

## Клеточное и стромальное микроокружение при метастазирующей меланоме хориоидеи

Е.Л. Казачков<sup>1</sup>, А.Ю. Шаманова<sup>1,2</sup>, И.Е. Панова<sup>3</sup>, Д.М. Ростовцев<sup>2</sup>, Т.Н. Шамаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ Челябинский областной клинический центр онкологии и ядерной медицины, Челябинск, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский филиал ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Меланома хориоидеи (МХ) – злокачественное новообразование собственной сосудистой оболочки глаза. Прогнозирование и предотвращение метастазирования данной опухоли являются главными задачами онкоофтальмологии, имеющими целью максимально продлить безрецидивную выживаемость пациентов. Цель исследования – определить особенности клеточно-стромального микроокружения метастазирующей меланомы хориоидеи на основе иммуногистохимической характеристики операционного материала.

**Материалы и методы.** Ретроспективно исследован операционный материал случаев МХ за 2013–2017 годы. Выборку составили две группы исследования: 1-я группа – случаи МХ без отдаленных метастазов (n=25), 2-я группа – случаи МХ с отдаленными метастазами в печень (n=18). Исследование проведено с применением историко-архивных, гистологических, иммуногистохимических, морфометрических и статистических методов.

**Результаты.** Во 2-й группе исследования статистически значимо преобладал уровень клеток, экспрессирующих маркеры CD4, – 138,5 (99,8;153,3), CD68 – 137 (99,5;173,8) и CD56 – 5 (3;6). Установлено, что показатели CD4 лимфоцитов >95 и CD68 макрофагов >104 позволяют прогнозировать появление отдаленных метастазов МХ с чувствительностью 83,3% и 72,2% и специфичностью 76% и 76%, соответственно. Такой же прогностической ценностью обладают показатели объемной плотности кровеносных сосудов в опухоли <3,9 (с чувствительностью 77,8%, специфичностью 64%).

**Заключение.** Метастазирующие МХ характеризуются особенностями клеточно-стромального микроокружения. Количественные показатели CD4 лимфоцитов, CD68 макрофагов и объемной плотности кровеносных сосудов в опухоли обладают прогностической ценностью с высокой чувствительностью и специфичностью для построения прогноза отдаленного метастазирования опухоли.

**Ключевые слова:** меланома хориоидеи, лимфоциты, макрофаги, метастазы, кровеносные сосуды опухоли

**Для корреспонденции:** Анна Юрьевна Шаманова. E-mail: anna-sha@bk.ru

**Для цитирования:** Казачков Е.Л., Шаманова А.Ю., Панова И.Е., Ростовцев Д.М., Шамаева Т.Н. Клеточное и стромальное микроокружение при метастазирующей меланоме хориоидеи. Клини. эксп. морфология. 2021;10(S4):52–60. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.52-60.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 27.09.2021. Получена после рецензирования 11.10.2021. Принята в печать 16.12.2021.

## Cellular and stromal microenvironment of metastatic choroidal melanoma

E.L. Kazachkov<sup>1</sup>, A.Yu. Shamanova<sup>1,2</sup>, I.E. Panova<sup>3</sup>, D.M. Rostovcev<sup>2</sup>, T.N. Shamaeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

<sup>2</sup> Chelyabinsk Regional Clinical Center of Oncology and Nuclear Medicine, Chelyabinsk, Russia

<sup>3</sup> S.N. Fedorov National Medical Research Center “Inter-Sectoral Research and Technical Complex ‘Eye microsurgery’”, St. Petersburg Branch, Saint Petersburg, Russia

**Introduction.** Choroidal melanoma is a malignant neoplasm of the eye’s vascular membrane. Prognosing and preventing metastasis are the main objectives of ocular oncology, aimed at maximizing the relapse-free survival of patients. Our goal was to determine the features of the cellular and stromal microenvironment of metastatic choroidal melanoma based on the immunohistochemical characteristics of surgical specimens.

**Materials and methods.** We conducted a retrospective analysis of surgical specimens of cases of choroidal melanoma obtained from 2013 to 2017 and divided them into 2 study groups: group 1 included cases of

choroidal melanoma without distant metastases (n=25) and group 2 involved cases of choroidal melanoma with distant liver metastases (n=18). The study was conducted using medical records analysis, histological, immunohistochemical, morphometric, and statistical research methods.

**Results.** In group 2, the level of cells expressing CD4 markers – 138.5 (99.8;153.3), CD68 – 137 (99.5;173.8) and CD56 [5 (3;6)] prevailed significantly. The indicators of CD4 lymphocytes >95 and CD68 macrophages >104 were found to allow the prediction of the appearance of distant choroidal melanoma metastases with the sensitivity of 83.3% and 72.2% and specificity of 76% and 76%, respectively. The indicators of the volume density of blood vessels in the tumor <3.9 (with a sensitivity of 77.8% and specificity of 64%) were of the same prognostic value.

**Conclusion.** Metastatic choroidal melanoma is characterized by features of the cellular and stromal microenvironment. Quantitative indicators of CD4 lymphocytes and CD68-macrophages and the volume density of blood vessels in the tumor have prognostic value with high sensitivity and specificity for predicting distant tumor metastasis.

**Keywords:** choroidal melanoma, lymphocytes, macrophages, metastases, tumor blood vessels

**Corresponding author:** Anna Yu. Shamanova. E-mail: anna-sha@bk.ru

**For citation:** Kazachkov E.L., Shamanova A.Yu., Panova I.E., Rostovcev D.M., Shamaeva T.N. Cellular and stromal microenvironment of metastatic choroidal melanoma. 2021;10(S4):52–60. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.52-60 (In Russ.).

