотелиальных клеток в УМ*

Анализировали в качестве маркера количественной оценки экспрессии *VEGF* в ЭК:  $\leq 30\%$  VEGF+ ЭК и  $>30\%$  VEGF+ ЭК на срезе УМ. В таблице 73 представлена выживаемость в обеих группах.

Таблица 73 – Сводный отчет по цензурированным наблюдениям в подгруппах больных УМ, распределенных в зависимости от количества VEGF+ ЭК в УМ (группа А  $\leq 30\%$  VEGF+ ЭК против группы В  $>30\%$  VEGF+ ЭК)

Группа	Всего	Число мтса	Процент
$\leq 30\%$ VEGF+ ЭК	72	18	25,0
$>30\%$ VEGF+ ЭК	26	6	23,1
Все	98	24	24,4

Достоверных межгрупповых различий в количестве выживших без метастазов в подгруппах больных, различающихся по экспрессии  $\leq 30\%$  VEGF+ ЭК против  $>30\%$  VEGF+ ЭК не выявлено (см выше).

Мы проанализировали показатели цензурированной выживаемости больных обеих групп по Каплан-Мейеру (Рисунок 49). В соответствии с отрезной точкой (30%), пациенты были распределены на 2 группы – А и В. В группу А вошли 72 человека с  $\leq 30\%$  VEGF+ ЭК в сосудах УМ, среднее время наблюдения за ними составило  $104,0 \pm 6,0$  месяцев. 18 из них выбыли по причине смерти от метастатического процесса УМ. Группу В составили 26 человек с

экспрессией VEGF более 30% ЭК сосудов УМ. Из них 6 умерло от генерализации при средних сроках наблюдения  $193,5 \pm 25,0$  месяца. Межгрупповые различия в распределение выживаемости пациентов, несмотря на низкую отрезную точку (30%) отсутствовали. Анализ 5-летней выживаемости по Каплан–Мейеру в подгруппах с разными количественными показателями экспрессии VEGF в ЭК внутриопухолевых сосудов не показал значимых различий

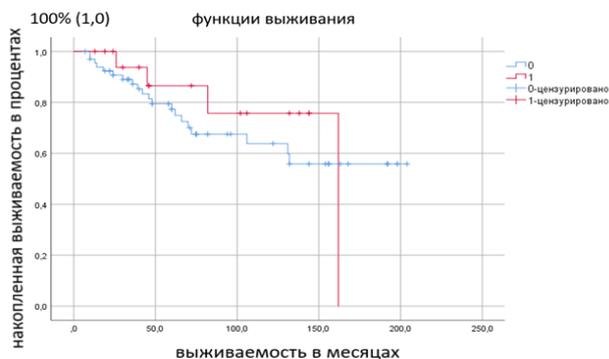


Рисунок 49 – График выживаемости по Каплан-Мейеру в группе А  $\geq 30\%$  VEGF+ЭК в УМ, синяя линия) и группе Б ( $< 30\%$  VEGF+ЭК в УМ, красная линия). По оси X – отложено время в месяцах, по оси Y — функция выживаемости.

Далее мы проверили потенциал маркера  $\geq 30\%$  VEGF+ЭК в комбинации с офтальмогипертензией. Статистический анализ выявил высоко достоверные различия в среднегрупповой выживаемости в группах, отягощенных офтальмогипертензией и экспрессией в УМ (таблица 74).

Таблица 74 - Средние значения и медианы для времени выживания в подгруппе А с отсутствием офтальмогипертензии (-) и экспрессией  $\leq 30\%$  VEGF+ ЭК (-) против группы В с  $> 30\%$  VEGF+ЭК (+) и офтальмогипертензией (+)

Маркер	Офтальмогипертензия	Среднее <sup>a</sup>				Медиана			
		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
				Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
$\leq 30\%$ VEGF+ЭК	-	158,8	11,9	135,5	182,1	160,6	35,5	120,4	190,6
	+	111,6	18,3	75,7	147,6	60,0	40,6	80,8	160,0
$> 30\%$ VEGF+ЭК	-	162,0	10,0	152,0	182,0	170,0	35,5	150,2	190,0
	+	88,9	20,7	48,3	129,5	82,0	28,0	27,1	136,9

Из таблицы 74 видно, что средние сроки выживаемости в группе А с двумя переменными (отсутствием офтальмогипертензии и  $\leq 30\%$  VEGF+ ЭК в УМ) составляют 158,8 мес против 88,9 мес в группе с  $> 30\%$  VEGF+ЭК и наличием офтальмогипертензии (см рисунок 49 и таблицу 74).

Цензурированная выживаемость демонстрирует, что пациенты в группе А в сроки 82 месяца наблюдения перестали выбывать, их кумулятивная выживаемость составила 41,7%, в то время как выживаемость больных УМ группы В составила 62,5%.

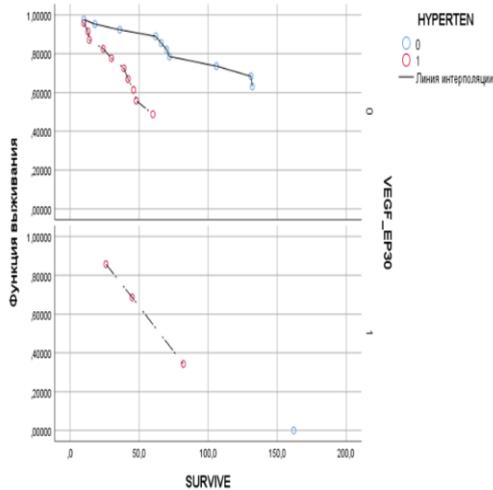


Рисунок 50 - Выживаемость цензурированных наблюдений по Каплан-Мейеру при наличии комбинации офтальмогипертензия + >30% VEGF+ЭК в УМ (линия с красными кружками) и отсутствии офтальмогипертензии и ≤30% VEGF+ЭК в УМ (линия с синими кружками). По оси – отложено время в месяцах, по оси Y—функция выживаемости.

Таким образом, маркер >30% VEGF+ЭК потенциально пригоден для формирования регрессионной модели заболевания и формулы расчета отдаленного (более 5 лет) прогноза УМ.

## 5.2 Оценка количественных показателей экспрессии рецептора молекулы VEGF - Flt в качестве предиктора прогноза метастазирования УМ.

### Экспрессия Flt в цитоплазме

В качестве предиктора прогноза анализировали количественные показатели экспрессии Flt в цитоплазме (код Flt\_C+ ). Маркером служила отрезная точка ≤50% Flt\_C+ и >50% Flt\_C+ клеток на срезе УМ. В таблице представлено распределение частоты развития метастазов в зависимости от принадлежности к группе >50% Flt\_C+ или ≤50% Flt\_C+ (таблица 75).

Таблица 75– Сводный отчет по цензурированным наблюдениям в подгруппах больных УМ, распределенных в зависимости от экспрессии рецептора Flt\_C+ в цитоплазме УМ

Уровень экспрессии	Всего	Число выживших без	
		мтса	Процент
≤50% Flt_C+	28	21	75,0
>50% Flt_C+	57	40	71,2
Все	85	61	71,8

В анализ вошло 85 цензурированных наблюдений, у 28 (33%) из них процент иммунопозитивных клеток с цитоплазматической экспрессией был ниже или равен 50%, а у 57 пациентов (67%) этот показатель был выше 50%. Метастазы развивались в обеих группах примерно с одинаковой частотой. Выживаемость была примерно равнозначной. Статистических различий между группами не выявлено.

Таблица 76 - Средние значения и медианы выживания в зависимости от экспрессии рецептора Flt\_C+ в цитоплазме УМ

Экспрессия	Среднее <sup>a</sup>				Медиана			
	Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
≤50% Flt_C+	151,23	15,01	121,82	180,65	140,5	25,6	125,0	190,0.
>50% Flt_C+	139,59	11,90	116,27	162,91	162,00	33,12	97,08	226,92

В первой группе время дожития составило 151 месяц (95% ДИ 122; 181), во втором случае -140 месяцев (95%ДИ 116; 163) (табл 76 ). Распределение выживаемости в группах, различающихся процентом экспрессии Flt\_C+ клеток в цитоплазме УМ (≤50% Flt\_C+ против >50% Flt\_C+) статистически значимо не отличалось ни по одному из трех критериев (см выше).

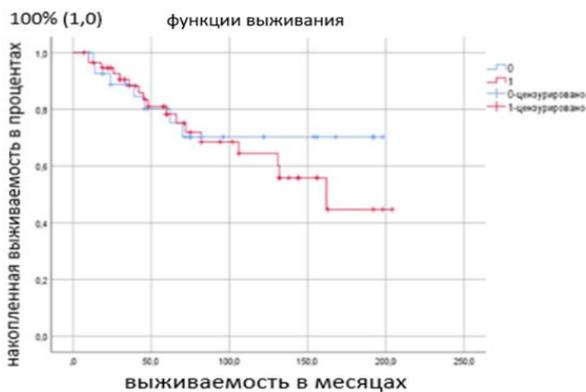


Рисунок 51 – График выживаемости по Каплан-Мейеру цензурированных наблюдений среди пациентов с (≤50% Flt\_C+ (синяя линия) и больных >50% Flt\_C+ (красная линия). По оси X–отложено время в месяцах, по оси Y— функция выживаемости.

Кривые выживаемости, представленные на рисунке 51, очень близки в сроки наблюдения до 100 мес.(≈ 8,5 лет) в обеих группах. Заметим, 8,5 лет - это время дожития 70% пациентов в обеих группах. Затем в 1 группе (с экспрессией ≤50% Flt\_C+, синяя линия) процесс выбывания по причине меланома-ассоциированной смертности прекращается до конца срока наблюдения (16,5 лет), функции выживания не меняются, то есть, эти же 70% пациентов доживают до конца срока наблюдения. В то время, как во 2 группе (экспрессия >50% Flt\_C+ , красная линия) до этого времени доживают только 45% пациентов. В эти сроки

достоверность различий достигает  $p=0,02934$ . Таким образом, процент  $>50\%$  Flt\_C+ клеток с цитоплазматической экспрессией можно рассматривать, как фактор, влияющий на выживаемость в отдаленном периоде.

Мы также проверили показатель  $>50\%$  Flt\_C+ на кумулятивный эффект.

Было установлено, что этот молекулярный маркер ангиогенеза особенно отчетливо проявляется на фоне других (клинических) факторов риска плохого витального исхода. Например, как стратификационная переменная процент иммунопозитивных клеток с цитоплазматической экспрессией оказывает значимое влияние на время дожития в группе больных УМ с клиническим фактором «офтальмогипертензия» («+» в таблице 77). Значимость всех трех критериев представлена ( $p<0,05$ ).

Таблица 77 – Сводный отчет по цензурированным наблюдениям в подгруппах больных УМ, распределенных в зависимости от наличия офтальмогипертензии (+) и экспрессии  $>50\%$  Flt\_C+клеток в УМ (+) и без этих факторов (-/-)

Показатель экспрессии	Офтальмогипертензия	Всего	Число мтса	Число выживших без мтса	Процент
$\leq 50\%$ Flt_C+	-	16	2	14	87,5
	+	12	5	7	58,3
	N	28	7	21	75,0
$>50\%$ Flt_C+	-	38	9	29	76,3
	+	19	8	11	57,9
	N	57	17	40	70,2
Всего		85	24	61	71,8

Мы провели анализ выживаемости в группах с комбинацией указанных двух факторов риска (1 группа, красная линия) и без этих рисков (2 группа, синяя линия) (Рисунок 52). Функции выживания двух групп в этом случае начинают расходиться не через 100 мес., а через 30 и только 37% пациентов первой группы переживает рубеж в 100 мес.(8,5 лет).

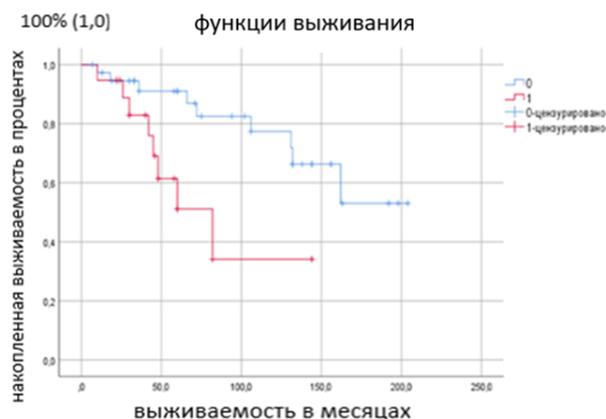


Рисунок 52 – График выживаемости по Каплан–Мейеру в группах с офтальмогипертензией и  $>50\%$  Flt C позитивных клеток в УМ (2 фактора риска, красная линия) и без офтальмогипертензии и с  $\leq 50\%$  Flt C позитивных клеток в УМ (факторы риска отсутствуют, синяя линия). По оси X – отложено время в месяцах, по оси Y – функция выживаемости.

Таким образом, процент иммунопозитивных клеток с цитоплазматической экспрессией можно рассматривать, как фактор, сильно влияющий в выживаемости. Показатель экспрессии  $>50\%$  Flt C позитивных клеток в УМ вполне может быть предиктором отдаленного прогноза при УМ.

#### *Ядерная экспрессия Flt*

Отрезной точкой рецептора Flt<sub>N</sub><sup>+</sup> стал показатель  $> 50\%$  иммунопозитивных клеток с ядерной экспрессией (+) против  $\leq 50\%$  Flt<sub>N</sub><sup>+</sup> клеток на срезе УМ при ув 400. В анализ вошел 71 цензурированный пациент, из них группу А составили 50 пациентов с экспрессией  $\leq 50\%$  Flt<sub>N</sub><sup>+</sup> в УМ, у которых в 13 случаях развились метастазы в разные сроки наблюдения. Группу Б составили 21 больной УМ с экспрессией  $>50\%$  Flt<sub>N</sub><sup>+</sup>, из них в 6 случаях развились метастазы. Статистических различий по числу выживших в подгруппах не выявлено (Таблица 78, н/д)

Таблица 78 - Сводный отчет по цензурированным наблюдениям в подгруппах больных УМ, распределенных в зависимости от ядерной экспрессии Flt<sub>N</sub><sup>+</sup>

Группа	Всего	Число выживших без мтса	Процент
$\leq 50\%$ Flt <sub>N</sub> <sup>+</sup>	50	13	26,0
$>50\%$ Flt <sub>N</sub> <sup>+</sup>	21	6	28,5
Всего:	71	19	28,2

При этом достоверны различия в средних сроках дожития и медианах в группах сравнения: 122 мес против 149 мес. (Таблица 79,  $p < 0.001$ ).

Таблица 79 - Средние значения и медианы выживания среди больных УМ, различающихся ядерной экспрессией Flt\_N+

Показатель экспрессии	Среднее <sup>a</sup>				Медиана			
	Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
>50% Flt_N+	121,85	9,93	102,39	141,31	132,00	15,6	110,4	155,5
≤50% Flt_N+	148,88	17,01	115,54	182,22	165,5	35,5	120,5	190,0

Выполнен анализ кривых выживаемости среди цензурированных наблюдений по Каплан-Мейеру в обеих группах (Рисунок 53).

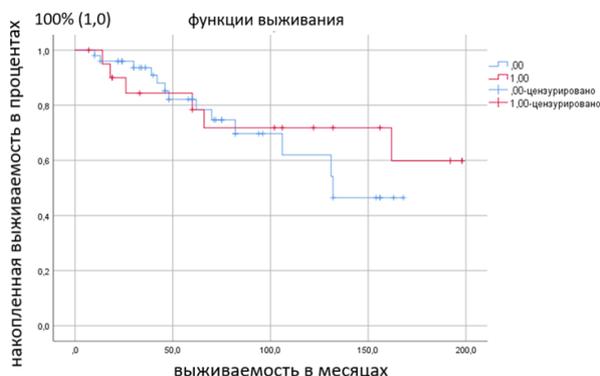


Рисунок 53 – Кривые выживаемости по Каплан-Мейеру среди цензурированных пациентов с (≤50% Flt\_N+ (красная линия) и больных >50% Flt\_N+ (синяя линия). По оси X– отложено время в месяцах, по оси Y— функция выживаемости.

Продемонстрирована тесная прямая связь между ядерной экспрессией рецептора Flt N, с одной стороны, и выживаемостью больных УМ, с другой. В соответствии с отрезной точкой (для ядерной Flt - 50%) все пациенты с УМ были распределены на две группы: А и В. В группу А вошли 50 человек с ядерной рецепцией Flt в УМ ≤50%, а в группу В – 21 пациент с рецепцией >50%. При средних сроках наблюдения 120 месяцев в группе А выбыло 26 %. При средней продолжительности наблюдения 152,8±20,4 месяца в группе В умерли от метастатического процесса 7 (28%) больных. Графические кривые 5-летней выживаемости не показывают различия в функции выживания, Кривые 10 летней выживаемости по Каплан-Мейеру наглядно демонстрируют незначимые межгрупповые различия: выбывание больных в группе В по причине меланомаспецифической смертности, шло медленнее, чем в группе А, где ядерная экспрессия Flt в ядре была ниже (≤50%) (Рисунок 52).

