

На правах рукописи

Ованесян Владимир Эдуардович

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

3.1.5. Офтальмология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2024

Работа выполнена на кафедре офтальмологии Академии постдипломного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России), г. Москва

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Лихванцева Вера Геннадьевна

Официальные оппоненты:

Саакян Светлана Ваговна – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, начальник отдела офтальмоонкологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Панова Ирина Евгеньевна - доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе СПб филиала Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Государственное Бюджетное Учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского».

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2024 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 68.1.010.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России) по адресу: 125371, Москва, Волоколамское шоссе, д. 91.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, по адресу: 125371, Москва, Волоколамское шоссе, д. 91 и на сайте диссертационного совета <http://medprofedu.ru>
Автореферат разослан «_____» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук,
профессор

Овечкин Игорь Геннадьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень ее разработанности

Увеальная меланома (УМ) составляет 0,5% в спектре опухолей человека и 5% среди меланомы всех локализаций, поэтому по праву считается редкой (Бровкина А.Ф., 2016, Саакян С.В. с соавт. 2022; Амирян А.Г. с соавт, 2017; Панова И.Е., 2021; Мякошина Е.Б., 2022; Shields CL, 2017, 2021; Kivela T., 2017). Ежегодно УМ диагностируют примерно у 7000 человек на земном шаре (Shields С., 2022). Мета-анализ данных свидетельствует о неуклонной тенденции к росту заболеваемости УМ практически во всех регионах мира (Aronow et al., 2018). Американский онкологический регистр SEER (2018), Европейский онкологический регистр EUROCORE (2017), а также мета-анализ 29 исследований, проведенных с 1988 по 2022 г., показали отсутствие улучшений показателей выживаемости и средней продолжительности жизни больных с метастазами УМ (Khoja L., 2022). Брахитерапия и энуклеация признаны эффективными методами локального контроля УМ. Однако выживаемость со дня выявления метастазов составляет 4–15 месяцев (Бровкина А.Ф., Вальский В.В., 2003; Саакян С.В., Ширина Т. В., 2015; Гришина Е.Е., 2019; Назарова В.В., 2019; Панова И.Е., 2021; Krantz В.А., 2017). Между тем, по мнению экспертов, микрометастазы развиваются за 1–5 лет до их обнаружения (Gabriel Velez с соавт, 2021). Это свидетельствует об отсутствии эффективного алгоритма прогнозирования и ранней их диагностики, отсутствии эффективных технологий лечения генерализованных стадий (Саакян С.В., Ширина Т. В., 2012, 2015; Саакян С.В., Амирян А.Г., 2015, 2017; Авакян К.В., 2018; Гришина Е.Е, 2022, Мякошина Е.Б, 2022). Пятилетняя выживаемость больных на разных стадиях заболевания варьирует от 25 до 97% (Shields CL. et al, 2012; Kivela T., 2017) и зависит от сложившегося индивидуального набора факторов риска (Shields CL, Kaliki S., 2017; Singh A., 2015). Неблагоприятными факторами, ведущими к раннему метастазированию при УМ согласно выводам AJCC, признаны поздние стадии заболевания, 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 показатели, ассоциированные с плохой выживаемостью в первые 5 лет после энуклеации, не играют роли в поздние сроки наблюдения. Показано, что после выбывания больных УМ с неблагоприятными характеристиками, ассоциированными с ранней смертностью, остается однородная группа больных, вероятность выживания которых определяется уже другими факторами и закономерностями (гипотеза смещения факторов риска). Таким образом, если ближайший прогноз возможен на основе традиционных предикторов, то отдаленный прогноз весьма проблематичен. Между тем, по результатам опроса 97 % больных УМ хотели бы знать о

риске развития у них метастазов даже в отсутствие возможности улучшения прогноза (Яровая В.А., 2021; Beran T.M., 2009; Cook S., 2009). Степень риска – главная мотивация для пациента, регламентирующая его визиты к врачу для скрининга метастазов. Таким образом, определение степени персонализированного риска развития метастазов способствует ранней диагностике метастазов и своевременному направлению пациента в специализированное учреждение на хирургическое, лучевое лечение (в случае изолированного одиночного метастаза в печени) или таргетную терапию (при множественных полиорганных метастазах).

Свои исследования мы посвятили проверке научной гипотезы, согласно которой рост и метастазирование УМ зависит от ее сосудистой сети (Панова И.Е., 2021; Folberg R 1993; Folkman J. 1997; Ferrara N., 2015). Доказано, что УМ с высоким ангиогенным фенотипом метастазирует быстрее УМ с низким ангиогенным фенотипом (Казиминова Е.Г., 2022). 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 (Foss A.J, 1996).

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.

Основные положения, выносимые на защиту диссертационной работы:

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 (увеличение $\times 400$).

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 ≥ 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 позволяет 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.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертации было последовательное применение методов научного познания. В работе использован комплексный подход к оценке результатов, основанный на применении клинических, инструментальных и морфологических показателей.

Степень достоверности результатов

Степень достоверности результатов исследования основывается на адекватных и апробированных методах сбора клинического материала (220 пациентов), а также на применении современных методов статистической обработки.

Внедрение работы

Результаты диссертационной работы включены в материалы сертификационного цикла и цикла профессиональной переподготовки кафедры офтальмологии АПО ФГБУ ФНКЦ ФМБА (г. Москва).

Апробация и публикация материалов исследования

Материалы работы доложены на научно-практической конференции с международным участием «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии» (31.03-1.02 2023, г. Казань), на международной конференции «Лига молодых офтальмологов» (7.04.2023, г. Уфа); на конференции «Апрельские диспуты» (2023, Москва).

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

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, 6 из них – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ. Поданы 3 заявки на изобретения.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 154 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материал и методы исследований», 3-х глав, отражающих результаты собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 60 рисунками, 85 таблицами. Список литературы содержит 225 источников, из которых 40 - отечественных авторов и 185-иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Целью работы стала разработка прогнозирования клинического течения УМ на основе ИГХ маркеров ангиогенеза. Цель достигали, создавая многомерные линейные регрессионные модели заболевания с формулами для расчета выживаемости и/или срока развития первого метастаза. Работу проводили в 4 этапа.

1 этап. Отбирали клинко-морфологические факторы, сравнивая выживаемость по Каплан-Мейеру среди больных УМ с наличием и отсутствием анализируемого предиктора. В качестве предикторов анализировали: возраст, высоту, диаметр основания и объем УМ, локализацию опухоли, стадию заболевания (8 редакция), эпителиоидный тип строения. Выживаемость по Каплан-Мейеру анализировали только для цензурированных больных.