**Funding.** The study was carried out within the framework of state budget funding.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received** 27.09.2021. **Received in revised form** 11.10.2021. **Accepted** 16.12.2021.

## Введение

Показатель заболеваемости злокачественными новообразованиями (ЗНО) глаза и его придаточного аппарата в России в 2019 году составил 0,79 на 100 тысяч населения, а по Челябинской области – 1,52 на 100 тысяч [1]. В структуре ЗНО органа зрения внутриглазные опухоли занимают 2-е место и в 95% случаев представлены увеальной меланомой (УМ). УМ – ЗНО сосудистого тракта глаза, относящееся к меланоцитарным опухолям. Как любое ЗНО, данная опухоль является социально значимым заболеванием, оказывающим огромное воздействие на качество жизни пациентов [2].

В группе УМ на меланоме хориоидеи (МХ) приходится 93,7% наблюдений. В структуре диагностируемых меланом различной локализации, включая меланомы кожи, каждая пятая – это МХ [3, 4]. Заболеваемость МХ в Челябинской области составляет 0,73 на 100 тысяч населения [1].

Методы лечения МХ представлены органосохраняющими (брахитерапия, транспупиллярная термотерапия и т.д.) и органонуносящими (энуклеация глазного яблока) [5, 6] вмешательствами. В литературе дискутируется возможность эндовитреального удаления МХ в качестве альтернативы энуклеации глаза [7], но операцией выбора зачастую является все-таки эта манипуляция.

МХ существенно отличается от меланомы кожи, в частности по набору хромосомных мутаций [8], по своему биологическому «поведению», по склонности к позднему метастазированию, порой спустя 10–15 лет после хирургического удаления первичной опухоли [9, 10]. На вероятность появления метастазов влияют размеры новообразования, клинко-морфологические характеристики опухоли и прочее. Частота метастази-

рования, по данным ряда авторов, может варьировать в диапазоне 12–50% [11–13].

И.Е. Панова и соавт. [14] определяют критический срок формирования метастазов МХ равным 1–5 годам, когда регистрируют дочерние очаги опухоли в 77,2% наблюдений. При этом после ликвидационного лечения средние сроки метастазирования опухоли составляют 27,75±22,06 месяца, при органосохраняющем варианте терапии – 61,57±50,32 месяца [14]. Другие исследователи считают, что диссеминация опухолевого процесса при МХ не зависит от вида проведенного лечения [15].

В свете изложенного полагаем, что одной из актуальных задач современной онкоофтальмологии является определение критериев риска развития метастазов МХ. Среди последних упоминают некоторые особенности локализации и структуры опухоли – преэквадриальную топологию, большие размеры, грибовидную форму, пигментацию новообразования, смешанный и эпителиоидный гистотипы, отслойку сетчатки и прочее [14].

К неблагоприятным прогностическим морфологическим особенностям опухоли относят рост МХ за пределы склеры, инвазию в цилиохориоидальную зону, высокую плотность микрососудов, рост уровня макрофагов, контурирующиеся ядрышки в опухолевых клетках [16]. Имеются публикации, посвященные морфологическому анализу особенностей неблагоприятного течения МХ, а именно при рецидиве, продолженном росте, метастазировании. Так, показано [17, 18], что веретенчатый гистотип МХ имеет более благоприятный прогноз, а ранние клинические стадии опухоли коррелируют с более низким риском рецидива и метастазирования новообразования.

Микроокружение опухоли включает в себя как клеточный (лимфоциты, макрофаги, плазмоциты,

фибробласты и т.д.), так и стромально-сосудистый (экстрацеллюлярный матрикс и кровеносные сосуды) компоненты. При этом известно [19], что опухолевые клетки способны модулировать свое микроокружение и тем самым обеспечивать себе рост и метастазирование за счет активизации неоангиогенеза и уклонения от защитных иммунных реакций организма-опухолесителя.

Вместе с тем организм способен к иммунному надзору за опухолью посредством распознавания иммунокомпетентными клеточными элементами структур новообразования и их «уничтожения» цитотоксическими клетками. На примере колоректальной карциномы показано [20], что выраженная лимфоцитарная инфильтрация пара- и интраканкротной зон коррелирует с более высоким уровнем выживаемости пациентов.

Сегодня актуальным и перспективным направлением является иммунотерапия ЗНО различных локализаций (колоректальный рак, рак тела матки и придатков, рак легкого) [21, 22]. Возможная точка воздействия при данном варианте терапии – блокада взаимодействия между рецептором цитотоксического лимфоцита PD-1 и опухолевым лигандом PD-L1, что в свою очередь приводит к активации иммунной системы, а именно ее противоопухолевых потенциалов [23]. Известно [24], что инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL) – активный компонент адаптивного иммунного ответа на рост опухоли. Так, для HER2-позитивного и трижды негативного рака молочной железы уровень TIL является важным предиктивным и прогностическим фактором.

В настоящее время не существует абсолютно эффективных лечебных подходов к предотвращению метастазирования МХ, четко не определены структурные критерии прогнозирования отдаленного метастазирования данной опухоли. Таким образом, поиск возможных морфологических и иммуногистохимических критериев риска метастазирования МХ является актуальной задачей в онкоморфологии. Кроме того, активно дискутируется возможность активации клеточного микроокружения МХ не столько в первичном очаге (глазное яблоко), сколько в метастатических очагах (например, в ткани печени). В связи с этим остается открытым для научных поисков вопрос о роли микроокружения МХ и возможности стимуляции противоопухолевых потенциалов полиморфноклеточного параканкротного и интраканкротного инфильтрата посредством иммунотерапии.

Цель исследования – определить особенности клеточно-стромального микроокружения метастазирующей меланомы хориоидеи на основе иммуногистохимической характеристики операционного материала.