Выявлена слабая отрицательная связь между экспрессией Flt и выживаемостью больных с УМ. Продолжительность жизни этих пациентов обратно коррелировала с процентом позитивных клеток, экспрессирующих рецептор в ядре Flt N- (коэфф. корреляции k=-0,33510,

$p=0,0027$ ) и с интенсивностью цитоплазматического окрашивания УМ (Flt C,  $k=-0,17989$ ,  $p=0,0843$ ).

### 5.3 Оценка количественных показателей экспрессии рецептора молекулы VEGF – VEGFR-2/Flk-KDR-1 в качестве предиктора клинического прогноза при УМ

Рецептор VEGFR-2/Flk-KDR-1 - вторая важная сигнальная молекула ангиогенеза, без которой биологические эффекты проангиогенной молекулы VEGF невозможны. Ее потенциал в качестве предиктора прогноза метастазирования УМ, мы проанализировали несколькими статистическими методами.

Медиана Flk+клеток на срезах УМ составила  $11\pm 2,4\%$ , но поскольку на практике не принято устанавливать отрезные значения ниже границы 1 квинтили, отрезная точка для Flk была определена в 20%. Пациенты с УМ были распределены на 2 группы: группу А составили 81 пациент с процентом Flk-позитивных клеток в опухоли  $\leq 20\%$ , из них 22 человека выбыло по причине смерти от метастатического процесса; в группу В вошли 14 человек с процентом Flk-позитивных клеток более 20% клеток в опухоли. Продолжительность наблюдения за группой В составляла  $69,3\pm 3,7$  месяца, а за группой А –  $175,0\pm 14,0$  месяцев. Несмотря на статически достоверную разницу в показателях средней выживаемости, связь с прогнозом была всего лишь на уровне сильной тенденции ( $p=0,17$ ) к ухудшению выживаемости для больных с  $>20\%$  Flk-позитивных клеток в УМ. В связи с чем, мы ввели новую переменную с отрезной точкой на  $>50\%$  иммунопозитивных клеток в УМ (FLK\_P $>50\%$ ) и (FLK\_P50=0)  $\leq 50\%$

Таблица 80 – Сводный отчет по цензурированным наблюдениям в подгруппах больных, распределенных в зависимости от экспрессии  $>50\%$  Flk+ и  $\leq 50\%$  Flk клеток в УМ.

Экспрессия Flk_P50	Всего	Число мтса	Число выживших без мтса	Процент
Flk_P $\leq 50\%$	75	22	53	70,7
Flk_P $>50\%$	11	2	9	81,8
Все	86	24	62	72,1

Группа из 86 пациентов УМ распределилась заново на 2 подгруппы: у 75 (87% случаев) процент Flk + клеток УМ был  $\leq 50\%$ , у 11 пациентов (13%) процент Flk+ клеток в УМ был  $> 50\%$ . В обеих группах развивались метастазы. Межгрупповые различия в выживаемости оказались статистически не достоверны (таблица 81).

Однако в первой группе время дожития составило 138,9 месяцев (95% ДИ 120; 158), во второй группе -165 месяцев (95% ДИ 117; 212) (табл 81). Средне-групповые показатели

дожития во 2 группе с  $\leq 50\%$  Flk+ экспрессией клеток в УМ достоверно превышали аналогичные показатели 1 группы с  $\leq 50\%$  Flk+ экспрессией клеток в УМ ( $p < 0,001$ ).

Таблица 81 - Средние значения и медианы срока выживания в зависимости от экспрессии  $\leq 50\%$  или  $> 50\%$  Flk+ клеток в УМ

Экспрессия Flk_P50	Среднее <sup>a</sup>				Медиана			
	Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
$> 50\%$ Flk+	139,0	9,9	119,6	158,4	140,0	13,5	120,0	155,5.
$\leq 50\%$ Flk+	164,5	24,0	117,4	211,6	182,0.	18,5	120,2	220,2

Далее мы выполнили анализ кривых выживаемости среди цензурированных наблюдений по Каплан-Мейеру (Рисунок 54). Распределение выживаемости по фактору процента Flk+ клеток в ранние сроки (до 6 лет) статистически не отличалось в подгруппах ни по одному из трех критериев (н./д).

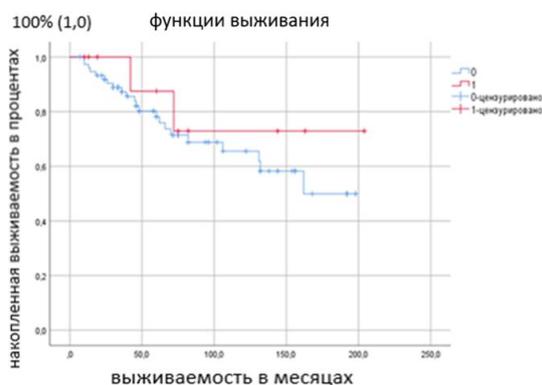


Рисунок 54 – Кривые выживаемости по Каплан-Мейеру среди цензурированных пациентов с  $\leq 50\%$  Flk+ (красная линия) клетками в УМ и  $> 50\%$  Flk+ (синяя линия) клетками в УМ. По оси X – отложено время в месяцах, по оси Y – функция выживаемости.

Кривые выживаемости по Каплан-Мейеру в обеих группах до 70 мес. ( $\approx 6$  лет) были относительно близки. Заметим, 60 мес - это время дожития 70% пациентов в обеих группах. Затем до конца срока наблюдения (16,5 лет) в 1 группе ( $< 50\%$  Flk+ в УМ) процент выживших сокращается до 50%, а во 2 группе ( $\leq 50\%$  Flk+ в УМ) функция выживания не меняется, и эти же 70% пациентов доживают до конца срока наблюдения. Таким образом, процент экспрессии Flk+ клеток в УМ также можно рассматривать, как фактор, влияющий в отдаленном периоде наблюдения на выживаемость.

Мы проверили нашу гипотезу в проверочном тесте с кумулятивным эффектом в комбинации с офтальмогипертензией. Как стратификационная переменная процент Flk+ клеток в УМ оказывал значимое влияние на сроки дожития больного при факторе гипертензия – значимость всех трех критериев (см Таблица 82 и 83,  $p < 0,05$ ).

Таблица 82 - Сводный отчет по цензурированным наблюдениям в подгруппах больных УМ, распределенных в зависимости от наличия офтальмогипертензии (+) и экспрессии >50% Flt\_C+клеток в УМ (+) и без этих факторов (-/-)

Экспрессия Flk	Офтальмогипертензия	Всего	Число выживших без метастазов	Процент
≤50% Flk+	-	48	38	79,2
	+	27	15	55,6
	N	75	53	70,7
>50% Flk+	-	6	5	83,3
	+	5	4	80,0
	N	11	9	81,8
Всего:		86	62	72,1

Таблица 83 - Средние значения и медиана срока выживания в группах с офтальмогипертензией и гиперэкспрессией Flk в УМ (+/+) и без них (-/-)

Экспрессия Flk	Офтальмогипертензия	Среднее <sup>a</sup>				Медиана			
		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ	
				Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
≤50% Flk+	-	158,4	10,5	137,9	178,8	165,5	15,6	122,0	180,0
	+	97,7	18,7	60,9	134,0	60,0	20,3	20,2	99,8
>50% Flk+	-	160,0	35,9	89,6	230,4	190,8	45,5	99,0	230,0
	+	118,5	22,1	75,2	161,8	135,5	43,5	80,0	180,0

При ≤ 50% Flk+ клеток в УМ стратификационная переменная практически не влияет на функции выживания независимо от присутствия офтальмогипертензии или без нее (Рисунок 54). При >50% Flk иммунопозитивных клеток в УМ стратификационная переменная значительно “улучшает” картину – возраст дожития более 70% пациентов с одной офтальмогипертензией составляет более 12 лет (голубая линия).

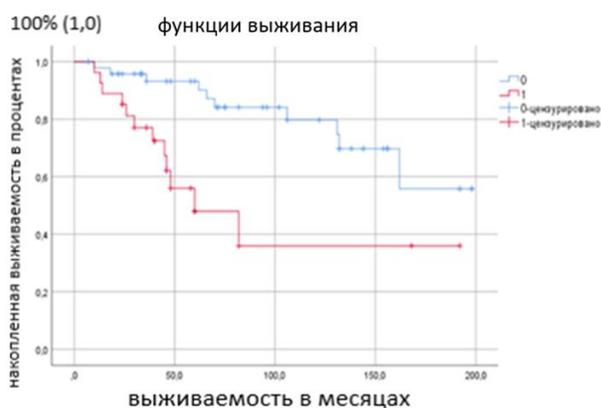


Рисунок 55- График выживаемости по Каплан-Мейеру среди пациентов с комбинацией из двух неблагоприятных факторов – офтальмогипертензией и >50% Flk+ (красная линия) клеток в УМ. и только офтальмогипертензией и с ≤50% Flk+ (синяя линия) клеток в УМ. По оси X– отложено время в месяцах, по оси Y— функция выживаемости.

Таким образом, детальный статистический анализ подтвердил отягощающий метастатический потенциал экспрессии >50% Flk+клеток в УМ и возможность использования в регрессионной модели заболевания и в качестве предиктора прогноза для создания формулы расчета .

Таким образом, полученные результаты позволяют считать, что УМ различаются по молекулярным характеристикам ангиогенеза. Эти различия могут обуславливать особенности их биологического поведения: агрессивность, скорость пролиферации, сроки и вероятность метастазирования. Раскрываются возможности прогнозирования на основе молекулярных маркеров ангиогенеза.

#### **5.4 Корреляционная оценка достоверности маркеров в ближайшем и отдаленном прогнозе**

Создание регрессионных моделей заболевания требует детального статистического корреляционного анализа с просчетом силы связи с анализируемым событием (для нас это отдаленный прогноз более 10 лет) и ее достоверности (табл .84). Благодаря такому анализу мы установили, что остается немного факторов, сопряженных с отдаленным прогнозом. Среди уже известных клинико-морфологических факторов риска нами была установлена достоверная связь с отдаленным прогнозом ИГХ-маркеров ангиогенеза.

Таблица 84– Коэффициенты корреляции с прогнозом различных маркеров ангиогенеза

Маркер	Коэфф. корреляции с прогнозом, достоверность p			
	Выживаемость ≤ 12 мес	Выживаемость ≤ 36 мес	Выживаемость ≤ 5 лет	Выживаемость ≤ 10 лет
MVD	-0,038, н/д	0,199, p=0,1	0,098, н/д	0,204, н/д
CD34	0,06, н/д	-0,045, н/д	0,098, н/д	0,199, н/д
CD31	-0,274, p=0,035	0,132, н/д	0,036, н/д	0,078, н/д
≥ 50% VEGF+ ОК	-0,180, p=0,01	-0,243, p=0,005	-0,406, p<0,001	-0,244, p<0,001
Гиперэкспрессия VEGF+ ОК	-0,183, p=0,009	-0,232, p=0,001	-0,417, p=0,001	-0,245, p=0,001
>30% VEGF+ ЭК	-0,206, p<0,01	-0,145, p<0,05	-0,390, p=0,001	-0,278, p=0,01
≥ 50% клеток Flt C+	-0,181, p=0,01	-0,258, p=0,001	-0,387, p=0,001	-0,264, p=0,001
Гиперэкспрессии Flt C	-0,192, p=0,007	-0,252, p=0,01	-0,382, p=0,001	-0,243, p=0,01
≥ 50% клеток Flt N+	-0,174, p=0,014	-0,264, p=0,01	-0,368, p=0,001	-0,236, p=0,001
Гиперэкспрессия Flt N	-0,180, p=0,011	-0,251, p=0,05	-0,361, p=0,001	-0,225, p=0,001
≥ 50% Flk + клеток	-0,180, p=0,01	-0,148, p=0,04	-0,424, p=0,000	-0,293, p=0,000
3+ и 2+ экспрессия Flk	0,341, p=0,001	0,231, p=0,026	0,177, p=0,089	0,148, p=0,09

На следующем этапе мы планировали разработать регрессионные модели заболевания – увеальной меланомы и формулы расчета ближайшего и отдаленного прогноза.

#### **5.4 Оценка возможностей мультиплексной проточной цитометрии с определением количественных показателей молекул ангиогенеза в стекловидной жидкости как альтернатива ИГХ-метода**

Высокоангиогенный фенотип УМ, широкий спектр задействованных механизмов в построении собственной сосудистой сети, включая рекрутинг и сосудистую мимикрию, исключительно гематогенный путь метастазирования заставили нас провести поиск альтернативных технологий, менее затратных по времени, не уступающих по информативности ИГХ-анализу, с подходом к будущим фармацевтическим стратегиям. В этом аспекте мы обратили внимание на метод мультиплексной проточной цитометрии (BD, США). С этой целью мы провели жидкостную биопсию УМ со скринингом ангиогенных молекул в стекловидном теле, окружающем внутриглазную опухоль. Известно, что стекловидная жидкость (СТЖ) – один из ценных информативных объектов для изучения опухолевого ангиогенеза [26].

В образцах СТЖ пораженного глаза 9 больных УМ определяли концентрацию 8 ключевых цитокинов и ростовых факторов, потенциально участвующих в опухолевом ангиогенезе: IL-8, angiogenin, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , VEGF, bFGF, TGF $\beta$ .

Глаза были энуклеированы по причине невозможности выполнения органосохраняющего лечения. Ни один из глаз с УМ не лечился до энуклеации. Диагноз верифицировали в соответствие с Федеральными рекомендациями 2020г и AJCC (8th Edition, 2017) [11].

В связи с отсутствием нормы, группой сопоставления служили глаза с сенильной катарактой (n=38).

Было установлено, что по сравнению с сенильной катарактой, в СТЖ глаз с УМ достоверно чаще и на более высоком уровне выявлялись проангиогенные цитокины TNF $\alpha$  (80% 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,  $p < 0,05$ , Таблица 83; Рисунок 56), ИЛ-8 (100% против 75%,  $p < 0,01$ ;  $323,2 \pm 227,9$  пг/мл против  $8,5 \pm 1,5$  пг/мл,  $p < 0,001$ ; Рисунок 57), ангиогенин ( $11704,9 \pm 1767,7$  пг/мл против  $2820,2 \pm 1404,9$  пг/мл,  $p < 0,01$ ; Рисунок 58), VEGF (100% против 68,2%;  $p < 0,05$ ;  $471,5 \pm 154,6$  пг/мл против  $18,4 \pm 3,2$  пг/мл,  $p < 0,001$ , Рисунок 59) и FGFb (60% против 26,7% ,  $p < 0,05$ ;  $M_{cp}$ :  $44,6 \pm 16,2$  против  $2,7 \pm 1,0$ ,  $p < 0,001$ , Таблица 85). В обеих группах больных в СТЖ не выявляли антиангиогенный фактор TGF $\beta$ , однако ИФН $\gamma$  был обнаружен в пяти из девяти проб на уровне  $14,9 \pm 12,2$  пг/мл, а уровни ИФН $\alpha$  были в 4 раза выше:  $17,6 \pm 3,9$  пг/мл против  $4,4 \pm 0,4$  пг/мл ( $p < 0,05$ ) (Таблица 85).

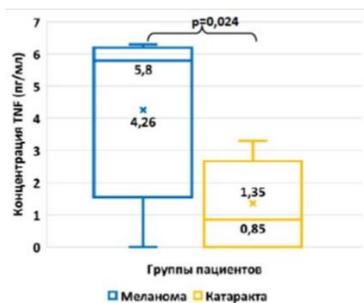


Рисунок 56. Диаграмма сравнения концентраций TNF при УМ и катаракте.

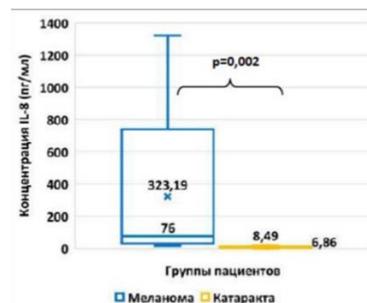


Рисунок 57. Диаграмма сравнения концентраций IL-8 при УМ и катаракте.



Рисунок 58. Диаграмма сравнения концентраций ангиогенина при УМ и катаракте.

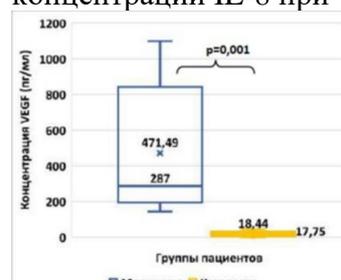


Рисунок 59. Диаграмма сравнения концентраций VEGF при УМ и катаракте.