2 этап. Изучали ангиогенез и его роль в прогнозе УМ. В качестве предикторов оценивали плотность сосудов на единицу площади среза (microvascular density – MVD), а также клеточные (CD34, CD31) и молекулярные ИГХ-маркеры ангиогенеза (VEGF, рецепторы Flk и Flt). Отбирали маркеры, продемонстрировавшие тесную и достоверную связь с прогнозом заболевания.

3 этап. Создавали модели заболевания на основе комбинаций из нескольких предикторов с формулами для просчета выживаемости и срока появления 1 метастаза.

4 этап. Осуществляли поиск альтернативы ИГХ-методу. В этом аспекте анализировали возможности проточной мультиплексной цитофлуориметрии в количественной оценке комплекса молекул, участвующих в ангиогенезе.

Материал и методы исследования

Работа выполнена в период 2020 по 2023гг. на кафедре офтальмологии АПО ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (г. Москва).

Диссертация построена на основе ретроспективного исследования. Клиническим материалом для работы стали архивные данные по 220 больным УМ. Все пациенты получили хирургическое лечение в учреждениях г. Москвы (ЦКБ РАН, МНИИ ГБ РАМН), прослежены от 12 мес. до 20 лет. Дата и причины смерти подтверждены документально Центральным Адресным Бюро и заключениями ПАО.

Больные находились на разных стадиях заболевания (таблица 1): на T1 стадии УМ – 23 пациента, на T2 – 58, на T3 – 84, на T4 – 55. Это позволило оценить прогностическую значимость стадий и подстадий УМ, силу корреляционной связи с прогнозом.

Таблица 1– Распределение пациентов по Т стадиям УМ (8 редакция)

	Стадия заболевания по Т, число больных (%)				
Подстадия	T1	T2	T3	T4	Всего
a	14 (60,9)	46 (79,3)	62 (73,8)	31 (56,4)	153
b	7 (30,4)	10 (17,2)	20 (23,8)	8 (14,6)	45
c	2 (8,7)	2 (3,5)	0 (0,0)	7 (12,7)	11
d	-	-	2 (2,4)	7 (12,7)	9
e	-	-		2 (3,6)	2
Всего:	23	58	84	55	220

Из 220 больных УМ, в 16 случаях меланома развивалась в радужке, не выходя за ее пределы, занимала не более 3-х (стадия T1a, n=12) или 5 часов условного циферблата (T1b, n=4); в 12 случаях опухоль распространялась с прикорневой зоны радужки в угол передней камеры без вторичной гипертензии (T1b, n=12). В 25 случаях бо́льшая часть опухоли проецировалась на цилиарное тело и хориоидею (n=1), 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 – 54,00), что позволило уточнить прогностическую значимость фактора «возраст».

Анализировали тип клеточного строения УМ (таблица 2). В 14 случаях из-за выраженного некроза тип опухоли верифицировать не удалось.

Таблица 2 – Распределение УМ разных клеточных типов по стадиям

Тип клеточного строения	Стадия заболевания по Т, число больных (%)				Всего:
	T1	T2	T3	T4	
Веретенноклеточный А	2 (8,7)	11 (87,5)	15 (17,9)	16 (29,1)	44
Веретенноклеточный В	5 (21,7)	10 (87,5)	20 (23,8)	10 (18,2)	45
Эпителиоидный	16 (69,6)	37 (63,8)	44 (52,4)	20 (36,4)	117
Некротический	0,0	0,0	5 (6,0)	9 (16,4)	14

Всего:	23	58	84	55	220
--------	----	----	----	----	-----

На 21 глазу (9,5 %) с УМ обнаружены эпibuльбарные узлы. В 55 глазах (47,3 %) присутствовала офтальмогипертензия, которая развивалась чаще на поздних стадиях заболевания ($p \leq 0,001$). Оба признака анализировали в качестве клинических факторов риска развития метастазов и ухудшения выживаемости.

В диагностике и лечении больных УМ руководствовались Федеральными клиническими рекомендациями (код МКБ: С69.3; С69.4 и С69.8) (№17/2-3-4 от 10 апреля 2020 г). В 16 случаях была выполнена блокэксцизия опухоли в объеме иридэктомии, в 26 – иридоциклэктомия (Т1b) и в 1 случае – иридоциклхориоидэктомия ($n=43$). У 172 пациентов выполнили энуклеацию глаза с УМ. В 5 случаях из-за прорастания опухолью фиброзной оболочки глаза и выхода в орбиту проводили экзентерацию.

Данные, подкрепленные запросами ЦАБ, позволяли удлинить сроки наблюдения и проанализировать маркеры во взаимосвязи с ранними и поздними сроками наблюдения. Медиана наблюдения составила 108 мес.

Морфологические методы исследования

УМ верифицировали гистологически. Энуклеированные глаза с меланомой, фиксировали в 10 % формалине, обезвоживали в спиртах, заливали в парафин. Готовили срезы толщиной 3-5 микрон, окрашивали гематоксилином-эозином. Просмотр препаратов и фоторегистрацию осуществляли под микроскопом Axioplan-2 («Zeiss», Германия). Использовали ув. $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$. В соответствии с классификацией ВОЗ (4-е издание, 2018 г.), выделяли эпителиоидноклеточную и веретенкоклеточную меланому типов А и В.

Анализировали плотность сосудов в УМ (маркер MVD), выделяя 3 степени: 1 степень присваивали при визуализации 1–2 сосудов; 2 степень – при окраске 3–9 сосудов; 3 – при окраске ≥ 9 сосудов в 10 полях зрения при ув. $\times 400$) (Folberg R, 1993).

Выполняли ИГХ исследования с маркерами (АТ) к эндотелиальным клеткам (ЭК) CD31 и CD34 (фирма-производитель DAKO), к молекуле VEGF и ее рецепторам Flt-1 и Flk-1 (фирма-производитель Santa Cruz Biotech) в рекомендуемых разведениях по стандартной технологии (С.В. Петров, Н.Т. Райхлин; 2004 г). Результаты оценивали с помощью микроскопа («Carl Zeiss», Германия; ув. $\times 400$). Использовали количественные и полуколичественные методы оценки ИГХ. Оценивали количество ИГХ-окрашенных клеток на срезе УМ (в процентах от общего), интенсивность окраски (4 градации) и место окрашивания (ядро, цитоплазма, мембрана). УМ, окрашенные маркерами CD34 или CD31, градируют на 3 степени по васкуляризации: 1 степень присваивали при окраске 1–2 сосудов; 2 степень - 3–9 сосудов; 3 – при окраске 9 и более сосудов в 10 полях зрения (ув. $\times 400$) (Foss AJE, 1996).

Объектом ИГХ-исследований служили 98 из 220 архивных блоков, отобранных по причине хорошей сохранности тканей. Морфологические и ИГХ-исследования выполнены канд.мед наук О.А. Ануровой.