## Материалы и методы

Проведено ретроспективное исследование операционного материала – 299 энуклеированных глаз от 299 пациентов, пролеченных по поводу МХ T2(a,b,c) N0M0-1 в 2013–2017 годах в Челябинском областном клиническом центре онкологии и ядерной медицины.

Критерии включения: соответствие МХ градации T2(a,b,c)N0M0-1; хирургическое лечение опухоли (энуклеация глазного яблока); беспигментные или слабопигментированные новообразования; локализация опухоли в хориоидеи; согласие пациента на проведение исследования операционного материала.

Критерии исключения: лечение опухоли, предшествовавшее энуклеации (брахитерапия и т.д.); терапевтический патоморфоз опухоли; синхронное и метакронное онкологическое заболевание.

Для сравнительного морфологического анализа особенностей клеточно-стромального микроокружения МХ в соответствии с критериями включения и исключения были сформированы две группы наблюдений. 1-ю группу составили пациенты с МХ без отдаленных метастазов опухоли, во 2-ю группу включены наблюдения МХ с отдаленными метастазами (в печень).

В работе использованы историко-архивный, гистологический (обзорная световая микроскопия материала с окрашиванием гематоксилином и эозином), морфометрический, иммуногистохимический (ИГХ) и статистический методы исследования. Оценивался клеточный компонент микроокружения МХ с идентификацией иммунофенотипа клеток ИГХ методом (CD4-экспрессирующие Т-лимфоциты/хелперы; CD8-экспрессирующие Т-цитотоксические клетки; CD68 макрофаги; CD56 натуральные киллеры). При исследовании экстрацеллюлярного матрикса особое внимание обращали на истинные кровеносные сосуды, для идентификации которых использовали маркер эндотелия CD34.

К TIL относили все мононуклеарные клеточные элементы в МХ, так как строма в этом новообразовании не выражена. Артефициальные зоны в ткани, некрозы, а также дендритные клетки, макрофаги, гранулоциты при подсчете TIL не учитывались. При оценке представительства TIL в опухоли использован полуколичественный метод: отсутствие TIL – 0% (0 баллов), ≤10% TIL – 1 балл, 10–50% TIL – 2 балла, >50% TIL – 3 балла.

Изучение оцифрованных изображений опухоли с количественной оценкой экспрессии маркеров CD4, CD8, CD68 и CD56 клеток в 10 полях зрения при ×400 выполнено с помощью программы Pannogamic Viewer (Version 1.15.4). В интерцеллюлярном матриксе новообразования подсчитывали истинные кровеносные сосуды, представляя результаты исследования в показателях объемной плотности (об%).

Результаты обработаны и проанализированы с помощью программы IBM SPSS Statistics 19. Поскольку объем выборки в группах составил менее 30 наблюдений, проверка гипотезы о виде закона распределения оценивалась с помощью критерия Шапиро–Уилка. При этом установлено, что распределение исследуемых признаков не подчинялось нормальному закону. В качестве параметров описательной статистики для интервальных и порядковых показателей рассчитывали медиану и квартили (Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]). При сравнении групп

по этим показателям применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. При описании номинальных признаков использовали абсолютную частоту и долю в процентах. Сравнение групп по этим признакам проводили при помощи непараметрического критерия  $\chi^2$  Пирсона. Взаимосвязи между исследуемыми количественными показателями оценивались по коэффициенту корреляции Спирмена ( $r_s$ ). С целью определения ценности показателей количества клеток микроокружения опухоли для прогноза отдаленных метастазов проведен ROC-анализ. Рассчитывались площадь под ROC-кривой с указанием 95% доверительного интервала (AUC), чувствительность, специфичность, а также разделительные точки (пороговые значения) для количественных показателей.

### Результаты

Исследовано 299 энуклеированных глаз от 299 пациентов. При этом сформированы две группы сравнимых наблюдений. 1-ю группу составили 25 случаев МХ без отдаленных метастазов T2(a,b,c)N0M0 с периодом динамического наблюдения 5–9 лет. Во вторую группу включено 18 наблюдений МХ T2(a,b,c)N0M1 с гистологически верифицированными отдаленными метастазами в печень. Средний промежуток времени от момента верификации первичной опухоли до появления метастазов во 2-й группе составил  $3,25 \pm 0,36$  года. Для исключения ложных интерпретаций в ходе ИГХ-исследования при анализе микропрепаратов операционного материала в группы сравнения включены лишь слабопигментированные либо беспигментные МХ.

Пациенты групп сравнения были сопоставимы по полу и возрасту. Так, медиана возраста больных 1-й группы на момент верификации МХ составила 62 года

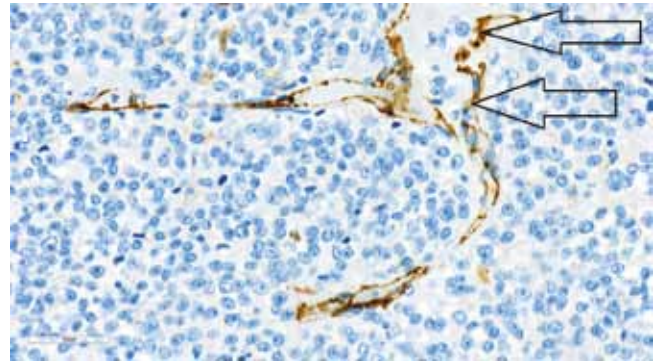


Рис. 1. Опухолевые эмболы в истинном кровеносном сосуде меланомы хориоидеи (стрелки). Иммуногистохимическое исследование с CD34, выявляющее эндотелиоциты кровеносного сосуда,  $\times 200$

Fig. 1. Tumor emboli in the choroidal melanoma blood vessel (arrows). Immunohistochemical study with CD34 revealing endotheliocytes of the blood vessel,  $\times 200$

(56; 66,5), среди них было 14 женщин и 11 мужчин. Медиана возраста 10 женщин и восьми мужчин, составивших 2-ю группу, оказалась равной 57 годам (49; 62,3). Во всех случаях верифицирован эпителиоидноклеточный либо веретенчатый вариант МХ.

