

Морфологические особенности распределения компонентов экстрацеллюлярного матрикса – матриксной металлопротеиназы-9 и коллагена IV типа в метастазирующей меланоме хориоидеи

А.Ю. Шаманова^{1,2}, Е.Л. Казачков², И.Е. Панова³

¹ ГБУЗ Челябинский областной клинический центр онкологии и ядерной медицины, Челябинск, Россия

² ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

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

Резюме. *Введение.* Ранняя диагностика и прогнозирование появления отдаленных метастазов меланомы хориоидеи (МХ) на основании морфологической и иммуногистохимической (ИГХ) оценки компонентов микроокружения опухоли являются актуальными проблемами современной онкологии. Цель исследования – оценить иммуногистохимическую экспрессию матриксной металлопротеиназы-9 и коллагена IV типа в метастазирующей меланоме хориоидеи.

Материалы и методы. Проанализированы случаи МХ (n=43) T2(a,b,c)-3N0M0-1 за период с 2013 по 2017 год, сформировавшие группы исследования: 1-я – первичная МХ без отдаленных метастазов (n=25), 2-я – первичная МХ с отдаленными метастазами в печень (n=18). Выполнено ИГХ исследование материала с MMP-9 (Poly) (ММП-9), Collagen-IV (Clone CIV 22) (Col4). Оценены качественные, полуколичественные и количественные параметры в рамках цифровой патологии. Для МХ разработан полуколичественный метод оценки интенсивности экспрессии данных маркеров (в баллах).

Результаты. В исследование вошли 22 женщины (51,2%) и 21 мужчина (48,8%). Средний возраст пациентов составил 60,5 года. Толщина МХ в среднем 8,3 мм, средний диаметр опухоли 12,3 мм. При выраженном тканевом распаде опухоли, ее вертикальном размере, наличии инвазии в склеру клетки опухоли и компоненты ее микроокружения интенсивно экспрессируют ММП-9 и ремоделируют коллагеновый каркас. Более выраженная экспрессия ММП-9 была ассоциирована с повышенным содержанием в экстрацеллюлярном матриксе (ЭЦМ) разрозненных волокон коллагена IV типа в метастазирующих МХ.

Заключение. В ходе роста и прогрессирования МХ компоненты микроокружения и клетки опухоли оказывают взаимное влияние с дезорганизацией компонентов ЭЦМ. Показатели ИГХ экспрессии (ММП-9, Col4) в опухоли нецелесообразно рассматривать как диагностический маркер метастазирования МХ. Тем не менее они могут быть использованы в практической работе при мониторинге течения заболевания и для дальнейшего изучения механизмов ремоделирования микроокружения опухоли.

Ключевые слова: меланома хориоидеи, матриксная металлопротеиназа-9, коллаген IV типа, метастаз

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

Для цитирования: Шаманова А.Ю., Казачков Е.Л., Панова И.Е. Морфологические особенности распределения компонентов экстрацеллюлярного матрикса – матриксной металлопротеиназы-9 и коллагена IV типа в метастазирующей меланоме хориоидеи. Клини. эксп. морфология. 2022;11(4):25–37. DOI: 10.31088/CEM2022.11.4.25-37.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 12.07.2022. Получена после рецензирования 27.07.2022. Принята в печать 15.09.2022.

Morphological features of the distribution of extracellular matrix components: MMP-9 and type IV collagen in metastatic choroidal melanoma

A.Yu. Shamanova^{1,2}, E.L. Kazachkov², I.E. Panova³

¹ Chelyabinsk Regional Clinical Center of Oncology and Nuclear Medicine, Chelyabinsk, Russia

² South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

³ S.N. Fedorov National Medical Research Center "Inter-Sectoral Research and Technical Complex "Eye microsurgery"", St. Petersburg Branch, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Introduction. Early diagnosis and prediction of distant metastases in choroidal melanoma patients based on morphological and IHC assessment of the components of the tumor microenvironment is a topical issue. The aim was to evaluate the IHC expression of MMP-9 and type IV collagen in metastatic choroidal melanoma.

Materials and methods. We analyzed 43 cases of choroidal melanoma T2(a,b,c)-3N0M0-1 during 2013–2017. The patients were divided into two groups: group 1 included patients with primary choroidal melanoma without distant metastases (N=25) and group 2 included patients with primary choroidal melanoma with distant liver metastases (N=18). We performed an IHC assay of the surgical samples with MMP-9 (Poly) (MMP-9) and Collagen-IV (Clone CIV 22) (Col4) antibodies. Qualitative, semi-quantitative, and quantitative parameters were evaluated with digital pathology software. We developed a semi-quantitative method for estimating the intensity of IHC expression of these markers (in scores) in choroidal melanoma.