Иммунологические методы исследования

В поиске альтернативы ИГХ-методу анализировали возможности проточной мультиплексной цитофлуориметрии. С этой целью сразу после энуклеации забирали 50 мкл стекловидной жидкости (СТЖ) из 9 глаз с УМ в пробирку и замораживали до дня исследования. В СТЖ определяли концентрацию 8 факторов роста, участвующих в ангиогенезе. Использовали тест-систему BD Cytometric Bead Array (США) и проточный цитофлуориметр (FACS Canto II, Beckton Dickinson, США). Концентрацию белков определяли с помощью бус, покрытых АТ к ИЛ-8, ангиогенину, ФНО α , ИФН α , ИФН γ , VEGF, bFGF, TGF β . Положение бус оценивали флуоресцентными красителями APC и APC-Cy7; концентрацию антигена (АГ) оценивали по интенсивности флуоресценции по каналу красителя.

Исследования выполняли в лаборатории клинической иммунологии и изучения ангиогенеза ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта (рук. – проф. Сельков С.А.)

Статистические методы анализа

Результаты анализировали с помощью пакетов прикладных статистических программ SAS и SPSS. Для показателей, измеренных по интервальной (количественной) шкале, рассчитывали среднее значение, среднеквадратическое отклонение и ошибку среднего. 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. 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.

Результаты работы и их обсуждение

УМ-специфическая выживаемость коррелировала с **возрастом**. Выделяли 5 подгрупп. В 1 подгруппу вошли больные от 20 до 35 лет, во 2 – от 36 до 45; 3 – от 46 до 60; 4 – от 61 до 75; 5 подгруппу – 75⁺ лет. Худшая выживаемость была в возрасте 75+ лет. Так, к 60 месяцам

наблюдения в 5 подгруппе (75⁺ лет) осталось всего 38% больных, остальные выбыли по причине УМ-ассоциированной смерти. К этому сроку в подгруппе 1 (от 20 до 35 лет) не произошло выбывания пациентов, а в подгруппе 2 (от 35 до 45 лет) выбыло 18% ($p < 0,01$). Кривые на рисунке 1 наглядно демонстрируют высоко сопряженную связь возраста с выживаемостью ($p < 0,01$).

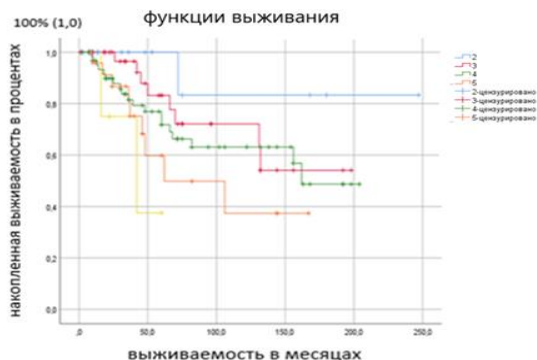


Рисунок 1 – График выживаемости по Каплан-Мейеру в зависимости от возраста. 1 подгруппа – от 20 до 35 лет (голубая линия); 2 – от 36 до 45 лет (красная линия); 3 – от 46 до 60 лет (зеленая линия); 4 – от 60 до 75 лет (оранжевая линия); 5 подгруппа – 75⁺ лет (желтая линия). По оси Y – выживаемость в процентах. По оси X – выживаемость в месяцах.

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

Кривые выживаемости по Каплан-Мейеру на рисунке 2 демонстрируют достоверные различия в подгруппах с разной **высотой УМ**. К 5 годам наблюдения выживают всего 42,9 % больных УМ с $h > 15$ мм против 72,6 % при h от 6,1 до 9 мм ($p < 0,05$). Межгрупповые различия в средних сроках выживаемости свидетельствуют о том, что 6 подгруппа сопряжена с наибольшим риском короткой выживаемости: $91,0 \pm 30,2$ мес. против $174,5 \pm 11,5$ мес. во 2 подгруппе ($p \leq 0,01$).

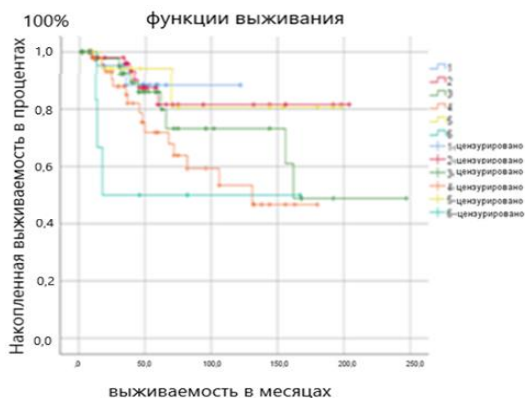


Рисунок 2 – График выживаемости по Каплан-Мейеру в зависимости от высоты УМ: 1 подгруппа ($h \leq 3$ мм, синяя линия), 2 подгруппа (h от 3,1 до 6,0 мм, красная линия), 3 (от 6,1 до $\leq 9,0$ мм, зеленая линия); 4 (от 9,1 до $\leq 12,0$ мм, оранжевая линия); 5 (от 12,1 до $\leq 15,0$ мм, желтая линия); 6 подгруппа (≥ 15 мм, голубая линия). По оси Y – выживаемость в процентах. По оси X – время в месяцах.

Оценивали роль наибольшего **диаметра основания**. В 1 подгруппу вошли опухоли с диаметром основания ≤ 3 мм, во 2 подгруппу – от 3,1 до 6,0 мм, в 3 – от 6,1 до 9,0 мм, 4 подгруппу – от 9,1 до 12,0 мм, 5 подгруппу – от 12,1 до 15,0 мм, 6 – от 15,1 до 18,0 мм и 7 подгруппу – от 18,1 мм. В сроки наблюдения до 5 лет выявлена четкая закономерность между наибольшим диаметром основания УМ и выживаемостью (рисунок 3).

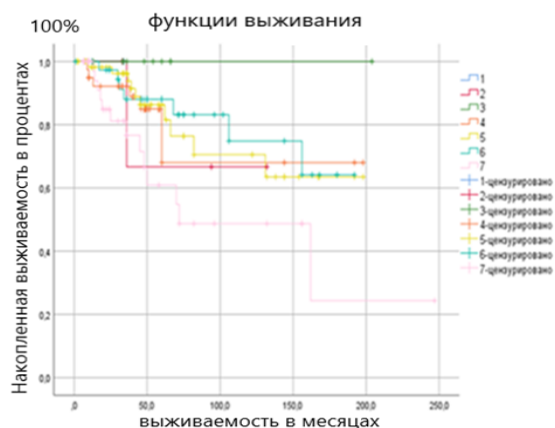


Рисунок 3 – График выживаемости по Каплан-Мейеру в зависимости от диаметра основания УМ. 1 подгруппа (≤ 3 мм основание, синяя линия), 2 (от 3,1 до $\leq 6,0$ мм, красная линия), 3 (от 6,1 до $\leq 9,0$ мм, зеленая линия); 4 (от 9,1 до $\leq 12,0$ мм, оранжевая линия); 5 (от 12,1 до $\leq 15,0$ мм, желтая линия); 6 (15,1 до $\leq 18,0$ мм, голубая линия, 7 ($\geq 18,1$ мм) фиолетовая линия. По оси X – время наблюдения в мес., по оси Y – выживаемость в процентах.