Таблица 85-- Концентрация факторов роста в стекловидной жидкости при увеальной меланоме

Показатели	Концентрация , пг/мл								
		TNF	IFNa	ИЛ-8	Ангиогенин	VEGF	FGFb	IFN-γ	TGFb
Увеальная меланома (n=9)	Средние M±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.откло- нение (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=2 5,2]	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	15,44-1321,6	8147,3-18824,5	143,3-1098,8	0,0-78,8	0,0-25,1	-
	Частота выявления	80%	83%	100%	100%	100%	60%	60%	0,0%
Катаракта (n=38)	Средние M±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.откло- нение (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=5,44; Q3=30,2]	9,3 [Q1=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 группы 2  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ;

# - достоверность различий от группы 3  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ .

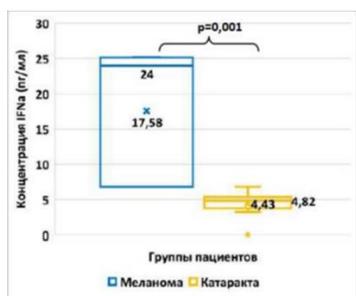


Рисунок 60. Диаграмма сравнения концентраций IFNα при УМ и катаракте.

Исследование показало, что по сравнению с группой сопоставления (сенильная катаракта), в СТЖ глаз с УМ присутствуют высокие концентрации медиаторов ангиогенеза с плюрипотентными свойствами. Многократное повышение таких цитокинов как ИЛ-8 ( $\approx x$  в 35 раз) и FGFb ( $\approx$  в 20 раз) позволяло думать, о том, что в канцерогенезе УМ играет важную роль воспаление, выполняя роль драйверов. В высоких концентрациях эти цитокины оказывают провоспалительный эффект [26]. Однако эта гипотеза нуждается в дополнительном исследовании

В целом, мы пришли к заключению, что метод мультиплексной проточной цитометрии как метод количественного определения одновременно нескольких молекул в небольшом объекте (50 мкл СТЖ) является хорошим и информативным инструментом для диагностики и создания модели опухолевого взаимодействия с микроокружением. В будущем это может стать подспорьем при выработке стратегии лечения метастазирующих форм и выборе иммунотерапии.

### *Резюме*

Мультиплексная проточная цитометрия может стать ценным и высоко информативным инструментом для изучения молекулярных фенотипов УМ, при разработке и выборе молекулярных мишеней антиангиогенной, иммунной или иной таргетной терапии. Повышенные уровни проангиогенных факторов роста (ИЛ-8, ангиогенина, TNF $\alpha$ , VEGF и bFGF) в стекловидной жидкости при УМ свидетельствуют о присутствии одновременно 3х механизмов регуляции ангиогенеза, два из которых не зависят от VEGF, действуют самостоятельно и независимо, и могут проявлять синергизм с классическим VEGF-зависимым механизмом ангиогенеза.

Недостаточно высокие уровни интерферонов (ИФН $\gamma$  и ИФН $\alpha$ ) на фоне отсутствия TGF $\beta$  в СТЖ позволяют думать о том, что подавлена секреция и контроль регуляции природных ангиостатических механизмов прерывания ангиогенеза на глазах с УМ.

Высокие уровни цитокинов с плюрипотентными (проангиогенными, пролиферативными и провоспалительными) свойствами свидетельствуют о том, что при УМ воспаление может играть роль промотера ангиогенеза. И этот феномен нуждается в учете стратегии лечения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ежегодно УМ диагностируют примерно у 7000 человек на земном шаре [219]. Анализ тенденций показателей заболеваемости по данным 20 когортных исследований и баз данных канцер-регистров свидетельствует о неуклонной тенденции к росту заболеваемости УМ практически во всех регионах мира [209, 217]. В США заболеваемость УМ составила 5,1 на миллион [58, 57, 143], в Европе показатели колеблются от 1,3 до 8,6 случаев на миллион в год (у мужчин 6,58, 95% ДИ: 5,42–7,75, у женщин 5,44, 95% ДИ: 4,40–6,48) [207, 218]. Таким образом, крупнейший американский онкологический регистр SEER [229] и Европейский онкологический регистр EUROCORE [247] подтвердили рост заболеваемости УМ. По данным тех же источников не снижается не только уровень заболеваемости, но и показатели выживаемости больных УМ. Уvealная меланома эффективно контролируется на местном уровне, однако, с переходом на метастатическую стадию прогноз заболевания становится фатальным с короткой выживаемостью от 4 до 8 месяцев [3, 9, 10, 14, 18, 20, 27, 30]. В отличие от других видов злокачественных опухолей, лечение метастазов УМ не достигло существенного прогресса и остается актуальной проблемой, нуждающейся в разработке.

Неблагоприятными факторами, ведущими к раннему метастазированию при УМ согласно выводам AJCC (8 редакция) признаны: поздние стадии заболевания, большие размеры (диаметр основания и толщина) опухоли, эпителиоидноклеточный тип строения, признаки инвазивного роста, высокая митотическая активность и возраст пациентов (60+ лет). Однако эти традиционные клиничко-морфологические особенности, ассоциированные с плохой выживаемостью в первые 5 лет после энуклеации, не играют роли в поздние сроки наблюдения. Эксперты объясняют это тем, что после выбывания пациентов с УМ, обладающими характеристиками, ассоциированными со смертностью в ранние сроки после энуклеации, остается однородная группа, в которой вероятность выживания определяется уже другими факторами, например, такими, как пол и статус хромосом (гипотеза «смещения факторов»).

К настоящему времени из-за слабой доказательной базы и отсутствия долгосрочных наблюдений генетические маркеры еще не нашли своего широкого применения. Кроме того, эксперты не исключают вероятности продолжения генетических нарушений с течением времени... По сути, также, как и в случае клиничко-морфологических предикторов, возможна смена генетических маркеров в ближайшем и отдаленном прогнозе. Так, прирост 8q (маркер с самым высоким HR), показал достоверную независимую связь с плохой 5-летней выживаемостью при УМ. Однако по истечении этого срока выжившие пациенты чаще демонстрируют дисомию 3 (67%) по сравнению с общей когортой (47%); дисомия 3 ассоциируется с выживаемостью при УМ (профиль экспрессии гена класса 1 с

гиперэкспрессией мутации PRAME или SF3B1) [204, 205, 207]. В исследовании, вошедшем в «Атлас генома рака», нарушения SF3B1 сочетались с усилением 8Q мутации в дисомии 3 [208]. С другой стороны, в многомерном регрессионном анализе статус хромосомы 3 был независимо связан с прогнозом на протяжении всего срока наблюдения, включая отдаленный. Заметим, при этом, многие генетические маркеры, например, та же моносомия 3, тесно коррелировали с морфологическими характеристиками опухоли [76]. Таким образом, если ближайший прогноз возможен на основе известных общепризнанных предикторов, нашедших отражение в последних классификациях AJCC (2017г) и гистологической классификации ВОЗ (4-е издание, 2018 г), то отдаленный прогноз весьма проблематичен.

Между тем, прогнозирование исходов заболевания – важная составляющая работы офтальмоонколога. По результатам опроса, проведенных T. Veran, S. Cook, 97% пациентов с УМ хотели бы знать о риске развития у них метастазов даже в отсутствие возможности профилактики или технологий улучшения витального прогноза [56, 71]. Степень персонализированного риска определяет настороженность больного УМ и мотивирует его на частые визиты не только к окулисту, но и общему онкологу для скрининга дистантных метастазов. В совокупности это обеспечивает раннюю диагностику метастазов и своевременное проведение хирургического лечения одиночного метастаза в печени, лучевой и/или таргетной терапии множественных метастазов.

Свои исследования мы посвятили проверке известной научной гипотезы, согласно которой рост и метастазирование любой злокачественной опухоли зависит от ее сосудистой сети [6, 7, 18, 97-101]. Доказано, что УМ с высоким ангиогенным фенотипом метастазируют быстрее УМ с низким ангиогенным фенотипом [18]. В этом аспекте УМ скорее, «эталон закономерности», чем исключение из правил [6]. В сосудистой оболочке, из меланоцитов которой развивается УМ, нет базальной мембраны, поэтому УМ находится в тесном прямом контакте с кровеносными сосудами, что открывает широкий путь как к гематогенному метастазированию, так и быстрому построению собственной сети сосудов [113]. Это объясняет не снижающийся интерес к изучению ангиогенеза УМ [63].

**Целью нашей работы** стала разработка прогнозирования клинического течения УМ на основе иммуногистохимических маркеров ангиогенеза.

Цель достигали, решая следующие задачи:

1. Провести ретроспективный анализ клинико-морфологических факторов риска развития метастазов УМ с оценкой их достоверности и надежности как предикторов ближайшего и отдаленного прогноза.

2. Изучить ангиогенез УМ с помощью морфологических (MVD) и иммуногистохимических (ИГХ) маркеров (CD31, CD34, VEGF, Flt, Flk) во взаимосвязи со стадией заболевания, толщиной, диаметром основания опухоли и типом клеточного строения.

3. Представить сравнительный анализ корреляционных связей клинико-морфологических показателей и ИГХ маркеров с ближайшим и отдаленным прогнозом выживаемости больных УМ.

4. Разработать регрессионные модели УМ с формулой расчета вероятности развития и срока появления первого метастаза УМ на основе комбинации персонализированных клинико-морфологических показателей и ИГХ предикторов ангиогенеза.

5. Раскрыть возможности применения проточной цитофлуориметрии в комплексной количественной оценке про- и антиангиогенных молекул в стекловидной жидкости глаз с УМ в качестве технологии, альтернативной ИГХ-методу.

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что точность прогноза УМ повышается, если использовать комбинацию из нескольких маркеров, например, генетические предикторы объединить с клинико-морфологическими. Так, если моносомию 3 рассматривали в тандеме с доминирующим типом клеток УМ или внесосудистыми петлями матрикса, то точность прогноза достигала 70% [76].

Маркеры прогноза выбирали, анализируя выживаемость по Каплан Мейеру. В рамках наших исследований анализ выживаемости позволял ответить на ключевые вопросы, «какова будет доля выживших спустя 5, 10 и более лет после энуклеации в зависимости от наличия или отсутствия у них тех или иных клинико-морфологических факторов?», «какие темпы смертности будут наблюдаться среди выживших 5 и 10 лет?», «какие факторы влияют на выживание в отдаленные сроки наблюдения?» и пр.

Особенностью анализа выживаемости по Каплан-Мейеру является использование только цензурированных данных. Наблюдения называются цензурированными, если интересующая зависимая переменная представляет момент наступления терминального события, а длительность исследования ограничена по времени. Такой подход повышает качество и надежность статистического анализа. Анализ по Каплан-Мейеру предполагает тщательное планирование исследований и сбор достаточного количества больных с разными сроками выживаемости и разным набором персонализированных клинических показателей (возраст, пол, высота, диаметр основания, стадия заболевания, локализация, тип строения и тип ангиогенеза и др) во взаимосвязи с которыми анализируют выживаемость.

В исследование вошли архивные данные 220 пациентов с УМ. Все пациенты получили хирургическое лечение в разное время в учреждениях г. Москвы и Московской области (ЦКБ РАН, МНИИ ГБ РАМН), прослежены от 12 месяцев до 20 лет (медиана 108 мес). Дата смерти

подтверждены документально Центральным Адресным Бюро и заключением патологоанатомического отделения с указанием причины смерти.

На *первом этапе исследований* в качестве факторов риска анализировали общепризнанные традиционные маркеры: пожилой возраст, высоту, наибольший диаметр основания УМ, поздние стадии заболевания (8 редакция), эпителиоидный тип строения, а также, классические гистологические показатели плотности сосудов в единице площади среза УМ (microvascular density, MVD). Наряду с ними, анализировали информативность и достоверность собственных маркеров (индекс высоты, индекс протяженности и объем опухоли; локализацию), а также клеточные (CD34 и CD31) и молекулярные ИГХ-маркеры ангиогенеза (экспрессия VEGF и рецепторов Flk, Flt), без которых невозможно развитие сосудов в УМ.

Одним *из обязательных требований* к исследованиям такого рода является фактор достаточности клинического материала. Этот факт мы продемонстрировали в главе 2, анализируя вошедший клинический материал. Больные УМ (n=220), вошедшие в исследование, находились на разных стадиях заболевания: на 1 стадии - 23 пациента, на 2 – 58, на 3 - 84, на 4 – 55. Присутствие больных с разными стадиями и подстадиями заболевания позволяло оценить *прогностическую значимость стадий и подстадий и силу их корреляционной связи с ближайшим и отдаленным прогнозом* (глава 2).

Из 220 пациентов, вошедших в наше исследование, в 16 случаях меланома развивалась в радужке, при этом она не выходила за ее пределы, занимала не более 3-х (стадия T1a, n=12) или 5 часов условного циферблата (T1b, n=4), еще в 12 случаях опухоль распространялась с прикорневой зоны радужки в угол передней камеры без вторичной гипертензии (T1b, n=12). В 25 случаях большая часть опухоли приходилась на цилиарное тело и хориоидею (n=1), меньшая часть – на радужку, что позволило причислить их к цилиарной меланоме и классифицировать соответствующим образом согласно Клиническим рекомендациям 2020 г.

Меланома радужки и иридоцилиарная меланома служили источником тканей опухоли для изучения ранних стадий ангиогенеза. Из анализа выживаемости по Каплан-Мейеру меланома радужки была исключена.

Среди больных УМ было 128 женщин и 92 мужчины, в возрасте от 20 до 84 лет (ср. возраст:  $56,8 \pm 8,4$  лет; медиана = 54 года), что позволяло уточнить *прогностическую значимость фактора «возраст»*.

В аспекте фактора локализации, кроме традиционного деления больных на группы меланомы радужки (1), цилиарной меланомы (2) и меланомы хориоидеи (3), мы предприняли попытку дифференцировать анатомические зоны хориоидеи, вовлеченные в неопластический процесс, ранжируя их по протяженности УМ [20]. По этой причине были выделены 3 группы. В *1 группу* вошли пациенты с меланомой радужки, распространяющейся в сторону заднего

полюса до экватора, без вовлечения экватора (*преэкваториальная*, Рисунок 1 в главе 2). Во 2 *группу* вошли пациенты с юкстапапиллярной УМ, распространяющейся к экватору, охватывая его (*постэкваториальная*). В 3 *группу* вошли больные УМ, развившейся на экваторе, без вовлечения радужки и ЦТ, не достигшие ДЗН. Протяженность УМ оценивали по балльной системе с учетом результатов анализа международной базы данных COMS, полученных на большом массиве клинических данных (более 8000 больных УМ). В частности, в случае прогностически благоприятной, изолированной меланомы радужки, индекс протяженности принимали минимальным из возможных = 1 (единице), при изолированной юкстапапиллярной УМ ставили индекс 2, при распространении опухоли с радужки на цилиарное тело = 3 (квота цилиарного тела =2), при распространении далее до экватора без вовлечения последнего = 8 (собственная квота преэкватора – 5). Юкстапапиллярным УМ, распространяющимся до экватора, присваивали 5 баллов (квота постэкватора – 3), при вовлечении экватора – 9 (квота экватора -4 балла). Таким образом, минимальное значение индекса протяженности при УМ = 1, максимально возможное (от ДЗН до цилиарного тела ) -17 баллов.

Описанный технический прием использовали с целью подхода к оценке фактора локализация и учета этого фактора в моделях УМ.

В нашем исследовании при распределении УМ указанным способом, в 109 случаях процесс располагался преэкваториально, в 123 - вовлекался экватор и в 161 случае УМ располагалась позади экватора, из них в 73 случаях достигала ДЗН.

В анализе учитывали тип клеточного строения УМ по классификации ВОЗ (2018), наличие эпибульбарных узлов, офтальмогипертензию.

В исследование вошли больные, получившие только хирургическое лечение, объем которого определялся стадией заболевания и локализацией опухоли. У 172 пациентов выполнили энуклеацию глаза, пораженного опухолью, в 5 случаях из-за прорастания опухоли фиброзной оболочки глаза и выхода в орбиту – экзентерацию; в 43 случаях - блокэксцизию.

Больных наблюдали от 12 месяцев до 20 лет. При этом 27 пациентов (12,3%) наблюдали только 1 год наблюдения, 64 человека (29,1%) – 3 года, 71 пациент (32,3%) –5 лет и 28 (12,7%) – 10 лет и 30 пациентов более 15 лет. Медиана наблюдения составила – 108 месяцев.

Установлено, что *возраст тесно коррелирует с выживаемостью* пациентов. Для уточнения прогностической значимости фактора «возраст» мы ввели 5 возрастных подгрупп. В 1 подгруппу вошли больные от 20 до 35 лет, во 2 - от 35 до 45 лет; 3 – от 45 до 60 лет; 4 - от 60 до 75 лет; 5 подгруппу-75+лет. Процент выживших в группе цензурированных наблюдений, снизился с 93,8% до 50,0% при переходе от 1 к 5 подгруппе. К 60 месяцам наблюдения (5 лет) в 5 подгруппе (75+лет) осталось всего 38% больных УМ, остальные выбыли по причине УМ-ассоциированной смерти. К этому же сроку в 1 подгруппе не произошло выбывания, а во 2

подгруппе выбыло 18% больных. Средние значения и медианы выживания оказались наименьшими в 5 возрастной подгруппе (75+ лет). Достоверность сравнений подтверждена всеми тестами: Mantel-Cox Breslow и Tarone-Ware ( $p_1=0,008$ ;  $p_2=0,004$ ,  $p_3=0,004$ , соответственно). Факты указывали на высоко сопряженную связь возраста с выживаемостью (95% ДИ: 0,016 и 0,342,  $p=0,00002$ )

Гендерная принадлежность не влияла на прогноз УМ (н/д).