В ходе гистологического исследования опухоли при окрашивании гематоксилином и эозином особое внимание обращали на наличие и количество опухолевых эмболов в истинных кровеносных сосудах, подтвержденных иммуногистохимической реакцией с CD 34 (рис. 1).

Сравнительная характеристика клеточных элементов и компонентов экстрацеллюлярного матрикса микроокружения МХ представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 | Table 1

Сравнительная количественная и полуколичественная характеристика экспрессии маркеров CD4, CD8 лимфоцитов, TIL – инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, CD68 макрофагов, CD56 NK-клеток объемной плотности истинных кровеносных сосудов (CD 34, об%) микроокружения меланомы хориоидеи | Comparative quantitative and semi-quantitative characteristics of the expression of markers of CD4, CD8 lymphocytes, TIL (tumor-infiltrating lymphocytes), CD68 macrophages, and CD56 NK-cells of the volume density of blood vessels (CD 34, vol%) of the choroidal melanoma microenvironment

Исследуемые параметры   Investigated parameters	Исследуемые группы   Study groups		p, критерий Манна–Уитни   p, the Mann–Whitney U test
	1-я группа   group 1 (n=25)	2-я группа   group 2 (n=18)	
Опухолевые эмболы в сосудах опухоли   Tumor emboli in the tumor vessels	0,0 (0,0; 1,0)	3,0 (2,0; 4,0)	0,001*
CD4	68,0 (56; 97)	138,5 (99,8; 153,3)	0,001*
CD8	14,0 (11,5; 20,5)	16,5 (13,3; 24,5)	0,152
CD68	87,0 (69,0; 115,5)	137,0 (99,5; 173,8)	0,005*
CD56	2,0 (1,0; 4,5)	5,0 (3,0; 6,0)	0,046*
CD34	4,2 (3,0; 5,1)	2,3 (1,3; 3,9)	0,002*
TIL	1,0 (1,0; 1,0)	2,0 (1,0; 2,0)	0,001*

\* Различия в группах сравнения статистически значимы | The differences in the comparison groups are significant

Таблица 2 | Table 2

**Сравнительная количественная и полуколичественная характеристика TIL – инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, опухолевых эмболов в сосудах меланомы хориоидеи | Comparative quantitative and semi-quantitative characteristics of TIL tumor infiltrating lymphocytes, and tumor emboli in choroidal melanoma vessels**

Исследуемые параметры   Investigated parameters	Исследуемые группы   Study groups		Критерий $\chi^2$ Пирсона   Pearson's chi-squared test
	1-я группа   group 1 (n=25)	2-я группа   group 2 (n=18)	
Отсутствие опухолевых эмболов   Absence of tumor emboli	14 (56%)	1 (5,6%)	0,001*
Наличие опухолевых эмболов   Presence of tumor emboli	11 (44%)	17 (94,4%)	
TIL	1 балл   1 point (88%, n=22) 2 балла   2 points (12%, n=3)	1 балл   1 point (44,4%, n=8) 2 балла   2 points (55,6%, n=10)	0,002*

\* Различия в группах сравнения статистически значимы | The differences in the comparison groups are significant

Как видно из таблиц 1 и 2, сравнительный анализ представительства CD4 лимфоцитов, CD68 макрофагов, CD56 натуральных киллеров и объемной плотности сосудов в опухоли в 1-й и 2-й группах выявил статистически значимые различия. Так, в группе МХ с метастазами в печень показатели количества клеток (медиана, квартили), экспрессирующих CD4, CD68, CD56, составили, соответственно, 138,5 (99,8; 153,3), 137,0 (99,5; 173,8), 5,0 (3,0; 6,0), что статистически значимо превышало одноименные значения 1-й группы – 68,0 (56,0; 97,0), 87,0 (69,0; 115,5); 2,0 (1,0; 4,5). Медиана объемной плотности кровеносных сосудов в экстрацеллюлярном матриксе МХ с метастазами в печень, напротив, была статистически значимо ниже, чем в 1-й группе, – 2,3 (1,3; 3,9) против 4,2 (3,0; 5,1), соответственно ( $p=0,002$ ).

При сравнительной оценке уровня TIL обнаружены значимые статистические различия (1,0 (1,0; 1,0) и 2,0 (1,0; 2,0) в 1-й и 2-й группах соответственно, критерий Манна–Уитни  $p=0,001$ ). С помощью полуколичественного метода определения представительства TIL в группах установлено, что в 22 наблюдениях 1-й группы (88%) уровень составил 1 балл, в трех (12%) – 2 бал-

ла, а во 2-й группе уровень TIL, равный 1 баллу, зафиксирован у восьми пациентов (44,4%), 2 балла – у 10 (55,6%) (критерий  $\chi^2$  Пирсона  $p=0,002$ ). Опухолевые эмболы регистрировались в 11 наблюдениях МХ без метастазов (44%), в то время как во 2-й группе (МХ с метастазами в печень) – в 17 (94,4%) ( $\chi^2$  Пирсона  $p=0,001$ ). При этом медиана количества эмболов в сосудах МХ 2-й группы составила 3 (2; 4), а в 1-й группе – 0 (0; 1) (критерий Манна–Уитни  $p=0,001$ ).

ROC-анализ проведен для всех анализируемых параметров в группах, но статистически значимые результаты были обнаружены лишь для CD4 лимфоцитов, CD68 макрофагов и CD34 (рис. 2, табл. 3).