На отдаленных сроках наблюдения (>150 мес.) из-за малого количества выживших в подгруппе 7 маркер стал малопригоден для прогнозирования ($p=0,099$). К тому же, кривые других подгрупп проходили очень близко друг к другу.

Анализировали выживаемость при УМ в зависимости от **Т стадии** (8 редакция). Кривые выживаемости (рисунок 4) демонстрируют ускоренное выбывание пациентов по причине УМ-ассоциированной смертности на Т4 стадии по сравнению с Т3. К 180 мес. наблюдения (15 лет) выжило 30% больных с Т4 стадией (зеленая линия) против 56 % больных с Т3 ($p<0,05$). Достоверны различия и в средних сроках выживаемости: $130,9 \pm 19,9$ мес. против $140,6 \pm 11,2$ мес. ($p<0,05$).



Рисунок 4 – График выживаемости по Каплан-Мейеру на разных стадиях заболевания (2-3-4 стадии). Стадия 2 – голубая линия, 3 – красная линия, 4 – зеленая линия. По оси X – сроки наблюдения в месяцах. По оси Y – кумулятивная выживаемость в процентах.

Анализировали выживаемость в зависимости от **клеточного строения** УМ (рисунок 5). Показатели выживаемости пациентов с эпителиоидным и веретенноклеточным типом В достаточно близки – менее 50 % пациентов в обеих группах имели сроки дожития более 150 месяцев (13 лет). Близкое распределение в отдаленные сроки не позволяет надеяться на высокую достоверность, информативность и надежность этого персонализированного показателя в качестве предиктора отдаленного прогноза.



Рисунок 5 – График выживаемости при разных типах клеточного строения УМ: веретенноклеточный тип А (голубая линия), веретенноклеточный тип В (зеленая линия) и эпителиоидный тип (красная линия). По оси Х – сроки наблюдения в месяцах. По оси Y – кумулятивная частота выживаемости в процентах.

Фактор локализации имел для нас особый интерес. Согласно анатомии, сосудистая оболочка глаза делится на 3 части: хориоидею, цилиарное тело и радужку. Соответственно, опухоли, развившиеся в этих компартментах, подразделяют на меланому радужки (МР), цилиарную меланому (ЦМ) и меланому хориоидеи (МХ). ЦМ признана независимым фактором высокого риска, а МР – низкого риска метастазирования (уровень доказательности AJCC: I). Мы не исключали, что меланома других областей сосудистой оболочки обладает своим потенциалом. Анализировали этот фактор с разных сторон: оценили его потенциал в случае исходного развития ее в радужке и вращая в ЦТ (*1 вариант*), в случае изолированной ЦМ (*2 вариант*), в случае распространения из ЦТ в сторону экватора (*3 вариант*), меланомы, развившейся на экваторе без распространения в ЦТ (*4 вариант*), а также в случае, когда МХ развивается позади экватора и растет в сторону ДЗН, не достигая ДЗН (*5 вариант*), когда МХ распространяется с периферии к заднему полюсу и достигает ДЗН (*6 вариант*) и когда развивается юкстапапиллярно вокруг ДЗН (*7 вариант*). Заметим, 1, 2, 3 и 4 варианты УМ входят в подгруппу презэкваториальных (см. рисунок 1), в 1, 2 и 3 варианте вовлечено ЦТ, в 4-м – не вовлечено. Варианты 4, 5, 6 и 7 – постэкваториальные меланомы, из них только 6 и 7 касаются ДЗН (рисунок 6).



Рисунок 6 – Возможные места развития УМ и их распределение на подгруппы с учетом фактора «локализация» при анализе выживаемости по Каплан-Мейеру.

Юкстапапиллярную УМ анализировали отдельно, оценивая ее потенциал. Локализацию уточняли морфометрически по месту проекции максимальной толщины опухоли. Анализировали сравнительную выживаемость по Каплан Мейеру в подгруппах с ЦМ, презэкваториальной, экваториальной, постэкваториальной и юкстапапиллярной МХ,

противопоставляя каждую из выделенных подгрупп объединенной подгруппе с опухолями всех других локализаций, исключив из нее МР.

Кривая на рисунке. 7 в *первые 60 мес. наблюдения* (5 лет) демонстрирует равномерное выбывание больных с ЦМ и в объединенной группе больных УМ. Недостоверные различия начинают проявляться в отдаленные сроки наблюдения (120 мес.).

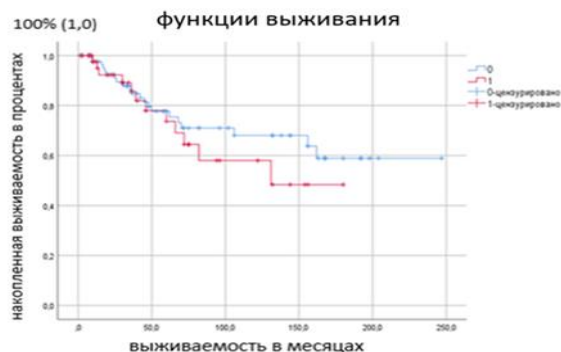


Рисунок 7 – График выживаемости по Каплан-Мейеру у больных с цилиарной меланомой (красная линия) в сравнении с УМ всех других локализаций без меланомы радужки. По оси X – сроки наблюдения в месяцах. По оси Y – кумулятивная выживаемость в процентах.

Выделение *преэкваatorialной УМ* (рисунок 8) оказалось значимым в отдаленном прогнозе. Различия в выбывании преэкваatorialной УМ от УМ всех других локализаций начинали проявляться к 50 мес. наблюдения (5 лет), достигая пика к 156 мес. (13 лет) ($p \leq 0,001$).



Рисунок 8 – График выживаемость по Каплан Мейеру преэкваatorialной УМ (красная линия) в сравнении с УМ всех других локализаций (синяя линия) без меланомы радужки. По оси X – сроки наблюдения в месяцах. По оси Y – кумулятивная выживаемость в процентах.

Экваatorialная УМ имела свой отягощающий потенциал (рисунок 9). Различия в выбывании начинали проявляться уже после 5 лет наблюдения.