Results. The study included 22 female and 21 male patients (51.2% and 48.8%, respectively), the average age being 60.5 years. The thickness of choroidal melanoma averaged 8.3 mm; the average diameter of the tumor was 12.3 mm. We detected strong MMP-9 expression in tumor cells and their microenvironment and remodeled collagen framework in tumors with pronounced tumor necrosis, thickness, and scleral involvement. A more pronounced expression of MMP-9 was associated with an increase in isolated type IV collagen fibers in the extracellular matrix (ECM) of the metastatic choroidal melanoma.

Conclusion. During the growth and progression of choroidal melanoma, the components of the microenvironment and tumor cells have a mutual effect with the disorganization of ECM components. Indicators of IHC expression (MMP-9, Col4) in a tumor should not be considered as a diagnostic marker of metastatic choroidal melanoma. However, they can be used in clinical practice when monitoring the course of the disease and in studying the mechanisms of remodeling of the tumor microenvironment.

Keywords: choroidal melanoma, MMP-9, type IV collagen, metastasis

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

For citation: Shamanova A.Yu., Kazachkov E.L., Panova I.E. Morphological features of the distribution of extracellular matrix components: MMP-9 and type IV collagen in metastatic choroidal melanoma. Clin. exp. morphology. 2022;11(4):25–37 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.4.25-37.

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

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

Received 12.07.2022. **Received in revised form** 27.07.2022. **Accepted** 15.09.2022.

Введение

Ранняя диагностика и прогнозирование появления отдаленных метастазов меланомы хориоидеи (МХ) являются актуальными задачами современной онкоофтальмологии и офтальмопатогистологии. Это объясняется тем, что, по данным ряда авторов, 30–60% случаев МХ в течение 10 лет ассоциировано с отдаленными метастазами вне зависимости от вида проведенного лечения [1]. Особенно перспективен поиск морфологических и иммуногистохимических прогностических маркеров метастазирования МХ уже на этапе прижизненного патологоанатомического исследования операционного материала энуклеированных глаз с опухолью. Наряду с известными клинико-мор-

фологическими и молекулярно-генетическими факторами неблагоприятного прогноза МХ в последние годы активно обсуждается роль в опухолевой прогрессии компонентов микроокружения новообразования, рассматриваемая в контексте оказываемого им влияния в качестве информационной клеточной среды [2].

Еще в 1852 году А. Келликер дал одно из первых определений понятию «ткань» как комплексу элементарных составных частей, объединенных в одно морфологическое и физиологическое целое [2–3]. К основным тканевым элементам относят клетки, межклеточное вещество (экстрацеллюлярный матрикс, ЭЦМ) и симпласты. Опухоль как субстрат патологиче-

ского процесса, характеризующегося безудержным бесконтрольным ростом, представляет своей массой не что иное как определенное сочетание тканевых элементов. Так, в доброкачественных новообразованиях выражен тканевой морфологический атипизм (отклонение от нормы) – нарушение соотношения паренхимы и стромы в сторону преобладания последней, с изменением величины и формы тканевых структур, тогда как для злокачественных новообразований (ЗНО) свойствен клеточный атипизм – полиморфизм клеток и ядер, увеличение ядерно-цитоплазматического индекса, количества митозов и прочее [4].

Важной особенностью любого ЗНО является нарушение взаимоотношений между опухолевыми клетками и его микроокружением. К последнему относятся как сопутствующий клеточный инфильтрат (лимфоциты, макрофаги, фибробласты, тучные клетки и т.д.), так и компоненты экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) – волокна (коллагеновые, эластические, ретикулярные) и основное вещество ткани.

Вместе с тем установлено, что важную роль в процессах роста и метастазирования любого ЗНО играют матриксные металлопротеиназы (ММП), которые способны участвовать в ремоделировании ЭЦМ посредством дезорганизации белков. Изменения в самом ЭЦМ могут оказывать влияние на способность опухолевых клеток к миграции, пролиферации, дифференцировке, а также своей антигенной презентации. Ремоделирование внеклеточного каркаса в ходе роста опухоли может быть объяснено процессами механосенситивности и механотрансдукции. Механосенситивность – это способность клеток воспринимать физические сигналы и механические силы из своего окружения. Механотрансдукция – процессы преобразования механических стимулов во внутриклеточный биохимический ответ, который может играть роль в патогенезе опухолевого процесса [5].

Таким образом, клетки опухоли и клеточно-стромальное окружение взаимно воздействуют друг на друга, а описание морфологических и иммуногистохимических (ИГХ) особенностей проявления нарушений тканевого гомеостаза и взаимодействия между опухолевой клеткой и ее микроокружением, формирующим премеагастатическую нишу для опухолевых клеток, может дать объяснение и возможность прогнозирования основных свойств ЗНО, таких как инвазия, метастазирование и его автономный рост (независимый от регуляторных механизмов организма).