При корреляционном анализе исследуемых параметров клеточного микроокружения в 1-й группе выявлена слабая по силе прямая связь между показателями TIL и CD56 натуральных киллеров (коэффициент Спирмена  $r_s=0,401$ ;  $p=0,047$ ). По остальным исследованным показателям 1-й группы (CD4, CD8, CD68, CD 34 маркеры, количество опухолевых эмболов) сравнительный анализ статистически значимых корреляций не обнаружил. Во 2-й группе наблюдений выявлены статистически значимая прямая слабая корреляционная связь между

Таблица 3 | Table 3

**Сравнительная характеристика количественных показателей ROC-анализа CD4 лимфоцитов, CD68 макрофагов и объемной плотности кровеносных сосудов | Comparative characteristics of quantitative indicators of ROC analysis of CD4 lymphocytes, CD68 macrophages, and volume density of blood vessels**

Тестовая переменная   Test variable	Разделительная точка   Cut-off	AUC, 95% ДИ	Значимость   Significance	Чувствительность, %   Sensitivity, %	Специфичность, %   Specificity, %
CD4	>95	0,838 (0,697; 0,978)	0,001	83,3	76
CD68	>104	0,756 (0,605; 0,906)	0,005	72,2	76
CD34	<3,9 %	0,781 (0,638; 0,925)	0,002	77,8	64

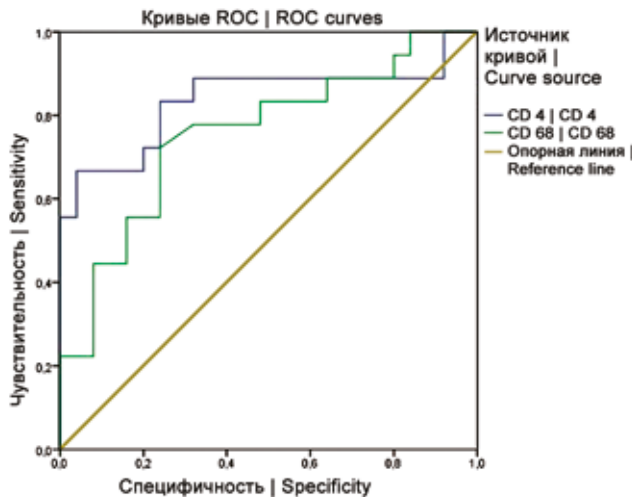


Рис. 2. ROC-кривые прогностической ценности количества CD4 лимфоцитов и CD68 макрофагов для прогноза отдаленного метастазирования меланомы хориоидеи  
 Fig. 2. ROC curves of the prognostic value of the number of CD4 lymphocytes and CD68 macrophages for the prognosis of distant metastasis of choroidal melanoma

представительством CD68 макрофагов и CD34 маркеров эндотелиальных клеток ( $r_s=0,449$ ;  $p=0,049$ ), а также обратная корреляционная связь между CD68 и CD56 клетками ( $r_s=-0,519$ ;  $p=0,027$ ).

## Обсуждение

Прогнозирование и предотвращение отдаленных метастазов МХ являются главными задачами онкоофтальмологии. Ранее нами показано [18], что количество опухолевых эмболов в сосудах новообразования статистически значимо различается при сравнении групп МХ с отдаленными метастазами и без них, тогда как особенности внутриорганного распространения новообразования (глубина инвазии в склеру, в глазничный нерв, периневральный рост) статистической значимости не имеют. Это косвенно указывает на склонность МХ к гематогенной диссеминации (в печень, реже в кости, легкие, головной мозг) [16] и согласуется с данными о том, что вне зависимости от метода и объема лечения до 50–70% случаев МХ сопровождается формированием отдаленных метастазов [14].

Развитие ЗНО представляет собой многоэтапный процесс, важную роль в котором играет иммунный ответ организма. Клеточное микроокружение опухоли, несомненно, оказывает влияние на рост и развитие новообразования. Противоопухолевые потенции иммунной системы проявляются путем активации врожденного и адаптивного звеньев иммунитета, результатом чего является, в частности, формирование микроокружения опухоли. При этом атипичные клетки оказывают влияние на свое клеточно-тканевое окружение, модифицируют его, влияют на формирование новообразованных сосудов, уклоняются от воздействия иммунокомпетентных элементов, проявляя склонность

с агрессивному росту и образованию метастазов [25]. Логично предположить, что особенности клеточного состава опухолевого микроокружения (выраженность, соотношение различных клеточных популяций, корреляционные связи между клетками) могут помочь в поисках маркеров метастазирования МХ, а также показать возможные перспективные точки воздействия на опухоль, в том числе через компоненты ее микроокружения посредством иммунотерапии [26, 27].

К числу важных прогностических показателей метастазирования УМ помимо ее хромосомного набора и характеристики клеточного субстрата относят особенности сосудистого русла в опухоли, а именно обильную и разветвленную васкуляризацию новообразования. По данным ряда авторов [28, 29], повышенная сосудистая плотность в УМ статистически значимо коррелирует с низкими показателями выживаемости.

А. J. Maniotis et al. [30] описали сосудистые каналы при высокоагрессивных УМ, образованные клетками опухоли, и назвали этот феномен васкулогенной мимикрией. Наряду с этим уместно предположить, что через обильное сосудистое русло в ткань опухоли должны мигрировать иммунные клетки в рамках их противоопухолевого иммунного надзора.

В последние десятилетия активно изучается вопрос влияния клеточного микроокружения на рост, развитие опухолей иных локализаций и их способность к метастазированию (рак почки, кишки, гортани) [31]. Тем не менее вопрос об иммунной реактивности клеток окружения МХ остается дискуссионным.