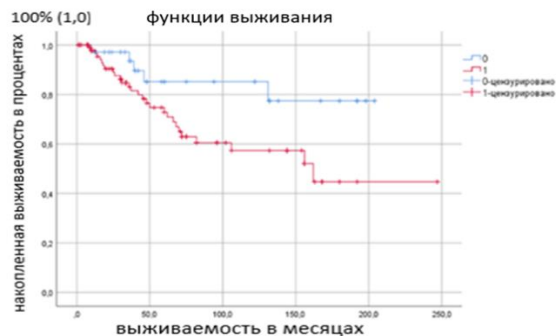


Рисунок 9 – График выживаемости по Каплан-Мейеру при экваatorialных УМ (красная линия) и УМ всех других локализаций (синяя линия) без меланомы радужки. По оси X – сроки наблюдения в месяцах. По оси Y – кумулятивная частота выживаемости в процентах.

Кривые выживаемости на рисунке 10 наглядно демонстрируют лучшую выживаемость постэкваatorialной УМ (красная линия) по сравнению с УМ других локализаций в отдаленные сроки наблюдения. Различий появляется спустя 15 лет наблюдения ($p < 0,05$).

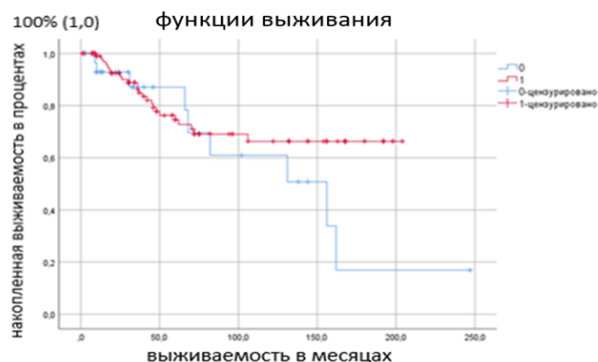


Рисунок 10 – График выживаемости по Каплан-Мейеру при постэкваториальной УМ (красная линия) и УМ других локализаций (голубая линия) без меланомы радужки. По оси X – сроки наблюдения в месяцах. По оси Y – кумулятивная выживаемость в процентах.

Выживаемость больных юкстапапиллярной МХ была более «благоприятной» (рисунок 11). В первые 50 месяцев скорость их выбывания не отличалась от других локализаций, затем до 200 месяцев происходила стабилизация. К этому сроку наблюдения выжило 80% пациентов с юкстапапиллярной МХ против 18% в группе сопоставления ($p=0,002$).

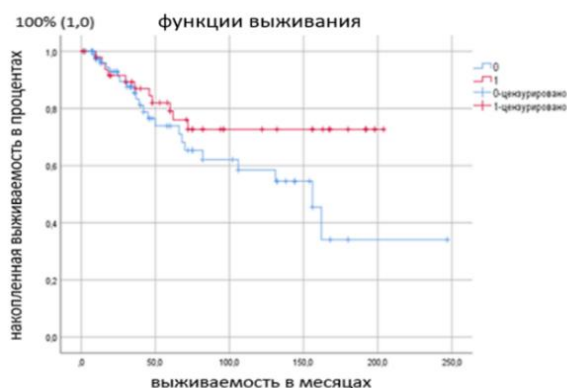


Рисунок 11 – График выживаемости по Каплан-Мейеру больных с юкстапапиллярной меланомой (красная линия) и УМ всех других локализаций без меланомы радужки. По оси X – сроки наблюдения в месяцах. По оси Y – кумулятивная выживаемость в процентах.

Средние показатели и медиана выживаемости, представленные в каждой из выделенных подгрупп, подтвердили более злокачественное течение ЦМ, по сравнению с УМ, развившимися на экваторе и постэкваторе (таблица 3). Для юкстапапиллярной меланомы, напротив, эти показатели оказались более высокими ($p<0,05$).

В качестве клинического фактора риска, ассоциированного с прогнозом УМ анализировали офтальмогипертензию. Среднее время дожития больных УМ без офтальмогипертензии составило 181 мес (15 лет, 95 % ДИ: 157-205 мес.) против 97 мес. (8 лет, 95 % ДИ: 68-126 мес.) при офтальмогипертензии. Медиана дожития при офтальмогипертензии составила 60 мес. (5лет) (95 % ДИ: 35-85 мес.), в то время как у 60 % пациентов с отсутствием офтальмогипертензии время дожития превысило 20 лет (рисунок 12, $p<0,0005$).

Таблица 3 – Средние значения и медиана выживания у больных УМ разных локализаций

Локализация	Среднее ^а				Медиана			
	Оценка	Станд. ошибка	95% ДИ		Оценк а	Станд. ошибк а	95% ДИ	
			Нижняя граница	Верхняя граница			Нижняя граница	Верхняя граница
	Цилиарная меланома							
-	174,4	13,0	148,9	199,9	.	.	.	.
+	120,3	13,1	94,6	146,1	131,0	40,6.	39,2.	180,0.
	Презэкваториальная меланома хориоидеи							
-	178,8	9,6	160,1	197,5	.	.	.	.
+	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	.	.	.	.
+	151,1	13,8	123,9	178,2	162,0	43,0	77,8	246,2
	Постэкваториальная меланома хориоидеи							
-	130,2	21,	89,1	171,4				
+	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				
+	159,4	11,7	136,6	182,2	155,0	24,9	107,3	204,7



Рисунок 12 – График выживаемости по Каплан-Мейеру больных с офтальмогипертензией (квадрат+линия) и без офтальмогипертензии (кружок+ линия). По оси Х – сроки наблюдения в месяцах. По оси Y – кумулятивная выживаемость в процентах.

Связь факторов риска с прогнозом представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Коэффициенты корреляции клинико-морфологических маркеров с прогнозом

Маркер	Коэфф. корреляции с прогнозом, достоверность p			
	Выживаемость ≤ 12 мес	Выживаемость ≤ 36 мес	Выживаемость 5 лет	Выживаемость ≥10 лет
Возраст	-0,296, p=0,04	-0,258; p=0,025	-0,189, p=0,005	-0,255, p=0,05
Стадия Т (8 редакция)	0,299, p=0,0001	0,275, p=0,0012	0,200, p =0,005	-0,224, p=0,001
Стадия Т4	0,177, p=0,005	0,200, p=0,005	-0,640, p=0,063	-0,725, p=0,03
Учет стадии и подстадии Т	0,293, p=0,001	0,175; p=0,013	0,197; p =0,005	0,164;p =0,020
Высота УМ	0,323, p=0,001	0,171, p=0,02	0,449, p<0,05	-0,171, p=0,02
Диаметр основания	0,146, p=0,03	0,187, p=0,008	-0,197, p=0,005	-0,201, p=0,027
<i>Локализация УМ</i>				
Радужка	-0,118, p=0,08	-0,023, н/д	-0,046, н/д	-0,032, 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
Преэквадриальная	-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
Постэквадриальная	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
Офтальмогипертензия	0,408, p=0,003	-0,223, p=0,01	-0,247, p<0,08	-0,175, p=0,089

Предикторы отдаленного прогноза искали среди показателей ангиогенеза. Исследования шли в 3 этапа.