Анализировали *высоту опухоли* в качестве персонализированного фактора риска. Использовали несколько технических приемов. Вначале распределяли больных на 6 подгрупп согласно последней классификации AJCC (8 редакция). В 1 подгруппу вошли опухоли толщиной  $\leq 3$  мм, во 2 подгруппу – вошли УМ от 3,1 – 6,0 мм включительно, в 3 – от 6,1 до 9,0 мм включительно, 4 – от 9,1 до 12,0 мм включительно, 5 – от 12,1 до 15,0 мм и 6 подгруппу -  $\geq 15$  мм. 5-летняя выживаемость снижалась от 90% к 50% , укорачивались средний срок ( $174,5 \pm 11,7$  мес против  $91,0 \pm 31,0$  мес) и медиана ( $167,0$  мес против  $18,0$  мес) выживаемости при переходе от 2-й к 6-й подгруппе ( $p=0,013$ ).

Мы также применили *несколько собственных ранжированных показателей*. Так на этапе планирования было введено 5 рангов: 1 ранг соответствовал высоте опухоли  $\leq 2$  мм, 2 – 2,1–5 мм, 3 – 5,1–10 мм, 4 – 10,1–15 мм и 5 –  $>15$  мм (наблюдали при выходе опухоли за пределы глаза). Выживаемость экспоненциально снижалась с увеличением ранга толщины опухоли. К 5 годам наблюдения выжили всего 42,9% больных УМ с 5 рангом толщины против 72,6% при 3 ранге ( $p=0,031$ ). Межгрупповые различия в средних сроках выживаемости между этими группами также были достоверны:  $91,0 \pm 31,0$  мес против  $159,7 \pm 15,8$  мес в 3 группе ( $p=0,031$ ).

Анализировали информативность, надежность и достоверность второго персонализированного показателя – наибольшего диаметра основания УМ, распределяя больных на 7 подгрупп согласно последней классификации (8 редакция). В 1 подгруппу вошли УМ диаметром основания  $\leq 3$  мм, во 2 – вошли УМ от 3,1 до 6,0 мм, включительно, в 3 – от 6,1 до 9,0 мм, включительно, 4 – от 9,1 до 12,0 мм, включительно, 5 – от 12,1 до 15,0 мм и 6 – от 15,1 до 18,0 мм, включительно, и 7 подгруппу от 18 мм.

Анализ выживаемости продемонстрировал четкую закономерность между наибольшим диаметром основания УМ и выживаемостью. Однако на отдаленных сроках наблюдения ( $>150$  мес), из-за малого количества выживших в 7 подгруппе анализируемый маркер стал малопригоден к прогнозированию ( $p=0,099$ ). К тому же, остальные кривые проходили очень близко друг к другу...

В связи с чем, для повышения точности и надежности маркера «наибольшего диаметра опухоли» мы ввели собственные *показатели*, а именно, 5 рангов. 1 ранг присваивали УМ с диаметром основания  $\leq 7$  мм, 2 ранг - от 7,1 до 10 мм; 3 ранг - от 10,1 до 15 мм, 4 ранг - от 15,1

до 20 мм; 5 - >20 мм. При таком распределении больных анализ выживаемости цензурированных наблюдений продемонстрировал ускоренное выбывание по причине меланома-ассоциированной смертности в 5 подгруппе. К 60 мес. наблюдения (5 лет) в 5 подгруппе не осталось ни одного пациента. В 3 подгруппе к этому сроку выжило 65% больных УМ. Различия по срокам выживаемости были более достоверны ( $p=0,005$ ), чем при предыдущем традиционном маркере - диаметре основания.

В аспекте разработки прогностического маркера, отражающего оба (высоту и наибольший диаметр основания) персонализированных размера опухоли, и последующего его применения в регрессионных моделях, мы ввели третий *собственный показатель*, обеспечивающий надежность статистических оценок, - **ОБЪЕМ** [19]. Для того, чтобы получить его значение, вначале высота опухоли ранжировалась на 5 рангов: 1 ранг соответствовал высоте опухоли  $\leq 3$  мм, второй – 3,1–6,0 мм, третий – 6,1–9,0 мм, четвертый – 9,1–12 мм и пятый – >12 мм. Аналогично: при диаметре опухоли <6 мм присваивали 1 ранг, 6,1–9,0 мм – 2 ранг; 9,1–15 мм – 3 ранг, 15,1–18 мм – 4 ранг; при диаметре >18 мм – 5 ранг. Объем опухоли признавали малым, если сумма рангов ее высоты и диаметра не превышала 4 единиц, средним – при сумме градаций от 5 до 8; признавали большим, если указанная сумма превышала 8. Анализ выживаемости больных УМ показал, что большой объем УМ ассоциируется с худшей выживаемостью, чем средний (46,7% против 75,8%;  $p=0,028$ ) и малый ( $p=0,003$ ). Это отражается на средних показателях выживаемости ( $45,1 \pm 7,8$  при большом объеме против  $170,4 \pm 30,1$  мес при малом объеме,  $p < 0,01$ ) и ее медиане (190,0 мес против 50 мес,  $p=0,001$ ; см главу 3). При этом, к 75 мес наблюдения осталось в живых только 17% больных с большим объемом УМ, что устраняло всякую возможность использования созданного нами показателя ОБЪЕМ в качестве предиктора *отдаленного прогноза* УМ.

Тесную корреляционную связь с прогнозом продемонстрировал маркер «стадия заболевания» (по Т, 8 редакция). Анализ выживаемости показал ускоренное выбывание пациентов по причине меланома-ассоциированной смертности на Т4 стадии. Данные демонстрировали экспоненциальное снижение средних сроков дожития при переходе от менее продвинутой к более продвинутой стадии. Так, к 180 месяцам наблюдения (15 лет) выжило 30% больных УМ с 4 стадией заболевания против 56% больных с 3 стадией заболевания (по Т,  $p=0,024$ ). Различия в сроках выживаемости были достоверны:  $130,9 \pm 19,9$  мес на Т4 против  $140,6 \pm 11,2$  мес. на Т3 ( $p=0,002$ ) и против  $177,0 \pm 14,2$  мес. на Т2 ( $p=0,001$ ).

Анализировали прогностический потенциал клеточного типа строения УМ, распределяя их на группы в соответствии с классификацией ВОЗ (2018г). Поскольку в наше исследование вошли 14 случаев УМ некротического типа, при котором исходное строение опухоли определить не удалось, поэтому мы исключили их из анализа выживаемости при оценке типа

клеточного строения. Однако при анализе выживаемости по Каплан-Мейеру пациентов с УМ некротического типа было установлено, что показатели выживаемости не отличаются от таковых при эпителиодной УМ. Это позволяло высказать предположение, что наиболее часто выраженные некрозы развиваются при эпителиодной УМ.

Сравнение показателей выживаемости больных с разными типами клеточного строения УМ достоверно различались во всех трех тестах (Log Rank, Breslow и Tarone-Ware,  $p < 0,0005$ ). Среднее время дожития пациентов с веретенноклеточной УМ тип А составляло 170 мес (14 лет) (95% ДИ: 144-196 мес.), больных с эпителиодной УМ – 128 мес. (11 лет) (95% ДИ: 96-160 мес.), с веретенноклеточным типом Б – 125 мес. (10 лет) (95% ДИ: 101-148 мес.; см. главу 3). Если кривая выживаемости больных УМ веретенноклеточного типа А демонстрировала лучшие показатели, по сравнению с двумя другими клеточными типами, то кривые выживаемости при эпителиодном и веретенноклеточном типе В близко подходили друг к другу на сроке 150 месяцев (13 лет). Близкое распределение кривых не позволяло надеяться на высокую достоверность, информативность и надежность этого персонализированного показателя в качестве предиктора *отдаленного прогноза*.

С особым вниманием мы отнеслись к изучению потенциала фактора «локализация» (см обоснование выше в этой главе). Согласно анатомическому разделению сосудистая оболочка глаза делится на 3 части: хориоидею, цилиарное тело и радужку. Соответственно, и опухоли, развившиеся в этих компартментах, традиционно подразделяются на меланомы радужки, меланомы цилиарного тела и хориоидальные меланомы. Цилиарные меланомы признаны согласно последней ревизии COMS опухолями повышенного риска развития метастазов, а меланомы радужки, напротив, прогностически благоприятными. Однако известно, что клеточные структуры юкстапапиллярной хориоидеи на высоком уровне секретируют проангиогенные факторы, а, следовательно, теоретически могут быстрее и чаще метастазировать. Кроме того, кровоснабжение сосудистой оболочки этих компартментов различается, что также может отразиться на метастазировании. В связи с чем, мы попытались проанализировать метастатический потенциал опухолей всех возможных локализаций, ***исключив из сравнительного анализа выживаемости меланомы радужки.***

Несмотря на то, что, средние значения выживаемости больных цилиарной меланомой отличаются от показателей меланом других локализаций, на ранних сроках наблюдения (до 60 мес) статистически значимых различий не найдено ( $p=0,38$ , н/д). Кривые по Каплан-Мейеру демонстрировали практически одинаковое выживание пациентов с цилиарной меланомой от УМ других локализаций в первые 60 месяцев наблюдения (5 лет). Недостоверные различия проявились к 100 мес и сохранялись до 175 мес наблюдения ( $p=0,07$ ).

Известно, что цилиарные меланомы могут распространяться с цилиарного тела на хориоидею, при этом, злокачественный потенциал опухоли теоретически может как усиливаться, так и ослабевать. Поэтому мы проанализировали отдельно *преэкваatorialную* меланому, сравнив выживаемость больных с преэкваatorialными и постэкваatorialными меланомами, предварительно исключив из анализа меланому радужки. При таком распределении больных появились статистически значимые различия в выживаемости (глава 3,  $p=0,001$ ). Веерное распределение кривых выживаемости цензурированных наблюдений по Каплан-Мейеру имело место с первых месяцев наблюдения (глава 3). Различия в выбывании проявлялись с 50 мес наблюдения (5 лет), достигая стат. значимости к 156 мес (13 лет) ( $p=0,001$ ). Таким образом, выделение группы преэкваatorialной меланомы оказалось более значимым в отдаленном прогнозе, чем цилиарной меланомы. Иными словами, распространение меланомы с цилиарного тела на хориоидею сопровождается усилением метастатического потенциала УМ и ухудшает выживаемость больных УМ.

Мы попытались дифференцировать собственный злокачественный потенциал юкстапапиллярных меланом хориоидеи (МХ). Для этого собственно и были выделены 3 клинические подгруппы: экваториальные, постэкваatorialные и юкстапапиллярные МХ (см Рисунок 1 в главе 2). Вначале анализ выживаемости был проведен для экваториальных меланом, не распространяющихся на цилиарное тело, и не достигающих ДЗН. Получены статистически значимые межгрупповые различия в показателях (глава 3). Анализ кривых выживаемости цензурированных больных с экваториальными УМ и объединенной группы УМ всех других локализаций (исключая меланому радужки) продемонстрировал веерное распределение кривых к 12 месяцам наблюдения после энуклеации. Однако достоверность межгрупповых различий в выбывании пациентов проявлялась только к 5 годам наблюдения ( $p=0,003$ ).

Кривые выживаемости наглядно демонстрировали отсутствие различий в скорости выбывания юкстапапиллярных меланом в первые 5 лет наблюдения по сравнению с объединенной группой больных УМ других локализаций. Достоверность различий появилась к 15 годам наблюдения. К этому времени выживаемость юкстапапиллярных УМ составила 70% против 38% больных в группе сопоставления ( $p=0,002$ ).

В наше исследование вошло 176 цензурированных программой SPSS пациентов, из них в 52 глазах была офтальмогипертензия. Распределение выживаемости для групп с наличием и отсутствием офтальмогипертензии достоверно различалось (3 теста сравнения Log Rank, Breslow и Tarone-Ware;  $p < 0,0005$ ). Среднее время дожития больных УМ без офтальмогипертензии составило 181 месяц (15 лет) (95% ДИ: 157-205 мес.), в то время как ср. сроки дожития пациентов с офтальмогипертензией составили 97 мес. (8 лет) (95% ДИ: 68-126

мес.). Медиана дожития у пациентов с офтальмогипертензией составила 60 мес.(5лет) (95% ДИ: 35-85 мес.), в то время, как у 60% пациентов без офтальмогипертензии время дожития превысило 20 лет (глава 3). Таким образом маркер «офтальмогипертензия» был высоко сопряжен с выживаемостью больных УМ.

Мы проанализировали достоверность и надежность потенциального фактора риска развития метастазов – эпibuльбарных узлов в ближайшем и отдаленном прогнозе. Выживаемость в группе с их наличием статистически значимо не отличалась от показателей группы с их отсутствием ( $p=0,089$ ), но как стратификационная переменная этот фактор оказывал значимое влияние на время дожития в присутствии второго фактора риска - «офтальмогипертензии» (см главу 3). Присутствие двух клинических факторов риска кардинально меняло ситуацию. Появлялись статистически значимые различия ( $p=0,001$ ) в выживаемости между группами с наличием и отсутствием комбинации из двух факторов.

В дальнейшем мы использовали найденный нами *принцип кумуляции эффектов*, тестируя вначале тот или иной маркер на его связь с прогнозом в группе, где он присутствует один и сравнивая показатели этой группы с группой, где этот маркер отсутствует (самостоятельный и независимый потенциал), и сравнивая показатели выживаемости группы с наличием комбинации из анализируемого маркера и офтальмогипертензии с показателями группы с отсутствием обоих факторов.

В целом проведенная работа позволила оценить силу сопряженной связи с прогнозом в виде коэффициентов корреляции, которые представлены в таблице 48 в главе 3.

На *втором этапе* (глава 4 и 5) изучали ангиогенез в УМ традиционными гистологическими и ИГХ методами. Основной акцент исследований был сделан на изучении особенностей клеточного и молекулярного ангиогенеза 98 образцов УМ и последующем корреляционном анализе ангиогенных показателей с клинико-морфологическими показателями УМ, просчете силы их сопряженной связи с прогнозом заболевания. Мы полагали, что молекулярные ИГХ-маркеры, отражающие одновременно персонализированный характер построения сосудистой сети в УМ и постгеномный уровень контроля активации генов ангиогенеза у пациента, могут стать надежными и достоверными предикторами прогноза. Это предположение стало нашей рабочей гипотезой. Результатом наших исследований должны были стать регрессионные модели УМ с формулами для расчета прогноза. Однако, точность и надежность таких формул, как правило, зависят от качества статистического анализа и правильности выбора комбинации факторов риска, высоко сопряженных с прогнозом.

В ходе нашего ретроспективного исследования на достаточном количестве наблюдений ( $n=98$ ) была подтверждена высокая информативность и надежность известного количественного показателя плотности сосудов в опухоли - MVD в ближайшем и отдаленном

прогнозе выживаемости больных УМ (глава 4). В подавляющем большинстве случаев в качестве предиктора прогноза он был пригоден. Исключение составили случаи, когда сосуды в УМ были компрессированы опухолевыми клетками или облитерированы. В этом случае сосуды не визуализировались и их подсчет был невозможен. Обнаружить их помогало ИГХ окрашивание АТ к CD31 и CD34 к эндотелиальным клеткам.

Чувствительность к выявлению скрытых и облитерированных сосудов в УМ у маркера CD31 оказалась ниже, чем у CD34. CD31 не работал там, где отсутствовала полноценная выстилка сосудов ЭК. На этом этапе CD31 демонстрировал ложно-негативный результат. Зато прекрасно работал CD34. И наконец, нами было установлено, что оба маркера, CD31 и CD34, как, впрочем, и классические морфологические показатели плотности сосудов - MVD одинаково бесполезны в случае формирования УМ сосудистой сети по типу сосудистой мимикрии, при которой стенка «сосуда» сформирована базальными мембранами опухолевых клеток. Именно таким сосуды развиваются при опухолях больших размеров и/или в УМ, распространившейся на цилиарное тело. Феномен сосудистой мимикрии сам по себе является фактором высочайшего риска гематогенного метастазирования. Однако в классификационной схеме УМ 8 редакции AJCC этот фактор не отражен и не просчитан в качестве предиктора прогноза. Недоучет этого фактора снижает информативность и возможность прогнозирования маркера MVD. Для таких УМ мы изучили возможность применения ИГХ-маркера – молекулы VEGF в качестве предиктора прогноза и показателя, отражающего молекулярный фенотип ангиогенеза УМ.