Исследования показали [32, 33], что УМ плохо реагирует на лечение ингибиторами иммунных контрольных точек. Вероятно, это связано с тем, что в строме УМ глаза скудно представлены элементы воспалительного клеточного микроокружения. Глаз – это иммунопривилегированный орган, который хорошо защищен от возникновения местных воспалительных реакций посредством иммунологических барьеров с целью сохранения функциональной активности эндотелиальных клеток роговицы и сетчатки, которые не склонны к регенерации [34, 35]. Несмотря на это, по данным ряда авторов [36, 37], наличие инфильтрирующих иммунных клеток при первичной УМ является маркером плохого прогноза.

Некоторые исследователи [38, 39] полагают, что УМ «ускользает» от воздействия иммунной системы организма. Однако, несмотря на выраженную иммуносупрессивную активность клеток УМ, имеющееся лимфоцитарное микроокружение, несомненно, оказывает воздействие на опухоль, что может явиться обоснованием к иммунотерапевтическому подходу в лечении данного новообразования. Так, L. D. Rothermel et al. [40] в экспериментальном исследовании *in vitro* на популяции клеток УМ в метастазах обнаружили иммуногенную группу опухолевых клеток. Авторы выделили клеточные линии УМ, меланомы кожи, лимфоцитов из метастазов в печень и провели анализ

иммунофенотипа TIL, полученных из этих двух форм меланом. При меланоме кожи TIL были преимущественно CD8 лимфоцитами, в то время как при УМ – CD4 клетками. Несмотря на то, что при меланоме кожи реактивность лимфоцитов против аутологичной опухоли была значительно выше, чем в случаях УМ, авторы обнаружили в УМ популяцию лимфоцитов с устойчивой противоопухолевой реактивностью [40].

В публикации А. Javed et al. [34] отмечается перспективность натуральных киллеров в вероятных противоопухолевых потенциях, особенно в метастазах УМ в печень. Уровень представительства иммунных клеток в микроокружении УМ существенно повышается, когда клетки опухоли выходят за пределы первичного очага (метастазируют в печень). Наши данные согласуются с результатами работ зарубежных исследователей [16]. На примере натуральных киллеров показано, что разнонаправленные противоопухолевые эффекторные реакции NK-клеток могут быть использованы при поиске действенной терапии [16, 34].

Обнаруженные в ходе нашего исследования статистически значимые различия в клеточно-стромальном окружении неметастазирующих и метастазирующих МХ указывают пути для поиска прогностических морфологических критериев метастазирования опухоли, а также намечают подходы к возможной иммунотерапии данного ЗНО. Тем не менее за рамками данной статьи остается пока не совсем ясный вопрос о характере взаимодействия иммунокомпетентных клеток организма и клеток УМ в отдаленных метастазах.

## Заключение

Метастазирующие меланомы хориоидеи имеют особенности клеточно-стромального микроокружения.

Нами обнаружено, что показатели экспрессии CD4 и CD68 обладают высокой прогностической ценностью для определения вероятности появления отдаленных метастазов. В ходе нашего исследования разделительной точкой (пороговым значением) для маркера CD4 определен показатель 95 с высокой чувствительностью (83,3%) и специфичностью (76%). В ходе проведенного ROC-анализа для CD68 клеток разделительной точкой явился показатель количества макрофагов 104 (чувствительность 72,2%, специфичность 76%). Таким образом показатели CD4 лимфоцитов >95 и CD68 макрофагов >104 прогнозируют появление отдаленных метастазов меланомы хориоидеи. Значение показателя объемной плотности кровеносных сосудов в опухоли <3,9 также следует считать прогностическим для меланомы хориоидеи с отдаленными метастазами (чувствительность 77,8%, специфичность 64%). Результаты нашего исследования подтверждают важность дальнейшего изучения иммуноопосредованного противоопухолевого воздействия на увеальную меланому, а также необходимость разработки морфологических подходов к ее иммунотерапии.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.Л. Казачков, И.Е. Панова, А.Ю. Шаманова, Д.М. Ростовцев.

Сбор и обработка материала – А.Ю. Шаманова, Т.Н. Шамаева.

Написание текста – А.Ю. Шаманова.

Редактирование – Е.Л. Казачков, И.Е. Панова, Д.М. Ростовцев.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – E.L. Kazachkov, I.E. Panova, A. Yu. Shamanova, D.M. Rostovcev.

Collected the data and performed the analysis – A. Yu. Shamanova, T.N. Shamaeva.

Wrote the paper – A. Yu. Shamanova.

Edited the manuscript – E.L. Kazachkov, I.E. Panova, D.M. Rostovcev.