На *первом этапе* изучали ангиогенез в УМ гистологическими методами, подсчитывая среднее количество сосудов на единицу площади в зоне просмотра (при ув. × 400). Использовали 3 градации MVD (1-2-3) (рисунок 13).

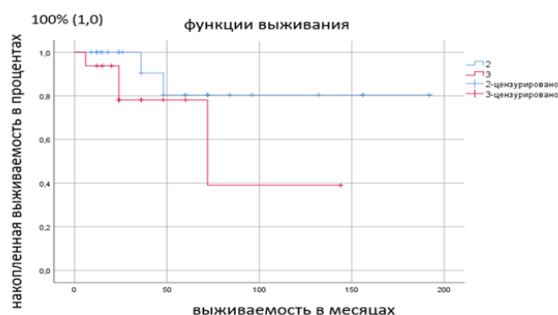


Рисунок 13 – Кривые выживаемости по Каплан-Мейеру при 2 (синяя линия) и 3 (красная линия) типе васкуляризации (по MVD). По оси X – отложено время в месяцах, а по оси Y – вероятность или функция выживаемости.

При 1 типе MVD метастазы не развивались, выбытия не происходило. При 2 типе сроки дожития были длиннее: $162,7 \pm 13,2$ мес. против $88,5 \pm 22,3$ мес. при 3 типе MVD ($p < 0,05$).

В 33% случаев определить тип васкуляризации MX по MVD на световом уровне не представлялось возможным из-за выраженной компрессии сосудов опухолевыми клетками. В связи с этим скрытые опухолевые сосуды визуализировали ИГХ- маркерами CD31 и CD34. Информативность интенсивности экспрессии CD34 в качестве маркера витального прогноза уточняли, сравнивая выживаемость при слабой экспрессии (10 человек, голубая линия) с выживаемостью больных с умеренной и выраженной экспрессией CD34 (25 человек, красная линия) в MX. Из приведенного на рисунке 14 графика видно, что при слабой экспрессии CD34 выживаемость пациентов с MX составила 90 % к 5 годам наблюдения, а при выраженной экспрессии – 10 %.

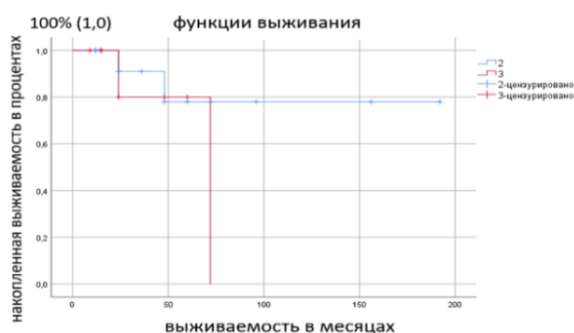


Рисунок 14 – График выживаемости по Каплан-Мейеру при разных типах экспрессии маркера CD34. По оси X – отложено время в месяцах, а по оси Y – функция выживаемости.

Маркер CD31 уступал CD34 в чувствительности и специфичности ИГХ-визуализации сосудов. CD31 не окрашивал сосуды с нарушением монослоя эндотелия и фенестрацией сосудистой стенки. Между тем известно, что ангиогенез в опухоли – непрерывный циклический процесс, во время которого зрелые сосуды сосуществуют с незрелыми, пребывающими на стадии «сборки» и характеризующимися неполной выстилкой стенки ЭК. Это снижает чувствительность ИГХ-окрашивания CD31.

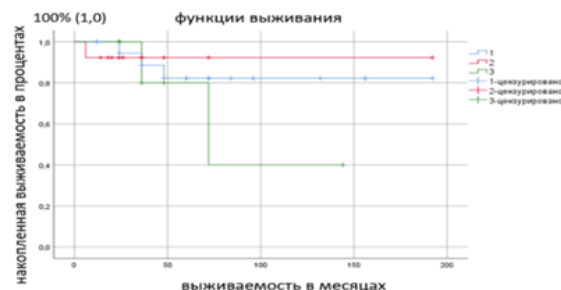


Рисунок 15 – График выживаемости по Каплан-Мейеру при разных ИГХ-типах экспрессии CD31. По оси X – отложено время в месяцах, а по оси Y – функция выживаемости.

Кривые выживаемости (рисунок 15) демонстрировали ускоренное выбывание больных с 3 типом ИГХ-экспрессии CD31 (зеленая линия) в первые 60 мес. наблюдения. Так, к 5-летнему сроку вышло 60 % больных с 3 типом, в то время как больных со 2 типом (голубая линия) – только 18 %, а с 1 типом – 8 %.

И, наконец, оба маркера – CD31 и CD34 – не помогали верифицировать сосуды УМ, сформированные по типу васкулогенной мимикрии, при которой сосудистая стенка была образована опухолевыми клетками. Мы полагали, что в таких случаях будут полезны не клеточные, а молекулярные маркеры ангиогенеза: VEGF, Flt и Flk.

В связи с этим мы перешли на второй ИГХ-уровень исследований – количественной и полуколичественной оценки ИГХ-экспрессии молекул ангиогенеза VEGF, Flt и Flk.

Ключевую молекулу VEGF экспрессировали 2 популяции клеток – опухолевые (ОК) и эндотелиальные (ЭК). Этот феномен рассматривали как две различные характеристики. Мы изучили и описали закономерности экспрессии VEGF на разных стадиях УМ, а также оценили силу связи между ИГХ показателями с одной стороны, и клинικο-морфологическими показателями, с другой. Корреляционная связь экспрессии VEGF ОК с клеточным строением УМ, а также прямая связь экспрессии VEGF ЭК сосудов со стадией заболевания позволяют думать о важной роли этого феномена в выживаемости. Однако этот аспект требовал отдельного изучения.

Роль **экспрессии VEGF** (интенсивность или количество VEGF + ОК в УМ) в прогнозе заболевания анализировали по Каплан–Мейеру (рисунок 16). Оценивали $>50\%$ VEGF⁺ ОК против $\leq 50\%$ VEGF⁺ ОК УМ (1 маркер).

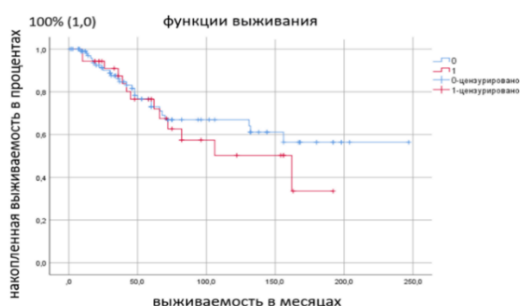


Рисунок 16 – График выживаемости по Каплан-Мейеру в группе А ($\leq 50\%$ VEGF+клеток в УМ, синяя линия) и группе Б ($> 50\%$ VEGF+ клеток в УМ, красная линия). По оси Х – отложено время в месяцах, а по оси Y – функция выживаемости.