Нами было установлено, что УМ различаются по молекулярным характеристикам ангиогенеза. Эти различия могут обуславливать особенности их биологического поведения во все сроки наблюдения. Под особенностями поведения мы понимали агрессивность, скорость пролиферации и вероятность метастазирования. Было обнаружено, что VEGF экспрессируется как опухолевыми клетками УМ, так и ЭК опухолевых сосудов. В связи с чем, каждый из этих феноменов был проанализирован отдельно в качестве самостоятельного и независимого маркера прогноза. Были раскрыты возможности каждого из них в качестве предикторов прогноза. Корреляционно-регрессионный анализ 5-летней и 10 летней выживаемости по Каплан–Мейеру подтвердил высокую надежность и достоверность каждого из них как в ближайшем, так и отдаленном прогнозе. Прогностически неблагоприятными (по нашим данным) стали УМ с экспрессией  $\geq 50$  VEGF+опухолевых клеток на срезе (ув.  $\times 400$ ) или с экспрессией  $> 30\%$  VEGF+ эндотелиальных клеток в сосудах УМ. Немаловажное значение имела интенсивность ИГХ-окрашивания клетки, которая также стала одним из полуколичественных показателей, включенных в регрессионный анализ (глава 4 и глава 5; табл 84 ).

Мы также изучили экспрессию двух рецепторов VEGF: Flk и Flt, без которых невозможно построение сосудистой сети в опухоли (глава 5). Прогностически неблагоприятными стали УМ с экспрессией более  $\geq 30\%$  Flk-позитивных клеток. Как стратификационная переменная процент Flk<sup>+</sup> клеток в УМ оказывал значимое влияние на время дожития больных УМ особенно в присутствии дополнительного фактора риска – офтальмогипертензии. Поэтому процент экспрессии Flk<sup>+</sup> клеток в УМ мы также рассматривали, как предиктор. Был выявлен кумулятивный эффект цитоплазматической экспрессии  $>50\%$  Flt<sup>+</sup> клетками УМ и ядерной экспрессии  $>50\%$  Flt<sup>+</sup> клетками.

На *третьем этапе* отбирали маркеры, продемонстрировавшие свою достоверную связь с прогнозом заболевания. Анализировали чувствительность и специфичность каждого из предикторов. И на основе полученных данных разрабатывали регрессионные модели заболевания УМ, состоявшие из 4, 5 или 6 предикторов, имевших корреляционную связь с прогнозом, которые статистическая программа SAS просчитывала и выдавала в виде конечных формул. Нами были разработаны более 300 линейных регрессионных моделей заболевания, пригодность и точность которых была оценена программой стат. анализа SAS, из которых 14 моделей признаны достоверными, из них мы отобрали 5 наиболее простых и удобных для применения в клинической практике. Они представлены в практических рекомендациях. В целом цель работы была поставлена и основные задачи решены. Однако, понимая, что в настоящее время ИГХ метод анализа в силу разных причин не везде применяется в рутинной практике. И, следовательно, не всем доступны наши технологии прогнозирования. Поэтому следующим этапом наших исследований стал поиск альтернативы ИГХ-методу. В этом аспекте мы анализировали возможности проточной мультиплексной цитофлуориметрии с количественной оценкой восьми молекул, участвующих в ангиогенезе на 9 образцах стекловидной жидкости, полученной при энуклеации глаз с УМ. Наше предварительное исследование показало, что по сравнению с группой сравнения, в качестве которой служила группа больных сенильной катарактой, в СТЖ глаз с УМ присутствуют высокие концентрации медиаторов ангиогенеза с плюрипотентными свойствами. Так, при УМ имело место многократное повышение таких цитокинов как ИЛ-8 ( $\approx$  в 35 раз) и FGFb ( $\approx$  в 20 раз), что позволяло предполагать, о том, что в канцерогенезе УМ важную роль играет воспаление, выполняя роль драйверов. В высоких концентрациях эти цитокины, как известно, оказывают провоспалительный эффект, что в целом совпадает с данными других экспертов в этой области. В целом, мы пришли к заключению, что метод мультиплексной проточной цитометрии как метод количественного определения одновременно нескольких молекул в небольшом объекте (50 мкл) является хорошим информативным инструментом для моделирования опухолевого взаимодействия с микроокружением. В будущем это может стать альтернативой ИГХ-анализу и

подспорьем при выработке стратегии лечения диссеминированных форм УМ. Недостаточно высокие уровни интерферонов (ИФН $\gamma$  и ИФН $\alpha$ ) на фоне отсутствия TGF $\beta$  в СТЖ позволяют думать о том, что подавлена секреция и контроль регуляции природных ангиостатических механизмов прерывания ангиогенеза на глазах с УМ. Повышенные уровни проангиогенных факторов роста (ИЛ-8, ангиогенина, TNF $\alpha$ , VEGF и bFGF) в СТЖ при УМ могут свидетельствовать о присутствии одновременно 3х механизмов регуляции ангиогенеза, два из которых не зависят от VEGF, действуют самостоятельно и независимо, и теоретически могут проявлять синергизм с классическим VEGF-зависимым механизмом ангиогенеза. А, следовательно, предложенный инструмент может оказаться более информативным и повысить надежность прогноза. Высокие уровни цитокинов с плюрипотентными (проангиогенными, пролиферативными и провоспалительными) свойствами свидетельствуют о том, что при УМ воспаление может играть роль промотера ангиогенеза. И этот феномен нуждается в учете будущих стратегий лечения.

## ВЫВОДЫ

1. Проведен ретроспективный анализ, с помощью которого доказана высокая информативность и достоверность клинико-морфологических факторов риска – большого диаметра основания ( $p < 0,01$ ), высоты ( $p \leq 0,05$ ) и объема опухоли ( $p < 0,001$ ), вовлечения цилиарного тела ( $p < 0,05$ ) как предиктора ближайшего прогноза ( $\leq 3$  лет), высокая информативность пожилого возраста (75+ лет,  $p < 0,001$ ) и плотность сосудов на единицу площади (3 тип MVD;  $p \leq 0,05$ ) как предиктора ближайшего и отдаленного прогноза (5 и 10 лет).
2. Изучены особенности ангиогенеза на разных стадиях заболевания, при разных размерах, локализациях и клеточных типах УМ и доказана связь показателей ангиогенеза с прогнозом; прогностически неблагоприятными в *отдаленном прогнозе* являются более 50 % VEGF позитивных опухолевых клеток ( $p=0,0001$ ) и/или  $>30$  % VEGF позитивных эндотелиальных клеток ( $p=0,001$ ),  $\geq 50$  % Flk позитивных клеток ( $p=0,0001$ ),  $>50$  % Flt позитивных клеток с ядерной ( $p=0,001$ ) и цитоплазматической ( $p=0,001$ ) рецепцией на срезе УМ (ув.  $\times 400$ ).
3. Сравнительный анализ корреляционной связи клинико-морфологических показателей с прогнозом выявил в *ранние сроки* (до 3 лет) сопряженную связь для T стадии ( $k=0,275, p=0,0001$ ) и подстадии заболевания ( $k=0,178, p=0,0012$ ), диаметра основания ( $k=0,187, p=0,008$ ) и локализации УМ (для преэкваториальной  $k=-0,252, p=0,003$ ); в *поздние сроки* (до 10 лет) – для T стадии ( $k=0,200, p=0,005$ ) и подстадии ( $k=0,197; p=0,005$ ), диаметра основания ( $k=-0,20113, p=0,027$ ) и высоты УМ ( $k=0,449, p<0,05$ ); с *ближайшим и отдаленным прогнозом* тесно коррелировали маркеры ангиогенеза –  $\geq 50$  % VEGF позитивных опухолевых клеток ( $k=-0,244, p=0,001$ ), процент Flt позитивных клеток с ядерной экспрессией ( $k=0,368, p=0,001$ ) и интенсивность ИГХ-экспрессии Flk ( $k=-0,217, p=0,037; k=-0,424, p=0,000$ ); доказаны сопоставимые возможности клинико-морфологических и ИГХ маркеров в 5-летнем прогнозе и приоритет ИГХ предикторов в отдаленном прогнозе ( $\geq 10$  лет) выживаемости больных УМ.
4. Разработаны линейные регрессионные модели заболевания с формулой расчета выживаемости больных УМ, вероятности развития и срока появления первого метастаза УМ на основе комбинации персонализированных клинико-морфологических показателей и молекулярных ИГХ предикторов ангиогенеза.
5. Предложены, апробированы и раскрыты возможности применения проточной цитофлуориметрии в комплексной количественной оценке ангиогенеза в стекловидной жидкости глаз с УМ, продемонстрированы высокие концентрации проангиогенных молекул (VEGF:  $471,5 \pm 154,7$  пг/мл; ангиогенин:  $11704,9 \pm 1767,7$  пг/мл), а также плюрипотентных белков с провоспалительными эффектами (ИЛ-8:  $323,2 \pm 227,9$  пг/мл; FGFb:  $44,6 \pm 16,3$  пг/мл), что

подтвердило диагностический потенциал технологии и перспективы ее применения в качестве альтернативы ИГХ.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Расчету прогноза должна предшествовать морфологическая верификация УМ, точное определение ее локализации и количественная ИГХ-оценка ангиогенеза (количество иммунопозитивных ОК и ЭК к маркерам VEGF и FLK, а также оценка интенсивности ИГХ-экспрессии этих молекул на срезе УМ при увеличении  $\times 400$ )

2. Прогноз выживаемости больных УМ производится по одной из ниже представленных формул, выбор которых осуществляют на основании персонализированных показателей. Так, в случае УМ постэкваториальной локализации используют формулу 1, при цилиарной меланоме – формулу 2, при МХ юкстапапиллярной – формулу 3.

Для постэкваториальной меланомы (формула 1):

$$\text{Выживаемость (в мес.)} = 68,994 - 33,682 * \text{HYPERTEN} - 39,334 * \text{FLK\_I\_G} + 30,856 * \text{POST\_LOC}$$

Для цилиарной меланомы (формула 2):

$$\text{Выживаемость (в мес.)} = 96,388 - 28,586 * \text{HYPERTEN} - 27,470 * \text{CIL\_LOC}$$

Для юкстапапиллярной УМ (формула 3):

$$\text{Выживаемость (в мес.)} = 77,022 - 26,245 * \text{HYPERTEN} - 48,203 * \text{FLK\_I\_G} + 26,750 * \text{UXTA\_LOC}$$

3. Рекомендовано дополнить прогноз выживаемости в мес. расчетом срока появления первого метастаза. Расчет выполняют по универсальной формуле, представленной ниже:

$$\text{Время появления 1 метастаза (в мес.)} = 69,688 - 47,989 * \text{HYPERTEN} + 59,905 * \text{VEGFE\_G},$$

где HYPERTEN – бинарный показатель «офтальмогипертензия»: ставят 0 в случае его отсутствия, 1- присутствия. POST\_LOC – бинарный показатель для постэкваториальной УМ: 0 – отсутствует, 1 – присутствует; CIL\_LOC – бинарный показатель, где 1 – ставится УМ, если она имеет цилиарную локализацию, 0 – не имеет. UXTA\_LOC – бинарный показатель, где 1 ставят, если УМ имеет юкстапапиллярную локализацию, 0 – не имеет.

Ангиогенные показатели: VEGFE\_G – бинарный показатель: 1 – имеется интенсивная ИГХ-окраска эндотелиальных клеток VEGF; 0 – не имеется и FLK\_I\_G - 1 – имеется интенсивная ИГХ-окраска; 0 – не имеется.

Примечание: Представленные формулы не предназначены для прогнозирования меланомы радужки

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ	Антитела
АГ	Антигены
ИЛ-8	Интерлейкин 8
ИГХ	Иммуногистохимические исследования
ИФН	Интерферон
ОМ	Окулодермальный меланоцитоз
ОК	Опухолевые клетки
ПЭК	Предшественники эндотелиальных клеток костномозгового происхождения
СТЖ	Стекловидная жидкость
УМ	Увеальная меланома
УЗИ	Ультразвуковые исследования
ЦТ	Цилиарное тело
ЭОР	Экстраокулярное распространение
ЭК	Эндотелиальные клетки
AJCC	Американский объединенный комитет по Классификации рака
CD	Тканедифференциационные клеточные маркеры
ER	Эстроген
ERR	Рецепторы эстрогена
FGF	Основной фактор роста фибробластов
MLN	Большой средний диаметр десяти крупнейших ядрышек
TGF	Трансформирующий фактор роста
Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF	Фактор роста эндотелия сосудов
TNF	Фактор некроза опухоли

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Авакян, К.В. Увеальная меланома и ее метастазирование дисс. канд мед наук . 14.01.07 / Авакян, Карине Вардановна – Москва. – 2018. – 152 с.
2. Амирян, А.Г. Увеальная меланома: система диагностических и прогностических критериев органосохраняющего лечения. Дисс докт мед наук. 14.01.17. /Амирян, Ануш Гамлетовна. –Москва. – 2018. – 414с.
3. Амирян, А.Г. Факторы прогноза увеальной меланомы. / А.Г. Амирян, С.В. Саакян // Вестник офтальмологии. - 2015.- №1.- С.91-94.
4. Анурова, О.А. Изучение роли экспрессии трансмембранного рецептора CD117/c-kit в прогрессировании увеальных меланом. /О.А. Анурова, В.Г. Лихванцева, М.В. Верещагина. // Вестник офтальмологии. -2007. - № 5. - С. 41-44
5. Астахова, С.Е. Маркеры ангиогенеза в прогнозе увеальной меланомы./С.Е. Астахова, В.Г. Лихванцева, Ю.И. Ухов. // Медицинская иммунология. – 2003. - Т.5, № 3-4. - С. 346
6. Балмуханова, А.В. Клинико-биологические особенности внутриглазных меланом и пути улучшения их лечения: Дис. ... д-ра мед. наук / А.В. Балмуханова. – Алма-Ата. - 2003.- 280с.
7. Барышников, А.Ю. Оценка ангиогенеза опухолей человека / А.Ю.Барышников, Е.В.Степанова, М.Р. Личиницер // Усп. совр. биологии.-2000.-№ 6.-С.599-604.
8. Брендель, Д.И. Роль морфологических критериев и иммуногистохимических маркеров в прогнозе увеальной меланомы: дисс.кандидата медицинских наук: 14.00.15 / Брендель Дина Ивановна; Новосибирск, 2004. – 106с.
9. Бровкина, А.Ф. Метастатическое поражение печени у больных увеальной меланомой.//А.Ф. Бровкина, В.В. Вальский, Г.Д. Зарубей // Вестник офтальмологии. -1998. -№1-С.21-22
10. Бровкина, А.Ф. Риск метастазирования меланом хориоидеи./Бровкина А.Ф., Вальский В.В., Гусев Г.А. // Вестник офтальмологии. – 2003 - №2 – С.26-28.
11. Бровкина, А.Ф. Лучевая терапия в лечении опухолей органа зрения. // Клин. Офтальмология – 2003. - т.4 - №1 – С. 15-19
12. Бровкина, А.Ф. МикроРНК — биомаркер агрессивности меланомы хориоидеи. /А.Ф. Бровкина, А.Н. Цыбикова // Российский офтальмологический журнал.- 2022. - 15(1) – С. 7-12.
13. Верещагина, М.В. Клинические и иммуногистохимические параллели в диагностике опухолей сосудистого тракта глаза и в прогнозировании неопластического процесса./ Диссертация канд мед наук: 14.00.08 /Верещагина Марина Владимировна — Москва, 2006 – 156с.