Цель исследования – оценить иммуногистохимическую экспрессию матриксной металлопротеиназы-9 и коллагена IV типа в метастазирующей меланоме хориоидеи.

Материалы и методы

Исследован операционный материал (энуклеированные глаза) от 43 пациентов с МХ за период с 2013 по 2017 год, проходивших лечение в Челябинском област-

ном клиническом центре онкологии и ядерной медицины. В выборку вошли все случаи, соответствующие критериями включения: проведенное хирургическое лечение (энуклеация глазного яблока); верификация МХ; поражение опухолью структур заднего отрезка глаза без перехода на иридоцилиарную зону; беспигментная или крайне слабо пигментированная опухоль при оценке микропрепарата в световой микроскоп; наличие тканевого материала отдаленных гистологически верифицированных метастазов; информированное согласие пациента на проведение исследования операционного материала. В исследование не вошли случаи на основании критериев исключения: лучевое лечение МХ в анамнезе; опухоль в состоянии терапевтического патоморфоза; пигментированная опухоль при оценке микропрепарата в световой микроскоп (от умеренно до выражено пигментированной); наличие ЗНО иных локализаций в анамнезе. Прицельный отбор случаев МХ с минимальным или отсутствующим пигментом обоснован стремлением минимизировать ложноположительные результаты ИГХ исследования экспрессии маркеров. В дальнейшем из выборки были сформированы группы исследования: случаи МХ без метастазов (первичные очаги) и с отдаленными метастазами (как первичные, так и вторичные очаги ЗНО). Тканевые фрагменты метастатических очагов получены посредством их трепан-биопсии.

В ходе прижизненного патологоанатомического исследования операционного материала МХ ретроспективно проанализированы микропрепараты при окрашивании гематоксилином и эозином. Проведено уточнение гистологического варианта опухоли в соответствии с классификацией опухолей глаза Всемирной организации здравоохранения 2018 года [6], соотношения эпителиоидного и веретенноклеточного компонентов, а также параметров внутриорганного распространения опухоли (инвазии в склеру и сетчатку, наличие опухолевых эмболов, прорастание в структуры передней камеры глаза). Далее по общепринятой методике [7] с парафиновых блоков каждого исследуемого случая МХ выполнено ИГХ исследование с использованием поликлонального антитела MMP-9 (Poly) (Diagnostic BioSystems, США) и антитела к Collagen-IV (Clone CIV 22) (Dako, Дания). Анализ микропрепаратов проводили при световой микроскопии с использованием микроскопа Nikon (Токио Воэки, Япония) с оценкой области опухоли на 10 полей зрения при увеличении микроскопа $\times 400$ (диаметр поля зрения 0,65 мм). В последующем все микропрепараты были отсканированы с помощью гистосканера Pannoramic Diagnostic Scanner (3DHISTECH, Венгрия). Далее проанализирована информационная среда цифровых изображений микропрепаратов посредством прикладных компьютерных программ [8]. Программное обеспечение использовалось для полуколичественной (в баллах) и количественной оценки исследуемых ИГХ параметров (экспрессия MMP-9, Collagen-IV). Результаты

анализа оцифрованных изображений получены на основе автоматизированного программного компьютерного измерения экспрессии маркеров в заданных полях зрения тканевых фрагментов. Применялся инструмент анализа изображений Quant Center 2.0 (3DHISTECH) (с использованием модуля Cell Quant) (3DHISTECH, Венгрия), основанный на компьютерном алгоритме количественной оценки областей, задаваемых исследователем в ручном режиме (рис. 1).

Для МХ разработан полуколичественный метод оценки интенсивности экспрессии ММП-9 и Col4 (в баллах). Статистическая обработка результатов исследования проводилась в программе IBM SPSS Statistics (IBM, США). В качестве показателей описательной статистики рассчитывали медиану и квартили. Использовали методы непараметрической статистики. При сравнении двух групп исследования применяли критерий Манна–Уитни. С целью определения взаимосвязи показателей рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты

В ходе исследования выборки МХ (N=43) 1-ю группу составили случаи первичной МХ без отдаленных метастазов (N=25), 2-ю группу – первичной МХ с отдаленными метастазами в печень (N=18). Во 2-й группе исследования только в 10 случаях были доступны микропрепараты (парафиновые блоки) с тканевым материалом опухоли из вторичных очагов (метастазы МХ

в печень). В последующем во 2-й группе исследования проведен подгрупповой анализ первичных очагов МХ с метастатическими очагами этих же опухолей (n=10). Согласно международной классификации TNM, случаи МХ соответствовали T2(a,b,c) N0M0-1. Толщина МХ составляла от 7 до 15 мм, в среднем 8,3 мм, максимальный диаметр от 7,2 до 20 мм, в среднем 12,3 мм. Гистологический вариант исследованных МХ: веретенноклеточные МХ (n=13), эпителиоидноклеточные (n=13), смешанноклеточные (n=17).