Кривые выживаемости на рисунке 16 демонстрируют факт, что половина пациентов с $>50\%$ экспрессии VEGF⁺ в ОК умерли за 10 лет наблюдения, в то время как при VEGF $\leq 50\%$ смертность составила только 25 %. Различия в выбывании проявлялись с 5 лет: в группе В (красная линия) больные начинали стремительно выбывать, в группе А (синяя линия) после 12,5 лет процесс УМ-специфической смертности практически прекращался. К 16,5 годам различия стали достоверными ($p < 0,05$).

Мы проанализировали показатели выживаемости по Каплан-Мейеру у больных с $\leq 30\%$ VEGF⁺ ЭК в сосудах УМ и $> 30\%$ VEGF⁺ ЭК (рисунок 17). 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 сосудов УМ, среднее время наблюдения за ними составило $104,0 \pm 6,0$ месяцев; 18 из них выбыли по причине УМ-ассоциированной смерти. Группу В

составили 26 человек с экспрессией VEGF >30 % ЭК в сосудах УМ; из них 6 умерло от генерализации при средних сроках наблюдения $193,5 \pm 25,0$ месяца. Анализ 5-летней выживаемости по Каплан–Мейеру не показал значимых межгрупповых различий.

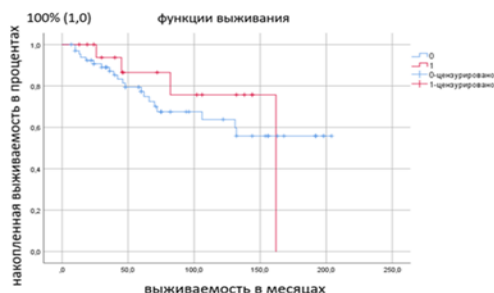


Рисунок 17 – График выживаемости по Каплан-Мейеру в группе А (≥ 30 % VEGF+ЭК в УМ, синяя линия) и группе Б (< 30 % VEGF+ЭК в УМ, красная линия). По оси X – отложено время в месяцах, а по оси Y – функция выживаемости.

Мы дополнили этот маркер офтальмогипертензией. Средние сроки дожития в группе А в отсутствие офтальмогипертензии и ≤ 30 % VEGF+ЭК в УМ составили 158,8 мес. против 88,9 мес. в группе с > 30 % VEGF+ЭК и наличием офтальмогипертензии ($p \leq 0,001$). Таким образом, маркер > 30 % VEGF+ЭК потенциально был пригоден для формирования регрессионной модели заболевания и отдаленного (более 5 лет) прогноза УМ.

Анализировали экспрессию рецептора Flt в цитоплазме (отрезная точка > 50 % Flt_C+ клеток). Кривые выживаемости (рисунок 18) были близки до 100 мес. Затем в 1 группе (экспрессия ≤ 50 % Flt_C+, синяя линия) процесс выбывания прекратился до 16,5 лет, в то время как во 2 группе (экспрессия > 50 % Flt_C+, красная линия) до этого срока дожили только 45 % пациентов ($p = 0,03$). Таким образом, > 50 % Flt_C+ клеток можно рассматривать как фактор, влияющий в отдаленном периоде.

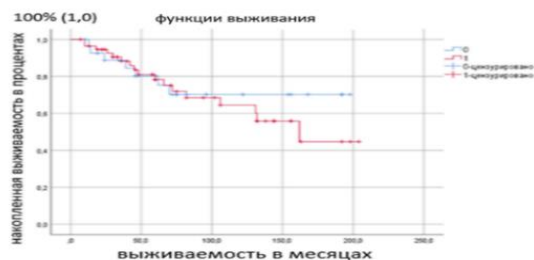


Рисунок 18 – График выживаемости по Каплан-Мейеру среди пациентов с ≤ 50 % Flt_C+ (синяя линия) и больных > 50 % Flt_C+ (красная линия). По оси X – отложено время в месяцах, а по оси Y – функция выживаемости.

Рецептор Flk-KDR-1 – вторая сигнальная молекула, без которой невозможен ангиогенез. Установлено, что экспрессия > 50 % Flk+ ЭК в УМ влияет на выживаемость. Выделены 2 подгруппы: у 75 (87%) процент Flk+ ЭК УМ был ≤ 50 %, у 11 пациентов (13 %) процент Flk+ ЭК в УМ был > 50 %. В обеих группах имела место УМ-специфическая смертность. Межгрупповая разница недостоверна. Однако в 1 группе время дожития составило 138,9 мес. (95 % ДИ 120; 158), во 2-й – 165 месяцев (95 % ДИ 117; 212) ($p < 0,01$). Кривые выживаемости до 70 мес. были близки. Затем до конца срока наблюдения в 1 группе (> 50 % Flk+) выживших осталось 50 %, а во 2 группе (≤ 50 % Flk+) функция выживания не менялась. Таким образом, процент экспрессии Flk+ клеток в УМ можно рассматривать как

фактор, влияющий на прогноз. Маркер >50 % Flk⁺ ЭК в УМ подтвердил свое значимое влияние на время дожития больного в комбинации с офтальмогипертензией (p <0,05).

В таблице 5 приведены корреляции маркеров ангиогенеза с прогнозом.

Таблица 5 – 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<0,05	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
+++ экспрессия VEGF+ ОК	-0,183, p<0,01	-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 % Flt C+ ОК	-0,181, p≤0,01	-0,258, p≤0,001	-0,387, p≤0,001	-0,264, p≤0,001
+ экспрессия Flt C	-0,192, p≤0,01	-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
+++ экспрессия Flt N	-0,180, p=0,011	-0,251, p=0,05	-0,361, p=0,001	-0,225, p≤0,001
≥ 50 % Flk+ ЭК	-0,180, p≤0,01	-0,148, p≤0,05	-0,424, p<0,001	-0,293, p<0,001
+++ и ++ экспрессия Flk	0,341, p≤0,001	0,231, p<0,05	0,177, p=0,089	0,148, p=0,09

Таким образом, был подтвержден потенциал ИГХ-маркеров ангиогенеза в прогнозе УМ. На основании просчитанной корреляционной связи маркеров нами были разработаны 4 простые, надежные и удобные для практического применения формулы расчета выживаемости (см практические рекомендации).