14. Гришина, Е.Е. Анализ выживаемости больных увеальной меланомой при органосохранном и ликвидационном лечении. /Е.Е. Гришина Е.Е., М.Ю. Лернер, Э.Г. Гемджян //Альманах клинической медицины. - 2018. - 46 (1). – С. 68–75.
15. Зарецкий, А.Р Опыт молекулярного тестирования увеальной меланомы I–III стадии при консервативном и хирургическом лечении / А.Р Зарецкий, В.А. Яровая, В.В. Назарова, Л.В. Демидов // Вопросы онкологии. – 2018. – Т.64, № 5.- С.625-631.
16. Зиангирова, Г.Г. Опухоли сосудистого тракта глаза./ В монографии: Г.Г. Зиангирова, В.Г. Лихванцева. Опухоли сосудистого тракта глаза - М.: Последнее слово, 2003.- 456с.
17. Казимилова, Е.Г. Ранняя диагностика метастатической увеальной меланомы: современные возможности и перспективы развития (обзор литературы). / Е.Г. Казимилова, Е.Е. Гришина // Современная онкология. -2022- Т. 10, № 1. – 37с.
18. Карамышева, А.Ф. Ангиогенез опухоли: механизмы, новые подходы / А.Ф.Карамышева // Канцерогенез / Под ред. Д.Г.Заридзе.- М., 2000.- С.150-165.
19. Лихванцева, В.Г. Роль цитокинов в патогенезе, прогнозе и лечении увеальной меланомы.- Дисс. докт. мед. наук: 14.00.08. / Вера Геннадьевна Лихванцева. - М.- 2001. – С.243
20. Лихванцева, В.Г. Биологические маркеры nm23 и CD117 в регуляции опухолевого роста увеальной меланомы/ В.Г. Лихванцева, О.А. Анурова, М.В. Верещагина //В сборнике тезисов «Современные технологии в дифференциальной диагностике и лечении внутриглазных опухолей»,– Москва, 2007 - С. 89-91
21. Лихванцева, В.Г. Роль инфильтрации опухолей иммунокомпетентными клетками в патогенезе увеальной меланомы. / В.Г. Лихванцева, О.А. Анурова, М.В. Верещагина. // В тезисах докладов международной научно-практической конференции «Современные технологии лечения заболеваний переднего и заднего сегментов глаза.»– Уфа, 2008. - С. 499-502.
22. Лихванцева, В.Г. Роль маркера nm23 в патогенезе увеальной меланомы./ В.Г. Лихванцева, О.А. Анурова, М.В. Верещагина. // Российский биотерапевтический журнал, - 2007.- № 1, - С.68.
23. Лихванцева, В.Г. Экспрессия КИТ (CD 117) первичных увеальных меланом и их метастазов. / Лихванцева В.Г., Анурова О.А., Верещагина М.В. // Российский биотерапевтический журнал. – Москва. – 2005. - №1. - С.86.
24. Мичурова, М.С. Роль эндотелиальных прогениторных клеток в развитии осложнений сахарного диабета. / М.С. Мичурова, В.Ю. Калашников, О.М. Смирнова // Сахарный диабет. – 2015. - № 1; - С.24-32.

25. Мякошина, Е.Б. Начальная меланома хориоидеи: звенья патогенеза, ранняя диагностика, эффективность лечения, зрительный и витальный прогноз. дисс. док. мед наук: 3.1.5. Офтальмология. // Елена Борисовна Мякошина – Москва, 2022. – С.356
26. Назарова, В.В. Лечение и прогноз метастатической увеальной меланомы. Дис канд мед наук: 14.01.12 / Валерия Витальевна Назарова. – Москва, 2019г. – С 136.
27. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Под ред. С.В. Петрова и Н.Т. Райхлина. // Казань, 2004. – Изд-во «Титул». - Стр.451.
28. Ручко, Т.А. Дифференциальная диагностика внутриглазных новообразований на основе комбинированных пространственных ультразвуковых методов исследований. Дисс. канд. Мед наук: 14.00.08./ Татьяна Александровна Ручко. – Москва, 2007- С. 176.
29. Саакян, С.В. Выживаемость пациентов с увеальной меланомой малых и средних размеров. / С.В. Саакян, Е.Б. Мякошина, Г.П. Захарова, Д.Д. Гарри// //Эффективная фармакотерапия. - 2020. – Т. 16. № 21- С. 18–22.
30. Саакян, С.В. Клинические, патоморфологические и молекулярно-генетические особенности увеальной меланомы с высоким риском метастазирования./ С.В. Саакян, А.Г. Амирян, А.Ю. Цыганков // РОЖ. - 2015.-Т.8, №2 - С.47-52.
31. Саакян, С.В. Особенности метастатического поражения и выживаемости больных увеальной меланомой в зависимости от метода проведенного лечения. //С.В. Саакян, О.Г. Пантелева, Т.В. Ширина. //Российский онкологический журнал.- 2012- Т.5, № 2.- С.55-58.
32. Саакян, С.В. Оценка выживаемости больных увеальной меланомой после органосохраняющего лечения и энуклеации. /С.В. Саакян, О.Г. Пантелева, Т.В. Ширина. //РОЖ.-2011- Т.4, №1-С.67-70.
33. Самкович, Е. В. Комплексная диагностическая оценка кровоснабжения меланомы хориоидеи. Дисс. канд. Мед наук.: 14.00.08. / Елена Владиславовна Самкович. - 2021г – Ст.-Петербург. – С. 123.
34. Самкович, Е.В.. Возможности идентификации сосудистой сети меланомы хориоидеи./Е.В. Самкович , И.Е. Панова // Офтальмология. - 2020 – Т. 17, № 2 –Стр. 172–180.
35. Сутулов, А.Ю. Изучение молекулярно-биологических маркеров апоптоза при увеальной меланоме: Дис. канд. мед. наук: 03.00.25 / Александр Юрьевич Сутулов.–Рязань. - 2003.-127с.
36. Цыганков, А. Ю. Прогностическая значимость диагностики молекулярно-генетических изменений и их корреляция с клинико-морфологическими характеристиками при увеальной меланоме. Дис. Канд мед наук: 14.01.07 / Александр Юрьевич Цыганков. – Москва, 2014. – 168с.
37. Ширина, Т.В. Витальный прогноз при увеальной меланоме в отдаленные сроки после лечения. Дис. канд мед наук:14.01.07 / Ширина Татьяна Владимировна. – Москва. -2013. – 143с.

38. Шушанов, С.С. Исследование роли рецепторной тирозинкиназы Flt-4 и ее лиганда VEGF-C в опухолевом росте: Дис.канд. биол. наук: 14.00.14 / Саин Санкенович Шушанов. -М., 2000. -225с.
39. Якимова, М.В. Молекулярные маркеры увеальной меланомы. / М.В. Якимова, Е.Н. Жилиева, А. В. Медведь // Новости хирургии.— 2019.- Т. 27, № 4 – С. 46-47
40. Яровая, В.А. Прогностическое значение клеточного типа увеальной меланомы. / В.А. Яровая, А.В. Шацких, Д.П. Володин, А.А. Яровой // Архив патологии. – 2021. – Т. 83, № 4.- С.14–21.
41. Aalto, Y. Concomitant loss of chromosome 3 and whole arm losses and gains of chromosome 1, 6, or 8 in metastasizing primary uveal melanoma. / Y. Aalto, Y L. Eriksson, S. Seregard, O. Larsson // Invest Ophthalmol Vis Sci – 2001. – Vol. 42, - P. 313-327.
42. Abourbih, DA. Lysyl oxidase expression and inhibition in uveal melanoma. / D.A. Abourbih, S. Di Cesare, M.E.Orellana. // Melanoma Res. – 2010. – Vol. 20 – P. 97–106.
43. Aharonov, O. The role of cytokines in angiogenesis / O. Aharonov, G.Maftzir, G.Ben // Ocular Immunol. Inflamm.-1993.-Vol.34.-P.3199-3206.
44. Al-Jamal, RT. Nucleolar diameter and microvascular factors as independent predictors of mortality from malignant melanoma of the choroid and ciliary body. / RT. Al-Jamal RT, T. Mäkitie, T. Kivelä // Invest Ophthalmol Vis Sci.-2003.- Vol.44 – P. 2381-2389.
45. All-Ericsson, C. Insulin-like growth factor-1 receptor in uveal melanoma: A predictor for metastatic disease and a potential therapeutic target. / C. All-Ericsson, L. Girnita, S. Seregard // Invest Ophthalmol Vis Sci – 2002. – Vol.43 - P.1-8.
46. Alon, T. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity / T. Alon, I.Hemo, A.Itin // Nat. Med.– 1995.–Vol.1.-P.1024-1028.
47. Augsburger, JJ. Clinical prognostic factors in patients with posterior uveal malignant melanoma./ JJ. Augsburger, J.W.Gamel // Cancer.- 1990. – Vol. 66 – P.1596-1600.
48. Baldi, G. Prognostic factors for survival after enucleation for choroidal melanoma. / G. Baldi, F. Baldi // Int. J. Oncol. - 1998-Vol.13, №6. - P.1185-1189.
49. Beran, TM. Reactions to and desire for prognostic testing in choroidal melanoma patients. / T.M. Beran, M.T. Cannel, AL.Stanton // J Genet Couns.-2009. – Vol.18, № 3 – P. 265-274.
50. Bergman, L. Uveal melanoma survival in Sweden from 1960 to 1998. / L. Bergman, S Seregard, B. Nilsson. // Invest Ophthalmol Vis Sci – 2003 – Vol. 44 - P.3282-3287.

51. Berus, T. Clinical, Histopathological and Cytogenetic Prognosticators in Uveal Melanoma. A Comprehensive Review. / T. Berus, A. Halon, A. Markiewicz // *Anticancer Res.*-2017. – Vol. 37- P.6541–6549.
52. Bombail, V. A role for the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha in endometrial stromal cell decidualization and expression of genes implicated in energy metabolism. / V. Bombail, D.A. Gibson, F. Collins. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2010. – Vol. 95, № 10. – E224–8
53. Buder, K. Systemic treatment of metastatic uveal melanoma: Review of literature and future perspectives./K. Buder, A. Gesierich, G. Gelbrich, M. Goebeler. // *Cancer Med* – 2013.-Vol.2 – P. 674-686.
54. Carmeliet, P. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis / P. Carmeliet, R. K. Jain // *Nature.* - 2011. - Vol. 473 — P. 298–307.
55. Chang, AE. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: A summary of 84836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. / A.E. Chang, L.H. Karnell, H.R. Menck // *Cancer.*-1998 - Vol.83- P.1664-1678.
56. Chappell, MC. Uveal melanoma: Molecular pattern, clinical features, and radiation response./ MC Chappell, DH Char, TB Cole. // *Am J Ophthalmol.*- 2012-Vol.154 – P.227-232.e2.
57. Chen, X. Uveal melanoma cell staining for CD34 and assessment of tumor vascularity. / X. Chen, A.J. Maniotis, D. Majumdar, J. Pe'er, R. Folberg. // *Invest Ophthalmol Vis Sci* – 2002- Vol.43 – P.2533-2539.
58. Chong, V. Biological, preclinical and clinical characteristics of inhibitors of vascular endothelial growth factors. // *Ophthalmologica.* - 2012. - Vol. 227, Suppl. 1. - P. 2–10
59. Christina, Herrspiegel. A serum protein signature at the time of Uveal Melanoma diagnosis predicts long-term patient survival. / C. Herrspiegel, F. Plastino, E. Lardner // *Cancer.*- 2023. – Vol. 23, № 1 – P.27
60. Cirillo, D. Leptin signaling in breast cancer: an overview. / D. Cirillo D, A.M. Rachiglio AM, la Montagna R et al. // *J Cell Biochem.* – 2008- vol. 105 - № 4 – P. 956-964.
61. Coleman, DJ,. Noninvasive in vivo detection of prognostic indicators for high-risk uveal melanoma: Ultrasound parameter imaging./ D.J. Coleman, RH. Silverman, M.J. Rondeau // *Ophthalmology.* -2004 – Vol. 111 – P.558-564.
62. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma: V. Twelve-year mortality rates and prognostic factors: COMS report No 28. // *Arch Ophthalmol* – 2006. – Vol. 124 – P.1684-1693.

63. Cook, SA. Psychological aspects of cytogenetic testing of uveal melanoma: preliminary findings and directions for future research./ S.A. Cook, B. Damato, E. Marshall, P. Salmon. *Psychologi// Eye*. – 2009. - Vol. 23, № 3. - P. 581-585.
64. Coupland, S.E. The prognostic value of cyclin D1, p53, and MDM2 protein expression in uveal melanoma. / S.E. Coupland, G. Anastassiou, A. Stang. // *J Pathol*. – 2000. – Vol.191– P.120-126.
65. Coupland, S.E. Expression patterns of cyclin D1 and related proteins regulating G1-S phase transition in uveal melanoma and retinoblastoma. / S.E. Coupland, N. Bechrakis, A. Schüler // *Br. J. Ophthalmol*. – 1998– Vol. 82– P.961–970.
66. Coupland, SE. Routes of extraocular extension of uveal melanoma: Risk factors and influence on survival probability. / SE. Coupland, SE, Campbell I, B. Damato // *Ophthalmology* – 2008. – Vol.115– P. 1778-1785.
67. Dabbs, D.J. *Diagnostic immunohistochemistry*.// Churchill Livingstone, Philadelphia, 2002. – pp.641.
68. Damato, B. A reappraisal of the significance of largest basal diameter of posterior uveal melanoma. /B. Damato, SE. Coupland. // *Eye (Lond)* –2009.– Vol. 23 – P.2152-2160.
69. Damato, B. Multiplex ligation-dependent probe amplification of uveal melanoma: Correlation with metastatic death. / B. Damato, J. Dopierala, A. Klaasen // *Invest Ophthalmol Vis Sci* – 2009– Vol.50 – P.3048-3055.
70. Damato, B. Genotypic profiling of 452 choroidal melanomas with multiplex ligation-dependent probe 102./ B. Damato, J. Dopierala, A. Klaasen. // *Indian Journal of Ophthalmology* – 2010. – Vol. 63, No. 2 – P. 234-240.
71. Damato, B. Cytogenetics of uveal melanoma: A 7-year clinical experience. /B. Damato, C. Duke, S.E. Coupland. // *Ophthalmology* –2007– Vol. 114 – P.1925-1931.
72. De Falco, S. Antiangiogenesis therapy: an update after the first decade / S. De Falco // *The Korean J. of Internal Medicine*. – 2014. – Vol. 29, № 1. – P. 1–11.
73. De Jong, JS. Expression of growth factors, growth inhibiting factors and their receptors in invasive breast cancer./ JS. De Jong, PJ. Van Diest, P. Van der Valk, JPA. Baak // *J. Pathol*.–1998. – Vol.184 – pp. 44–57.
74. Demirci, H. Diffuse iris melanoma: A report of 25 cases. / H. Demirci, C.L. Shields, J.A. Shields. // *Ophthalmology* –2002. – Vol.109 – P.1553-1160.
75. Demirci, H. Ring melanoma of the ciliary body: Report on twenty-three patients. / H. Demirci, C.L. Shields, J.A. Shields // *Retina*. – 2002.– Vol.22 – P.698-706.

76. Diener-West, M. A review of mortality from choroidal melanoma. II. A meta-analysis of 5-year mortality rates following enucleation, 1966 through 1988. / M. Diener-West, BS. Hawkins, J.A. Markowitz, AP. Schachat // Arch Ophthalmol. – 1992. – Vol.110 – P.245-250.
77. Diener-West, M. Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report No 26. / M. Diener-West, SM. Reynolds, D.J. Agugliaro // Arch Ophthalmol –2005. – Vol.123 –P.1639-1643.
78. Dieudonne, MN. Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells. / MN. Dieudonne, F. Machinal-Quelin, V. Serazin-Leroy // Biochem Biophys Res Commun.– 2002.– Vol.293, №1– P.622–628.
79. Djirackor, L. Nestin expression in primary and metastatic uveal melanoma–Possible biomarker for high–risk uveal melanoma. / L. Djirackor, D. Shakir, H. Kalirai, G. Petrovski, S.E. Coupland. //Acta Ophthalmol. –2018.– Vol.96 – P.503–509.
80. Duh, EJ. Long-term survival in a patient with uveal melanoma and liver metastasis. / E.J. Duh, A.P. Schachat, D.M. Albert, S.M. Patel //Arch Ophthalmol. – 2004. – Vol.122 – P.285-287.
81. Economou, MA. Receptors for the liver synthesized growth factors IGF–1 and HGF/SF in Uveal Melanoma: Intercorrelation and Prognostic Implications./ MA. Economou, C. All–Ericsson, V. Bykov //Investig Ophthalmol Vis Sci. – 2005 – Vol. 46, №12 – P. 372–375.
82. Egan, K.M.. An evaluation of the influence of reproductive factors on the risk of metastases from uveal melanoma. / KM. Egan, S.M. Walsh, JM. Seddon, E.S. Gragoudas //Ophthalmology. – 1993–vol. 100 – № 8 – P.1160–1165.
83. Ehlers, JP. Integrative genomic analysis of aneuploidy in uveal melanoma. / JP. Ehlers, L. Worley, MD Onken, JW. Harbour // Clin Cancer Res – 2008. – Vol.14 – P.115-122.
84. Ellerhorst, JA. Promotion of melanoma growth by the metabolic hormone leptin. /JA. Ellerhorst, A.H. Diwan, SM. Dang. //Oncol Rep. – 2010 – Vol. 23, № 4 – P. 901–907.
85. Ellerhorst, JA. Expression of thyrotropinreleasing hormone by human melanoma and nevi. /JA. Ellerhorst, AA. Naderi, MK. Johnson. // Clin Cancer Res. – 2004. – Vol. 10, № 16 – P.5531–5536.
86. Faingold, D., Immune expression and inhibition of heat shock protein 90 in uveal melanoma. / D. Faingold, JC. Marshall, E. Anteck. //Clin. Cancer Res. – 2008. –Vol.14 – P.847–855.
87. Fasshauer, M. Adipokines in health and disease. Trends in pharmacological sciences. /M. Fasshauer, M. Blüher. // Trends Pharmacol Sci – 2015.– Vol.36, № 7 – P. 461–470.
88. Ferrara, N. Angiogenesis as a therapeutic target / N. Ferrara, R. S. Kerbel // Nature.– 2005.– Vol. 438. – P. 967–974.