## Литература/References

1. А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова (ред.). Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. Москва: Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, 2020. 239 с.  
AD Kaprin, VV Starinskiy, AO Shakhzadova (eds.). The state of cancer care for the population of Russia in 2019. Moscow: P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2020, 239 p. (In Russ.).
2. Перечень социально значимых заболеваний: постановление Правительства Российской Федерации от 01.12.2004 № 715. Доступно по адресу: <https://base.garant.ru/12137881/> (получено 12.09.2021).  
List of socially significant diseases: Decree of the Government of the Russian Federation of 01.12.2004 № 715 (In Russ.). Available from: <https://base.garant.ru/12137881/> (Accessed 12 september 2021).
3. *Важенин А.В., Панова И.Е.* Избранные вопросы онкоофтальмологии. Москва: Изд-во РАМН, 2006. 188 с.  
*Vazhenin AV, Panova IE.* Selected issues of oncoophthalmology. Moscow: RAMS Publishing House, 2006. 188 p. (In Russ.).
4. *Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Mashayekhi, Shields JA.* Clinical spectrum and prognosis of uveal melanoma based on age at presentation in 8,033 cases. *Retina.* 2012;32(7):1363–72. DOI: 10.1097/IAE.0b013e31824d09a8.
5. А.Ф. Бровкина (ред.). Офтальмоонкология: Руководство для врачей. Москва: Медицина, 2002. 424 с.  
AF Brovkina (ed.). Ophthalmooncology: A guide for doctors. Moscow: Izdatelstvo Meditsina, 2002. 424 p. (In Russ.).
6. *Kaliki S, Shields CL.* Uveal melanoma: Relatively rare but deadly cancer. *Eye (Lond).* 2017;31(2):241–57. DOI: 10.1038/eye.2016.275.
7. *Hamza HS, Elhusseiny AM.* Choroidal melanoma resection. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2018;25(2):65–70. DOI: 10.4103/meajo.MEAJO\_73\_18.
8. *Shields JA, Shields CL.* Management of posterior uveal melanoma: Past, present, and future. The 2014 Charles L. Schepens lecture. *Ophthalmology.* 2015;122(2):414–28. DOI: 10.1016/j.optha.2014.08.046.
9. *Amaro A, Gangemi R, Piaggio F, Angelini G, Barisione G, Ferrini S et al.* The biology of uveal melanoma. *Cancer Metastasis Reviews.* 2017;36(1):109–40. DOI: 10.1007/s10555-017-9663-3.

10. Singh AD, Turell ME, Topham AK. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology*. 2011;118(9):1881–5. DOI: 10.1016/j.opthta.2011.01.040.
11. Li Y, Shi J, Yang J, Ge S, Zhang J, Jia R et al. Uveal melanoma: progress in molecular biology and therapeutics. *Ther Adv Med Oncol*. 2020;12:1758835920965852. DOI: 10.1177/1758835920965852.
12. Beran TM, McCannel TA, Stanton AL, Straatsma BR, Burgess BL. Reactions to and desire for prognostic testing in choroidal melanoma patients. *J Genet Couns*. 2009;18(3):265–74. DOI: 10.1007/s10897-009-9223-2.
13. Damato BE, Heimann H, Kalirai H, Coupland SE. Age, survival predictors, and metastatic death in patients with choroidal melanoma: tentative evidence of a therapeutic effect on survival. *JAMA Ophthalmol*. 2014;132(5):605–13. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2014.77.
14. Панова И.Е., Власова О.С., Гюнтер Е.И., Самкович Е.В., Шаманова А.Ю. Клинико-инструментальные критерии риска метастазирования меланомы хориоидеи. *Российский офтальмологический журнал*. 2019;12(3):30–36. DOI: 10.21516/2072-0076-2019-12-3-30-36.  
Panova IE, Vlasova OS, Gyunter EI, Samkovich EV, Shamanova AY. Determining the risk of metastasis of choroidal melanoma: clinical and instrumental criteria. *Russian Ophthalmological Journal*. 2019;12(3):30–36 (In Russ.). DOI: 10.21516/2072-0076-2019-12-3-30-36.
15. Pham CM, Custer PL, Couch SM. Comparison of primary and secondary enucleation for uveal melanoma. *Orbit*. 2017;36(6):422–7. DOI: 10.1080/01676830.2017.1337183.
16. H.E. Grossniklaus, C.G. Eberhart, T.T. Kivelä (eds.). *WHO Classification of tumours of the eye*. 4<sup>th</sup> ed., vol. 1. Lyon: IARC, 2018. 228 p.
17. Coroi MC, Bakraoui A, Sala C, Ţica O, Ţica OA, Jurcă MC et al. Choroidal melanoma, unfavorable prognostic factors. Case report and review of literature. *Rom J Morphol Embryol*. 2019;60(2):673–8. PMID: 31658343.
18. Казачков Е.Л., Шаманова А.Ю., Важенин А.В., Панова И.Е., Семенова А.Б., Матвеева Т.А. и др. Морфологические особенности внутриорганного распространения меланомы хориоидеи и подходы к поиску факторов прогноза ее метастазирования. *Уральский медицинский журнал*. 2020;3(186):18–22. DOI: 10.25694/URMJ.2020.03.03.  
Kazachkov EL, Shamanova AY, Vagenin AV, Panova IE, Semenova AB, Matveeva TA et al. Morphological features of the intraorgan spread of melanoma of the choroid and approaches to the search for factors predicting its metastasis. *Ural Medical Journal*. 2020;3(186):18–22 (In Russ.). DOI: 10.25694/URMJ.2020.03.03.
19. Jindal V. Role of immune checkpoint inhibitors and novel immunotherapies in uveal melanoma. *Chin Clin Oncol*. 2018;7(1):8. DOI: 10.21037/cco.2018.01.05.
20. Zhang X, Kelaria S, Kerstetter J, Wang J. The functional and prognostic implications of regulatory T-cells in colorectal carcinoma. *J Gastrointest Oncol*. 2015;6(3):307–13. DOI: 10.3978/j.issn.2078-6891.2015.017.
21. Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the immune system: The history and background of immunotherapy. *Semin Oncol Nurs*. 2019;35(5):150923. DOI: 10.1016/j.soncn.2019.08.002.
22. Paijens ST, Leffers N, Daemen T, Helfrich W, Boezen HM, Cohlen BJ et al. Antigen-specific active immunotherapy for ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;9(9):CD007287. DOI: 10.1002/14651858.CD007287.pub4.
23. Carbognin L, Pilotto S, Milella M, Vaccaro V, Brunelli M, Calìò A et al. Differential activity of nivolumab, pembrolizumab and MPDL3280A according to the tumor expression of programmed death-ligand-1 (PD-L1): Sensitivity analysis of trials in melanoma, lung and genitourinary cancers. *PloS One*. 2015;10(6):e0130142. DOI: 10.1371/journal.pone.0130142.
24. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruner G et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26(2):259–71. DOI: 10.1093/annonc/mdu450.
25. Dong ZY, Wu SP, Liao RQ, Huang SM, Wu YL. Potential biomarker for checkpoint blockade immunotherapy and treatment strategy. *Tumour Biol*. 2016;37(4):4251–61. DOI: 10.1007/s13277-016-4812-9.
26. Bender C, Enk A, Gutzmer R, Hassel JC. Anti-PD-1 antibodies in metastatic uveal melanoma: A treatment option? *Cancer Med*. 2017;6(7):1581–6. DOI: 10.1002/cam4.887.
27. Algazi AP, Tsai KK, Shoushtari AN, Munhoz RR, Eroglu Z, Piulats JM et al. Clinical outcomes in metastatic uveal melanoma treated with PD-1 and PD-L1 antibodies. *Cancer*. 2016;122(21):3344–53. DOI: 10.1002/cncr.30258.
28. Chen X, Maniotis AJ, Majumdar D, Pe'er J, Folberg R. Uveal melanoma cell staining for CD 34 and assessment of tumor vascularity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(8):2533–9. PMID: 12147581.
29. Cong R, Sun Q, Yang L, Gu H, Zeng Y, Wang BJ. Effect of Genistein on vasculogenic mimicry formation by human uveal melanoma cells. *Exp Clin Cancer Res*. 2009;28(1):124. DOI: 10.1186/1756-9966-28-124.
30. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Sefter EA, Gardner LM, Pe'er J et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: Vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*. 1999;155(3):739–52. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65173-5.
31. Wang JJ, Lei KF, Han F. Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(12):3855–64. DOI: 10.26355/eurrev\_201806\_15270.
32. Rossi E, Pagliara MM, Orteschi D, Dosa T, Sammarco MG, Caputo CG et al. Pembrolizumab as first-line treatment for metastatic uveal melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(7):1179–85. DOI: 10.1007/s00262-019-02352-6.
33. Zimmer L, Vaubel J, Mohr P, Hauschild A, Utikal J, Simon J et al. Phase II DeCOG-study of ipilimumab in pretreated and treatment-naïve patients with metastatic uveal melanoma. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0118564. DOI: 10.1371/journal.pone.0118564.
34. Javed A, Milhem M. Role of natural killer cells in uveal melanoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(12):3694. DOI: 10.3390/cancers12123694.
35. Niederhorn JY. Ocular immune privilege and ocular melanoma: Parallel universes or immunological plagiarism? *Front Immunol*. 2012;3:148. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00148.