В качестве альтернативы ИГХ анализировали проточную цитофлуориметрию, позволяющую измерить комплекс молекул в небольшом объеме жидкости. В 9 образцах СТЖ глаз с УМ определяли концентрацию ИЛ-8, ангиогенина, TNFα, ИФНα, ИФНγ, VEGF, bFGF, TGFβ. Группой сравнения служили больные с сенильной катарактой (n=38). В СТЖ глаз с УМ чаще и на более высоком уровне выявляли ангиогенин (11704,9±1767,7 пг/мл против 2820,2±1404,9 пг/мл, p <0,01), VEGF (471,5±154,6 пг/мл против 18,4±3,2 пг/мл, p <0,001), TNFα (4,3±1,1 пг/мл против 1,4 ±0,3 пг/мл, p <0,05), ИЛ-8 (323,2±227,9 пг/мл против 8,5±1,5 пг/мл, p <0,001), FGFb (44,6±16,2 против 2,7±1,0, p<0,001) и ИФНα (17,6±3,9 пг/мл против 4,4±0,4 пг/мл, p <0,05) В обеих группах не выявляли TGFβ. ИФНγ был обнаружен в 5 из 9 проб СТЖ с УМ на уровне 14,9±12,2 пг/мл. В целом, технология показала себя информативным инструментом для изучения ангиогенеза УМ.

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 (≤ 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 ($p=0,001$), ≥ 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 Т 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 презкваториальной $k=-0,252, p=0,003$); в *поздние сроки* (до 10 лет) – для Т 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 – ≥ 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 (≥ 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 формулы осуществляют по локализации. Так, в случае постэкваториальной УМ используют формулу 1, при ЦМ – формулу 2, при юстапапиллярной МХ – формулу 3.

Формула 1: Выживаемость (в мес.) = $68,994 - 33,682 * \text{HYPERTEN} - 39,334 * \text{FLK_I_G} + 30,856 * \text{POST_LOC}$

Формула 2: Выживаемость (в мес.) = $96,388 - 28,586 * \text{HYPERTEN} - 27,470 * \text{CIL_LOC}$

Формула 3: Выживаемость (в мес.) = $77,022 - 26,245 * \text{HYPERTEN} - 48,203 * \text{FLK_I_G} + 26,750 * \text{UXTA_LOC}$

3. Прогноз выживаемости в месяцах дополняют расчетом срока появления первого метастаза. Расчет выполняют по универсальной формуле, представленной ниже:

Время появления 1 метастаза (в мес.) = $69,688 - 47,989 * \text{HYPERTEN} + 59,905 * \text{VEGFE_G}$, где HYPERTEN, POST_LOC, CIL_LOC, UXTA_LOC – бинарные показатели, где 1 – ставится УМ, если она имеет указанную локализацию, 0 – не имеет. Аналогично VEGFE_G и FLK_I_G – бинарные показатели: где 1 – ставится при интенсивной ИГХ-окраске эндотелия VEGF и FLK_I_G и 0 – в случае отсутствия интенсивной экспрессии этих молекул.

Примечание: Представленные формулы не предназначены для прогноза меланомы радужки

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Лихванцев, В.Г. Ангиогенез в увеальной меланоме /В.Г. Лихванцева, О.А. Анурова, М.В. Верещагина, **Ованесян В.Э.** //Офтальмология.-2021.-Т.18,№3.-С.495-502. doi.org/10.18008/1816-5095-2021-3-495-502 (К-1, Scopus).
2. Лихванцева, В.Г. Рецептор VEGF-R1/Flt-1 как характеристика ангиогенного фенотипа увеальной меланомы / В.Г. Лихванцева, О.А. Анурова, С.Е. Астахова, М.В. Верещагина, **В.Э.Ованесян** // **Офтальмология**.-2021.-Т.18,№4.-С.866-875. doi.org 10.18008/1816-5095-2021-4-866-875 (К-1, Scopus).
3. Лихванцева, В.Г. Экспрессия фактора роста сосудистого эндотелия в увеальной меланоме. /В.Г. Лихванцева, О.А. Анурова, С.Е. Астахова, М.В. Верещагина, Е.В. Степанова **В.Э.Ованесян** // **Офтальмология**.- 2021.-Т.18,№4.-С.914-921. doi.org/10.18008/1816-5095-2021-4-914-921 (К-1, Scopus).
4. Лихванцева, В.Г. Влияние половых гормонов и беременности на развитие и прогрессирование увеальной меланомы /В.Г. Лихванцева, **В.Э. Ованесян** //Вестник офтальмологии.-2022.-Т.138,№3.-С.110-117. /doi.org/10.17116/oftalma2022138031110 (К-1, Scopus).

5. Лихванцева, В.Г. Жидкостная биопсия при увеальной меланоме. Есть ли смысл?/ В.Г. Лихванцева, **В.Э. Ованесян**, С.И. Рычкова, С.А. Сельков. // **Офтальмология**.-2022.-Т.19,№3.-С.594-602. doi.org/10.18008/1816-5095-2022-3-594-602 (К-1, Scopus).

6. Лихванцева, В.Г. Изучение фенотипа эндотелиальных клеток в сосудах увеальной меланомы / В.Г. Лихванцева, О.А. Анурова, С.Е. Астахова, М.В. Верещагина, **В.Э. Ованесян** // **Офтальмология**.-2022.-Т.19,№4.-С.789-796 //doi.org/10.18008/1816-5095-2022-4-789-796 (К-1, Scopus).

7. Лихванцева, В.Г. Изучение уровня проангиогенных и антиангиогенных факторов роста в стекловидной жидкости при меланоме хориоидеи / В.Г. Лихванцева, **В.Э. Ованесян**, С.И. Рычкова, С.А. Сельков. //Журнал «Отражение».-2022.-Т.14,№2.-С.31-35.

Примечания:

К-1- категория журнала по коэффициенту научной значимости в базе данных RSCI;

Scopus - публикации в изданиях, включенных в международную базу цитирования Scopus.

Заявки на изобретение по теме диссертации

Лихванцева В.Г., **Ованесян В.Э.** Способ определения срока появления первого метастаза после энуклеации при увеальной меланоме. Регистрационный номер 2024100978; входящий № 001850 от 16.01.2024.

Лихванцева В.Г., **Ованесян В.Э.** Способ прогнозирования выживаемости после энуклеации при развившейся до экватора глаза увеальной меланоме. Регистрационный номер 2024100980; входящий № 001852 от 16.01.2024.

Лихванцева В.Г., **Ованесян В.Э.** Способ прогнозирования выживаемости после энуклеации при развившейся до экватора глаза увеальной меланоме. Регистрационный номер 2024102491; входящий № 005194 от 01.02.2024.

Список сокращений

Антитела	АТ
Антигены	АГ
Тканедифференциационные клеточные маркеры	CD
Интерлейкин 8	ИЛ-8
Иммуногистохимические исследования	ИГХ
Интерферон	ИФН
Основной фактор роста фибробластов	FGF
Опухолевые клетки	ОК
Стекловидная жидкость	СТЖ
Трансформирующий фактор роста	TGF
Эндотелиальные клетки	ЭК
Увеальная меланома	УМ