89. Folberg, R. The morphologic characteristics of tumor blood vessels as a marker of tumor progression in primary human uveal melanoma: A matched case-control study. /R. Folberg, J. Pe'er, LM. Gruman. //Hum Pathol –1992.– Vol.23 – P. 1298-1305.
90. Folberg, R. The microcirculation of choroidal and ciliary body melanomas / R.Folberg, M.Menaffey, M.Lynn Gardner // Eye.–1997.–Vol.11.–P.227–238.
91. Folberg, R. The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma / R. Folberg, V.Rummelt, R. Parys–Van Ginderdeuren // Ophthalmology.–1993.–Vol.100. – P.1389.
92. Folberg, R. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis / R.Folberg, M.J. Hendrix // Am. J. of Pathology.–2000.–Vol.156, № 2.–P.361–371.
93. Folkman, J. Angiogenesis inhibitors generated by tumors / J. Folkman // Mol. Med. Physiol.– 1991.–Vol.1. – P.120–122.
94. Folkman, J. The role of angiogenesis in tumor growth / J. Folkman // Semin. Cancer. Biol.– 1992.–Vol.12, №2.– P.303–324.
95. Folkman, J. Tumor angiogenesis / J.Folkman // Cancer Medicine.– Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1997.– P.181–204.
96. Folkman, J. Whats is evidens that tumours are angiogenesis dependent? / J.Folkman // J. Natl. Cancer. Inst.–1990.–Vol.82–№3.–P.4–6.
97. Foss, A.J. Microvessel count survival in uveal melanoma / A.J.Foss, R.A.Alexander, L.W. Jafferries // Cancer Res.–1996.–Vol.56, №13, – P.2900–2903.
98. Frenkel, S. Insulin-like growth factor-1 as a predictive biomarker for metastatic uveal melanoma in humans. / S. Frenkel, O. Zloto, J. Pe'er, V. Barak // Invest Ophthalmol Vis Sci – 2013.– Vol.54. – P.490-493.
99. Gajdzis, M. Ephrin receptors (EPH): EphA1, EphA5, and EphA7 expression in uveal melanoma–associations with clinical parameters and patient survival. / M. Gajdzis, S. Theocharis , P. Gajdzis /Life. – 2020 –Vol.10 – P.225 -227.
100. Gajdzis, M.. The Prognostic Values of PARP–1 Expression in Uveal Melanoma. / M. Gajdzis, S. Theocharis, J. Klijanienko. // Cells. – 2021. – Vol.10 – P. 285.
101. Gamel, JW. Uveal melanomas: Correlation of cytologic features with prognosis. / L.W. Gamel, IW. McLean, WD. Foster, LE. Zimmerman // Cancer 1978–vol.41–p.1897-1901.
102. Gamel, JW. Biologic distinctions between cure and time to death in 2892 patients with intraocular melanoma. / JW. Gamel, IW. McLean, JB. McCurdy // Cancer. - 1993–Vol.71–P. .2299-2305.

103. Girnita, A. The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor picropodophyllin causes tumor regression and attenuates mechanisms involved in invasion of uveal melanoma cells. / A. Girnita, C. All-Ericsson, MA. Economou. // Clin Cancer Res – 2006. – Vol. 12 – P.1383-1391.
104. Gomez, D. The Liverpool uveal melanoma liver metastases pathway: Outcome following liver resection. /D. Gomez, C. Wetherill, J. Cheong. // J Surg Oncol – 2014.– Vol.109– P.542-547.
105. Gragoudas, ES. Survival of patients with metastases from uveal melanoma. / ES. Gragoudas, KM. Egan, JM. Seddon // Ophthalmology –1991.– Vol. 98 – p.383-389.
106. Greco, I.M. An immunohistochemical analysis of nm23 gene product expression in uveal melanoma. / IM. Greco, G. Calvisi, L. Ventura, F. Cerrito // Melanoma Res. –1997 – Vol. 7 – P.231–236.
107. Grostern, RJ. Absence of type I estrogen receptors in choroidal melanoma: analysis of Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS) eyes. /RJ. Grostern, SI. Shternfeld, SS Bacus // Am J Ophthalmol. – 2001. – Vol.131, № 6. – P.788–791.
108. Gündüz, K. Plaque radiotherapy for management of ciliary body and choroidal melanoma with extraocular extension. / K. Gündüz, CL. Shields, JA. Shields // Am J Ophthalmol – 2000– Vol. 130. – P. 97-102.
109. Gündüz, K. Plaque radiotherapy of uveal melanoma with predominant ciliary body involvement. / K. Gündüz, CL. Shields, JA. Shields // Arch Ophthalmol – 1999. – Vol.117. – P.170-177.
110. Harbour, JW. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. / JW. Harbour, MD. Onken, ED. Roberson // Science – 2010. – Vol. 330 – P.1410 - 1413.
111. Häusler, T. Loss of heterozygosity of 1p in uveal melanomas with monosomy 3. / T. Häusler, A. Stang, G. Anastassiou // Int J Cancer – 2005. – Vol.116 – P.909-913.
112. Christina, Herrspiegel. A serum protein signature at the time of Uveal Melanoma diagnosis predicts long-term patient survival / Christina Herrspiegel, Flavia Plastino, Emma Lardner, Stefan Seregard // BMC Cancer. – 2023 – Vol.23, № 1- P. 27
113. Histopathologic characteristics of uveal melanomas in eyes enucleated from the Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report no 6. // Am J Ophthalmol –1998 – Vol. 125 – P. 745-766.
114. Holly, EA. Uveal melanoma, hormonal and reproductive factors in women./ E.A. Holly, D.A. Aston, D.K. Ahn, J.J. Kristiansen. // Cancer Res – 1991. Vol. 51 – P. 1370-1372.
115. Horsman, DE. Cytogenetic analysis of uveal melanoma. Consistent occurrence of monosomy 3 and trisomy 8q. / DE. Horsman, VA. White // Cancer –1993–Vol. 71 – P.811-819.

116. Huntington, A. A simple cytologic method for predicting the malignant potential of intraocular melanoma. / A. Huntington, P. Haugan, J. Gamel, I. McLean. // *Pathol Res Pract*– 1989–Vol.185–p.631–634.
117. Jampol, LM. The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma: IV. Local treatment failure and enucleation in the first 5 years after brachytherapy. COMS report no 19./ L.M. Jampol, CS Moy, TG. Murray // *Ophthalmology*.– 2002 – Vol.109– P.2197–2206.
118. Jan, G. Rennie Uveal melanoma: tumour phenotype and metastatic potential. // *Eye* –1997– Vol.11– P. 239–242.
119. Jha, J. Prognostic relevance of ATM protein in uveal melanoma and its association with clinicopathological factors. / J. Jha, MK. Singh, L. Singh // *Int. J. Clin. Oncol.* – 2019. – Vol. 24 – P.1526–1535
120. Jiang, Z. PD-1 expression on uveal melanoma induces tumor proliferation and predicts poor patient survival. / Z. Jiang, Y. Yan, J. Dong, L. Duan /// *Int. J. Biol. Markers.* – 2020. – Vol. 35 – P.50–58.
121. Jiang, Z. Upregulation of BCL2 19 kD protein–interacting protein 3 (BNIP3) is predictive of unfavorable prognosis in uveal melanoma. / Jiang Z., Yu F., Li M // *Med. Sci. Monit.*– 2018 – Vol. 24 – P. 4711–4717.
122. Jin, E. Liquid Biopsy in Uveal Melanoma: are we there yet? / Jin E, Burnier JV. // *Ocul Oncol Pathol.* – 2021. – Vol. 7, № 1. – P. 1–16
123. Kaliki, S. Influence of age on prognosis of young patients with uveal melanoma: A matched retrospective cohort study. / S. Kaliki, CL. Shields, A. Mashayekhi, JA. Shields // *Eur J Ophthalmol* – 2013.– Vol. 23 – P.208–216.
124. Karlsson, M. Correlations of Ki-67 and PCNA to DNA ploidy, S-phase fraction and survival in uveal melanoma. // M. Karlsson, D. Boeryd, J. Carstensen. // *Eur J Cancer.* –1996.– Vol. 32A – P. 357–362.
125. Kashyap, S. Prognostic impact of HERC2 protein and pink-eyed dilution protein in uveal melanoma. / S. Kashyap, M.K. Singh, J. Jha, J. Singh / *Hum. Cell.* – 2020. – Vol. 33 – P.1264–1272.
126. Khatib, N. Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule–1 (CEACAM1) in posterior uveal melanoma: Correlation with clinical and histological survival markers. / N. Khatib, J. Pe’er, R. Ortenberg, J. Schachter. // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2011. – Vol. 52 – P. 9368–9372.
127. Kilic, E. Concurrent loss of chromosome arm 1p and chromosome 3 predicts a decreased disease-free survival in uveal melanoma patients. / E. Kilic, NC. Naus, W. van Gils // *Invest Ophthalmol Vis Sci* – 2005. - Vol. 46 – P.2253–2257.

128. Kilic, E. Clinical and cytogenetic analyses in uveal melanoma./ E. Kilic, W. van Gils, E. Lodder // *Invest. Ophthalmol Vis Sci* – 2006. – Vol.47. – P. 3703-3707.
129. Kivelä, T. Microvascular loops and networks in uveal melanoma. /T. Kivelä, T. Mäkitie, RT. Al-Jamal, P. Toivonen. // *Can J Ophthalmol* – 2004. – Vol. 39 – P. 409-421.
130. Kivelä , T. Iris melanomas in children. // *Arch Ophthalmol* – 2001 – Vol. 119. – P.925-926.
131. Kivela, T.,// In: Amin M.B., Edge S., Greene F., Byrd D.R., Brookland R.K., Washington M.K., Gershenwald J.E., Compton C.C., Hess K.R., Sullivan D.C., et al.,// *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Springer Publishing Company; - New York, NY, USA: - 2017. - P. 805–817
132. Kubicka–Trzaska, A., .Pregnancy and the eye. / A. Kubicka–Trzaska, I. Karska–Basta, J. Kobylarz, B. Romanowska–Dixon. // *Klin Oczna*. – 2008. – Vol.110, № 10–12: - P. 401–404.
133. Kujala, E. Very long-term prognosis of , patients with malignant uveal melanoma. / E. Kujala, T. Mäkitie, T. Kivelä // *Invest Ophthalmol Vis Sci* – 2003. – Vol. 44 – P.4651-4659.
134. Kujala, E. Staging of ciliary body and choroidal melanomas based on anatomic extent. / E. Kujala, B. Damato, SE. Coupland // *J. Clin. Oncol*. – 2013 – Vol.31 – P.2825–2831.
135. Lamperska, K. Expression of p16 in sporadic primary uveal melanoma. / K. Lamperska, R. Mackiewicz, A. Kaczmarek. // *Acta Biochim. Pol*. –2002. – Vol.49 - P. 377–385.
136. Lee, CS. Rapid growth of choroidal melanoma during pregnancy. / CS. Lee, WI. Yang, KJ. Shin, SC. Lee // *Acta Ophthalmol*. – 2011- Vol. 89, № 3 - P. 290–291
137. Li, W. Metastatic melanoma death rates by anatomic site after proton beam irradiation for uveal melanoma. / W. Li , ES. Gragoudas, K.M. Egan // *Arch Ophthalmol* –2000 – Vol.118 – P.1066-1070.
138. Lüke, J. CD147 and matrix–metalloproteinase–2 expression in metastatic and non–metastatic uveal melanomas. / J. Lüke, V. Vukoja, T. Brandenbusch. // *BMC Ophthalmol*. –2016– Vol. 16 – P.1–12.
139. Maat, W. Monosomy of chromosome 3 and an inflammatory phenotype occur together in uveal melanoma. / W. Maat, LV. Ly, ES. Jordanova // *Invest Ophthalmol Vis Sci* –2008. – Vol. 49 – P. 505-510.
140. Makitie, T. Comparative immunohistochemical oestrogen receptor analysis in primary and metastatic uveal melanoma. / T. Makitie, A. Tarkkanen, T. Kivela // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. –1998.–Vol.236 – P.415–419
141. Mäkitie, T. Microvascular density in predicting survival of patients with choroidal and ciliary body melanoma. / T. Mäkitie, P. Summanen, A. Tarkkanen, T. Kivelä // *Invest Ophthalmol Vis Sci* – 1999. – Vol. 40 – P.2471-2480.

142. Mäkitie, T. Microvascular loops and networks as prognostic indicators in choroidal and ciliary body melanomas. / T. Mäkitie, P. Summanen, A. Tarkkanen, T. Kivelä // *J Natl Cancer Inst* – 1999 – Vol. 91 – P. 359–367.
143. Makitie, T. Tumor-infiltrating macrophages (CD68<sup>+</sup> cells) and prognosis in malignant uveal melanoma / T. Makitie, P. Summanen, A. Tarkkanen, T. Kivela. // *Invest Ophthalmol Vis Sci* – 2001. – Vol. 42. – P. 1414–1421.
144. Malgorzata, Gajdzis. Novel Prognostic Immunohistochemical Markers in Uveal Melanoma – Literature Review / Malgorzata Gajdzis, Radoslaw Kaczmarek, and Pawel Gajdzis // *Cancers (Basel)*. – 2021 – Vol. 13, № 16 – P. 403.
145. Mallikarjuna, K. Cripto-1 expression in uveal melanoma: An immunohistochemical study. / K. Mallikarjuna, P. Vaijyanthi, S. Krishnakumar / *Exp. Eye Res.* – 2007. – Vol. 84 – P. 1060–1066.
146. Mantovani, A. Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines. // *Lab Invest* - 1994 – Vol. 71, № 1 – P. 5–16
147. Marsh, RD. Placental metastasis from primary ocular melanoma: a case report / / RD. Marsh RD, NM. Chu // *Am J Obstet Gynecol.* – 1996 – Vol. 174, № 5. - P. 1654–1655.
148. Mashayekhi, A. Metastasis from uveal melanoma associated with congenital ocular melanocytosis: A matched study. / A. Mashayekhi, S. Kaliki, B. Walker // *Ophthalmology* – 2013 – Vol. 120 – P. 1465–1468.
149. McLean, IW. Uveal melanoma: Location, size, cell type, and enucleation as risk factors in metastasis. / IW. McLean, WD. Foster, LE. Zimmerman // *Hum Pathol* – 1982 – Vol. 13 – P. 123–132.
150. McLean, IW. Uveal melanoma: The importance of large nucleoli in predicting patient outcome – an automated image analysis study. / IW. McLean, ME. Sibug, RL. Becker, JB. McCurdy // *Cancer* 1997 – Vol. 79 – P. 982–988.
151. Mehmet, Dogrusöz. Prognostic Factors Five Years After Enucleation for Uveal Melanoma. / M. Dogrusöz; NJ. Brouwer; SJ.R. de Geus / *Investigative Ophthalmology & Visual Science* – 2020 – Vol. 61, № 3. – P. 31.
152. Meierjohann, S. Hypoxia-independent drivers of melanoma angiogenesis. // *Front. Oncol.* – 2015. – Vol. 5 – P. 102.
153. Miller, M. Is Uveal Melanoma a Hormonally Sensitive Cancer? A Review of the Impact of Sex Hormones and Pregnancy on Uveal Melanoma. / M. Miller, L. Schoenfield, M. Abdel-Rahman, C.M. Cebulla. // *Ocul Oncol Pathol.* – 2021 – Vol. 7, № 4 – P. 239–250.
154. Mooy, CM. Immunohistochemical and prognostic analysis of apoptosis and proliferation in uveal melanoma. / C.M. Mooy, GP. Luyten GP, PT. de Jong // *Am J Pathol* – 1995. – Vol. 147. – P. 1097–1104.