36. *Berus T, Halon A, Markiewicz A, Orłowska-Heitzman J, Romanowska-Dixon B, Donizy P.* Clinical, histopathological and cytogenetic prognosticators in uveal melanoma – A comprehensive review. *Anticancer Res.* 2017;37(12):6541–9. DOI: 10.21873/anticancerres.12110.
37. *Bronkhorst IH, Jager MJ.* Uveal melanoma: the inflammatory microenvironment. *J Innate Immun.* 2012;4(5-6):454–62. DOI: 10.1159/000334576.
38. *Kim DW, Anderson J, Patel SP.* Immunotherapy for uveal melanoma. *Melanoma Manag.* 2016;3(2):125–35. DOI: 10.2217/mmt-2015-0006.
39. *Jindal V.* Role of immune checkpoint inhibitors and novel immunotherapies in uveal melanoma. *Chin Clin Oncol.* 2018;7(1):8. DOI: 10.21037/cco.2018.01.05.
40. *Rothermel LD, Sabesan AC, Stephens DJ, Chandran SS, Paria BC, Srivastava AK et al.* Identification of an immunogenic subset of metastatic uveal melanoma. *Clin Cancer Res.* 2016;22(9):2237–49. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2294.

### Информация об авторах

Евгений Леонидович Казачков – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко ЮУГМУ.

Анна Юрьевна Шаманова – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко ЮУГМУ, врач-патологоанатом лабораторно-диагностической службы Челябинского областного клинического центра онкологии и ядерной медицины.

Ирина Евгеньевна Панова – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по науке МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова.

Дмитрий Михайлович Ростовцев – доктор медицинских наук, главный врач Челябинского областного клинического центра онкологии и ядерной медицины.

Татьяна Николаевна Шамаева – кандидат педагогических наук, доцент кафедры математики, медицинской информатики, информатики и статистики, физики ЮУГМУ.

### Author information

Evgeny L. Kazachkov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the V.L. Kovalenko Department of Anatomical Pathology and Forensic Medicine, South-Ural State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0002-4512-3421>

Anna Yu. Shamanova – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, V.L. Kovalenko Department of Anatomical Pathology and Forensic Medicine, South-Ural State Medical University; Pathologist, Laboratory and Diagnostic Service, Chelyabinsk Regional Clinical Center of Oncology and Nuclear Medicine.  
<https://orcid.org/0000-0002-9280-0608>

Irina E. Panova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Deputy Director for Science, S.N. Fedorov National Medical Research Center “Inter-Sectoral Research and Technical Complex 'Eye microsurgery’”, St. Petersburg Branch.  
<https://orcid.org/0000-0001-7443-4555>

Dmitry M. Rostovcev – Dr. Sci. (Med.), Chief Medical Officer, Chelyabinsk Regional Clinical Center of Oncology and Nuclear Medicine.  
<https://orcid.org/0000-0002-8956-7921>

Tatyana N. Shamaeva – Cand. Sci. (Ped.), Associate Professor, Department of Mathematics, Medical Informatics, Computer Science and Statistics; Physics, South-Ural State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0001-6327-2685>