155. Moshari, A. Uveal melanoma: Mean of the longest nucleoli measured on silver-stained sections. /A. Moshari, IW. McLean // Invest Ophthalmol Vis Sci. –2001. – Vol.42. – P.1160–1163.
156. Mueller, AJ. Imaging the microvasculature of choroidal melanomas with confocal indocyanine green scanning laser ophthalmoscopy. / AJ. Mueller, DU. Bartsch, R. Folberg. // Arch Ophthalmol – 1998. –Vol. 116 – P.31-39.
157. Oba, J. Trends in hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor 1, thyroid-stimulating hormone, and leptin expression levels in uveal melanoma patient serum and tumor tissues: correlation to disease progression. / J. Oba, B. Esmaeli, JA. Ellerhorst //Melanoma Res. –2017. – Vol.27, № 2.– P. 126–133.
158. Onken, MD. Collaborative Ocular Oncology Group report number 1: Prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma. / MD. Onken, LA. Worley, DH. Char. //Ophthalmology – 2012. – Vol. 119.– P.1596-1603.
159. Onken, MD. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. / MD. Onken, LA. Worley, JP. Ehlers, JW. Harbour.//Cancer Res – 2004 – Vol. 64 – P.7205-7209.
160. Onken, MD. A metastasis modifier locus on human chromosome 8p in uveal melanoma identified by integrative genomic analysis. / MD. Onken, LA. Worley, JW. Harbour //Clin Cancer Res – 2008. – Vol. 14. – P.3737-3745.
161. Onken, MD. An accurate, clinically feasible multi-gene expression assay for predicting metastasis in uveal melanoma. / MD. Onken, LA. Worley, MD. Tuscan, JW. Harbour // J Mol Diagn – 2010. – Vol. 12 – P. 461-468.
162. Paraoan, L. Expression of p53-induced apoptosis effector PERP in primary uveal melanomas: Downregulation is associated with aggressive type. / L. Paraoan, D. Gray, P. Hiscott // Exp. Eye Res. – 2006. – Vol. 83. – P.911–919.
163. Parrella P, Sidransky D, Merbs SL. Allelotype of posterior uveal melanoma: Implications for a bifurcated tumor progression pathway. //Cancer Res –1999 – vol. 59 – p.3032-3037.
164. Pe'er, J. PC-10 immunostaining of proliferating cell nuclear antigen in posterior uveal melanoma. Enucleation versus enucleation postirradiation groups. / J. Pe'er , H. Gnessin, Y. Shargal, N. Livni //Ophthalmology –1994. – Vol. 101. – P.56-62.
165. Pe'er, J. Mean of the ten largest nucleoli, microcirculation architecture, and prognosis of ciliochoroidal melanomas. / Pe'er J, Rummelt V, Mawn L, Hwang T, Woolson RF, Folberg R // Ophthalmology. –1994. –Vol. 101.– P.1227-1235.

166. Peichev, M. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. / M. Peichev, AJ. Naiyer, D. Pereira // *Blood*. – 2000. – Vol.95, № 3 – P. 952–958.
167. Petrusch, U. Significance of gene expression analysis in uveal melanoma in comparison to standard risk factors for risk assessment of subsequent metastases. / U. Petrusch, P. Martus, H. Tönnies // *Eye (Lond)* – 2008.– Vol. 22.– P. 997-1007.
168. Pogrzebielski, A. Uveal melanoma in young patients. / A. Pogrzebielski, J. Orłowska-Heitzman, B. Romanowska-Dixon // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. - 2006. –Vol. 244. – P.1646-1649.
169. Prescher, G. Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma./ Prescher, G, N. Bornfeld, H. Hirche.// *Lancet* –1996.– Vol. 347.– P.1222-1225.
170. Rietschel, P. Variates of survival in metastatic uveal melanoma. / P. Rietschel, KS. Panageas, C. Hanlon, A. Patel, D.H. Abramson, PH. Chapman // *J Clin Oncol* – 2005. - Vol. 23 – P. 8076-8080.
171. Rodriguez-Vidal, C. Treatment of metastatic uveal melanoma: systematic review. / C. Rodriguez-Vidal, D. Fernandez-Diaz, B. Fernandez-Marta // *Cancers –Basel*. – 2020 – Vol. 12, № 9 – P.2557.
172. Ronés, B. The prognosis of primary tumors of the iris treated by iridectomy. / B. Ronés, L.E. Zimmerman. // *AMA Arch Ophthalmol* – 1958 – Vol. 60 – P.193-205.
173. Rummelt, V. Relation between the microcirculation architecture and the aggressive behavior of ciliary body melanomas. / V. Rummelt, R. Folberg, RF. Woolson, T. Hwang, J. Pe'er. // *Ophthalmology* –1995 – Vol. 102 – P.844-851.
174. Sahin, A. Expression of vascular endothelial growth factor-A, matrix metalloproteinase-9, and extravascular matrix patterns and their correlations with clinicopathologic parameters in posterior uveal melanomas. /A. Sahin, H. Kiratli, F. Soylemezoglu // *Jpn. J. Ophthalmol*.– 2007 – Vol. 51– P.325–331.
175. Scala, S. CXC chemokine receptor 4 is expressed in uveal malignant melanoma and correlates with the epithelioid-mixed cell type. / S. Scala, C. Ieranò // *Cancer Immunol. Immunother*. – 2007 – Vol. 56 – P.1589–1595.
176. Schilling, H. A histologic study (including DNA quantification and Ki-67 labeling index) in uveal melanomas after brachytherapy with ruthenium plaques. / H. Schilling, KW. Sehu, WR. Lee // *Invest Ophthalmol Vis Sci* – 1997 – Vol. 38- P. 2081-2092.
177. Schoenfield, L. Gender differences and estrogen and progesterone receptor expression in uveal melanoma. / L.Schoenfield, T. Plesec, E. Downs-Kelly. // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2013– Vol. 54. ARVO E-Abstract 4224.

178. Schoenfield, L. Estrogen receptor is expressed in uveal melanoma: a potential target for therapy. / L. Schoenfield, D. Kline, ME. Aronow // *Ocular Oncol Pathol.* – 2021. – Vol. 7.- P. 303–310.
179. Schoenfield, L. Variation of monosomy 3 status within uveal melanoma./L. Schoenfield, J. Pettay, RR. Tubbs, AD. Singh // *Arch Pathol Lab Med* 2009 –Vol. 133 – P.1219-1222.
180. Scholes, AG. Monosomy 3 in uveal melanoma: Correlation with clinical and histologic predictors of survival. / AG. Scholes, B.E. Damato, J. Nunn, // *Invest Ophthalmol Vis Sci* – 2003 – Vol. 44 – P.1008-1111.
181. Seddon, JM. A prognostic factor study of disease-free interval and survival following enucleation for uveal melanoma. / JM. Seddon, DM. Albert, PT. Lavin, N. Robinson // *Arch Ophthalmol* –1983 – Vol. 101 – P.1894-1899.
182. Seddon, JM. Death from uveal melanoma. Number of epithelioid cells and inverse SD of nucleolar area as prognostic factors. / JM. Seddon, L. Polivogianis, CC. Hsieh // *Arch Ophthalmol.* – 1987. – Vol. 105. – P.801-806.
183. Seregard, S. Prognostic indicators following enucleation for posterior uveal melanoma. A multivariate analysis of long-term survival with minimized loss to follow-up. /S. Seregard, E. Kock // *Acta Ophthalmol Scand.* – 1995. – Vol.73. – P.340-344.
184. Sevim DG, Kiratli H. Serum adiponectin, insulin resistance, and uveal melanoma: clinicopathological correlations./ DG. Sevim, H. Kiratli. // *Melanoma Res.* – 2016. – Vol. 26, № 2 – P. 164–167.
185. Shields, CL. Uveal melanoma and pregnancy. A report of 16 cases. / CL. Shields, J.A. Shields, RC. Eagle, P. De Potter, H. Menduke. // *Ophthalmology.* – 1991.– Vol. 98, № 11. –P.1667–1673
186. Shields, CL. Metastasis of uveal melanoma millimeter-by-millimeter in 8033 consecutive eyes./ CL. Shields, M. Furuta, A. Thangappan // *Arch Ophthalmol.* – 2009. – Vol. 127. – P.989-998.
187. Shields, CL. Prognosis of uveal melanoma in 500 cases using genetic testing of fine-needle aspiration biopsy specimens. /CL. Shields, A. Ganguly, CG. Bianciotto // *Ophthalmology.* – 2011. – Vol. 118 – P..396-401.
188. Shields, CL. American Joint Committee on Cancer classification of posterior uveal melanoma (tumor size category) predicts prognosis in 7731 patients. /CL. Shields, S. Kaliki, M. Furuta. // *Ophthalmology.* – 2013. – Vol. 120.– P.2066-2071.
189. Shields, CL. Clinical spectrum and prognosis of uveal melanoma based on age at presentation in 8,033 cases. / CL. Shields, S. Kaliki, M. Furuta, JA. Shields // *Retina* – 2012 – Vol. 32. – P.1363-1372.

190. Shields, CL. Diffuse versus nondiffuse small ( $\leq 3$  MM thickness) choroidal melanoma: Comparative analysis in 1751 cases. The 2012 F. Phinizy Calhoun lecture./ C.L. Shields, S. Kaliki, M. Furuta, JA. Shields.// *Retina*. – 2013. – Vol. 33 – P. 1763-1776.
191. Shields, CL. Association of ocular and oculodermal melanocytosis with the rate of uveal melanoma metastasis: Analysis of 7872 consecutive eyes. / CL. Shields, S. Kaliki, M. Livesey // *JAMA Ophthalmol* – 2013. – Vol.131 – P.993-1003.
192. Shields, CL. American Joint Committee on Cancer (AJCC) classification of iris melanoma is predictive of patient prognosis. Analysis of 452 patients./ CL. Shields, S. Kaliki, A. Peshtani A // *Indian J Ophthalmol*. – 2015. – Vol. 63, № 2 - P. 93–102.
193. Shields, CL. Iris melanoma: Features and prognosis in 317 children and adults. / CL. Shields, S. Kaliki, SU. Shah, JA. Shields // *J AAPOS*.- 2012 – Vol. 16. – P.10-16.
194. Shields, CL. Iris melanoma: Risk factors for metastasis in 169 consecutive patients. / CL. Shields, JA. Shields, M. Materin // *Ophthalmology*.- 2001 – Vol. 108 – P.172-178.
195. Shields, CL. Uveal melanoma in teenagers and children. A report of 40 cases. / CL. Shields, JA. Shields, J. Milite // *Ophthalmology* –1991. –Vol. 98- P.1662-1666.
196. Singh, AD. Lifetime prevalence of uveal melanoma in white patients with oculo (dermal) melanocytosis. / AD. Singh, P. De Potter, BA. Fijal // *Ophthalmology* –1998 – Vol. 105. – P.195–198.
197. Singh, AD. Uveal melanoma: Trends in incidence, treatment, and survival. / A.D. Singh, ME. Turell, A.K. Topham. // *Ophthalmology* – 2011. – Vol. 118 – P.1881-1885.
198. Singh, L. Prognostic significance of PD-1/PD-L1 expression in uveal melanoma: Correlation with tumor-infiltrating lymphocytes and clinicopathological parameters. / L. Singh, MK. Singh, MC. Kenney, MJ. Jager. // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2021. – Vol. 70. – P.1291–1303.
199. Singh, M.K. Does NEMO/IKK $\gamma$  protein have a role in determining prognostic significance in uveal melanoma? / MK. Singh, N. Pushker, R. Meel // *Clin. Transl. Oncol.* – 2018. – Vol. 20 – P.1592–1603.
200. Singh, M.K. Constitutive expression of c-REL in uveal melanoma patients: Correlation with clinicopathological parameters and patient outcome. / MK. Singh, L. Singh, N. Pushker // *Clin. Transl. Oncol.* – 2020. – Vol. 22. – P.1193–1204.
201. Singh, AD. Uveal melanoma in young patients. / AD. Singh, CL. Shields, JA. Shields, T. Sato // *Arch Ophthalmol* – 2000. – Vol. 118. – P.918-923.
202. Sisley, K. Cytogenetic findings in six posterior uveal melanomas: Involvement of chromosomes 3, 6, and 8. / K. Sisley, IG. Rennie, DW. Cottam // *Genes Chromosomes Cancer* –1990 – Vol. 2– P.205-209.

203. Sisley, K. Abnormalities of chromosomes 3 and 8 in posterior uveal melanoma correlate with prognosis. / K. Sisley, IG. Rennie, MA. Parsons, R. Jacques, DW. Hammond, SM. Bell // *Genes Chromosomes Cancer*. – 1997. – Vol. 19. – P.22-28.
204. Swathi, Kaliki. Uveal melanoma: Estimating prognosis of uveal melanoma./ Swathi Kaliki, Carol L, Shields Jerry, A Shields // *Indian Journal of Ophthalmology*. – 2015.– Vol. 63, № 2 – P.93–102
205. The Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS) randomized trial of pre-enucleation radiation of large choroidal melanoma II: Initial mortality findings. COMS report no 10. // *Am J Ophthalmol* – 1998. – Vol. 125- P. 779-796.
206. Tobal, K. Characterization of cellular infiltration in choroidal melanoma. / K. Tobal, K. Deuble, A. McCartney, S. Lightman. // *Melanoma Res*. – 1993. - Vol. 3. - P.63–65.
207. Toivonen, P. Microcirculation and tumor–infiltrating macrophages in choroidal and ciliary body melanoma and corresponding metastases. / P. Toivonen, T. Makitie, E. Kujala, T. Kivela. // *Invest Ophthalmol Vis Sci* – 2004. – Vol.45. – P.1–6.
208. Tschentscher, F. Partial deletions of the long and short arm of chromosome 3 point to two tumor suppressor genes in uveal melanoma. / F. Tschentscher, G. Prescher, DE. Horsman // *Cancer Res* – 2001. – Vol.61 – P..3439-3442.
209. Tschentscher, F. Tumor classification based on gene expression profiling shows that uveal melanomas with and without monosomy 3 represent two distinct entities. /F. Tschentscher, J. Hüsing, T. Hölter // *Cancer Res*. - 2003. –Vol.63. – P.2578-2584.
210. Tura, A. Lower levels of adiponectin and its receptor adipor1 in the uveal melanomas with monosomy–3./ A.Tura, C. Thieme, A. Brosig // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. – 2020. – vol. 61. – P.2134-2138.
211. van den Bosch, T. Chemokine receptor CCR7 expression predicts poor outcome in uveal melanoma and relates to liver metastasis whereas expression of CXCR4 is not of clinical relevance. / T. van den Bosch, AE. Koopmans, J. Vaarwater // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. - 2013 – Vol. 54 – P. 7354–7361.
212. Wan Gils, W. Gene expression profiling in uveal melanoma: Two regions on 3p related to prognosis. / W. van Gils, EM. Lodder, HW. Mensink // *Invest Ophthalmol Vis Sci* – 2008. – Vol. 49. – P.4254-4262.
213. Van der Schaft, D.W.J. Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells. / DWJ. Van der Schaft, REB. Seftor, EA. Seftor / *J. Nat. Cancer Inst*. – 2004. – Vol. 96 – P. 1473–1477.

214. Virgili, G. Incidence of uveal melanoma in Europe. / G. Virgili, G. Gatta, L. Ciccolallo // *Ophthalmology*. - 2007. – Vol. 114 – P.2309-2315.
215. Virgili, G. Survival in patients with uveal melanoma in Europe. / G. Virgili, G. Gatta, L. Ciccolallo // *Arch Ophthalmol* – 2008. –Vol. 126. –P. 1413-1418.
216. Vu, TH. Analysis of inflammatory cells in uveal melanoma after prior irradiation. / TH. Vu, IH. Bronkhorst, M. Versluis, M. Marinkovic, SG. van Duinen // *Invest Ophthalmol Vis Sci* - 2013. - Vol. 54 – P. 360-369.
217. Welchel, J.C. Immunohistochemistry of infiltrating lymphocytes in uveal malignant melanoma. / J.C. Welchel, SE. Farah. // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 1993. – Vol.34. – P. 2603–2606.
218. Werdich, XQ. A review of advanced genetic testing for clinical prognostication in uveal melanoma. / XQ. Werdich, FA. Jakobiec, AD. Singh , IK. Kim . // *Semin Ophthalmol* – 2013. – Vol. 28. – P.361-371.
219. Welchel, JC. Immunohistochemistry of infiltrating lymphocytes in uveal malignant melanoma. / JC. Welchel, SE. Farah, IW. McLean, MN. Burnier // *Invest Ophthalmol Vis Sci* – 1993. – Vol. 34- P. 2603-2606.
220. White, VA. Acquired homozygosity (isodisomy) of chromosome 3 during clonal evolution of a uveal melanoma: Association with morphologic heterogeneity. / VA. White, BK. McNeil, L. Thiberville , DE. Horsman // *Genes Chromosomes Cancer* – 1996. – Vol.15. – P.138-143.
221. White, VA. Correlation of cytogenetic abnormalities with the outcome of patients with uveal melanoma. / VA. White, JD. Chambers, PD. Courtright, WY. Chang, DE. Horsman // *Cancer* –1998 – Vol. 83. – P.354-359.
222. Yamamoto, A. High dose immunoembolization: Survival benefit in patients with hepatic metastases from uveal melanoma. / A.Yamamoto, I. Chervoneva, KL. Sullivan // *Radiology* – 2009. – Vol. 252. – P.290-298.
223. Yang, J. Treatment of uveal melanoma: Where are we now? / J. Yang, DK. Manson, BP. Marr, RD. Carvajal.//*Ther. Adv. Med. Oncol.* – 2018.– Vol.10. – P.167-176.
224. Yavuziyigitoglu, S. Rotterdam Ocular Melanoma Study Group Uveal Melanomas with SF3B1 Mutations: A Distinct Subclass Associated with Late-Onset Metastases. /S. Yavuziyigitoglu, A. Koopmans, R. Verdijk // *Ophthalmology*. – 2016 – Vol. 123, N 5. – P. 1118–1128.
225. Zloto, O. Gender differences in clinical presentation and prognosis of uveal melanoma. / O. Zloto, J. Pe'er, S. Frenkel // *Invest Ophthalmol Vis Sci* – 2013. – Vol. 54. – P.652-656.