Возраст пациентов в исследуемых группах составил от 41 года до 83 лет (средний возраст – 60,5 года). Женщин было 22 (51,2%), мужчин – 21 (48,8%). Медиана времени до появления метастазов составила 36 месяцев (15; 42).

Проведено ИГХ исследование с антителами к ММП-9 (Poly) и Collagen-IV. Участки микропрепарата, содержащие иммунопозитивный компонент с окрашиванием хромогеном в коричневый цвет и его оттенки, отражали экспрессию ММП-9 (при проведении реакции с антителами к ММП-9 (Poly)), коллаген IV типа (Col4) (с антителами к Collagen-IV), а иммунонегативные зоны с окрашиванием в сине-фиолетовый и оттенки синего или серого цветов. Для более достоверного качественного (визуального) определения ИГХ экспрессии ММП-9 в ткани опухоли глаза использовали программу QuPath-0.3.0 (при помощи инструмента Show channel viewer), позволяющего послойно разделить в исходном оцифрованном изображении микро-

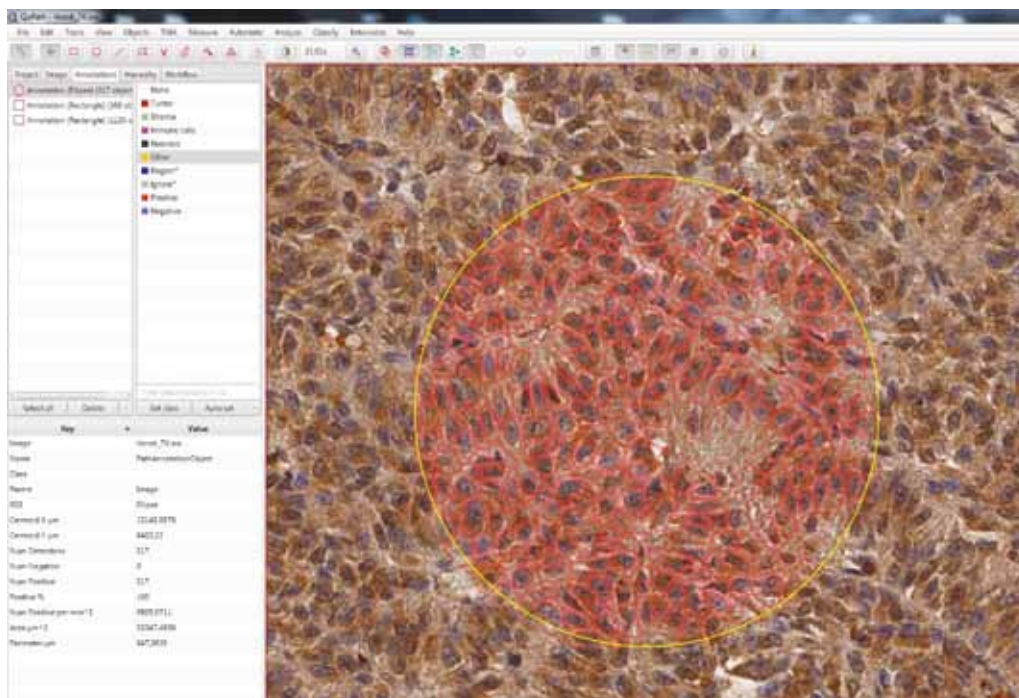


Рис. 1. Оцифрованный микропрепарат меланомы хориоидеи с выделенной областью для автоматизированной оценки экспрессии маркера ММП-9 (Poly) в опухоли с применением инструмента анализа изображений: программа QuPath-0.3.0, Quant Center 2.0 (3DHISTECH) (модуль Cell Quant), $\times 200$

Fig. 1. Digitized slide of choroidal melanoma with a selected area for automated evaluation of the MMP-9 (Poly) expression in the tumor using an image analysis tool: QuPath-0.3.0 program, Quant Center 2.0 (3DHISTECH) (Cell Quant module), $\times 200$

препарата окрашивание хромогеном (коричневый цвет) от ядерного окрашивания гематоксилином (рис. 2).

На основании анализа цифровой патологии (информационной среды оцифрованных изображений) нами разработан и проведен полуколичественный метод оценки (в баллах) экспрессии ММП-9 и Col4 в клетках опухоли и компонентах ее микроокружения.

В группах исследования нами установлены различия в экспрессии ММП-9 как по уровню интенсивности (от слабой до интенсивной), так и по локализации экспрессии (в клетках опухоли, в компонентах ее микроокружения, в клетках нормальной ткани глаза). Было обнаружено увеличение уровня экспрессии ММП-9 и ее интенсивности при выраженном тканевом

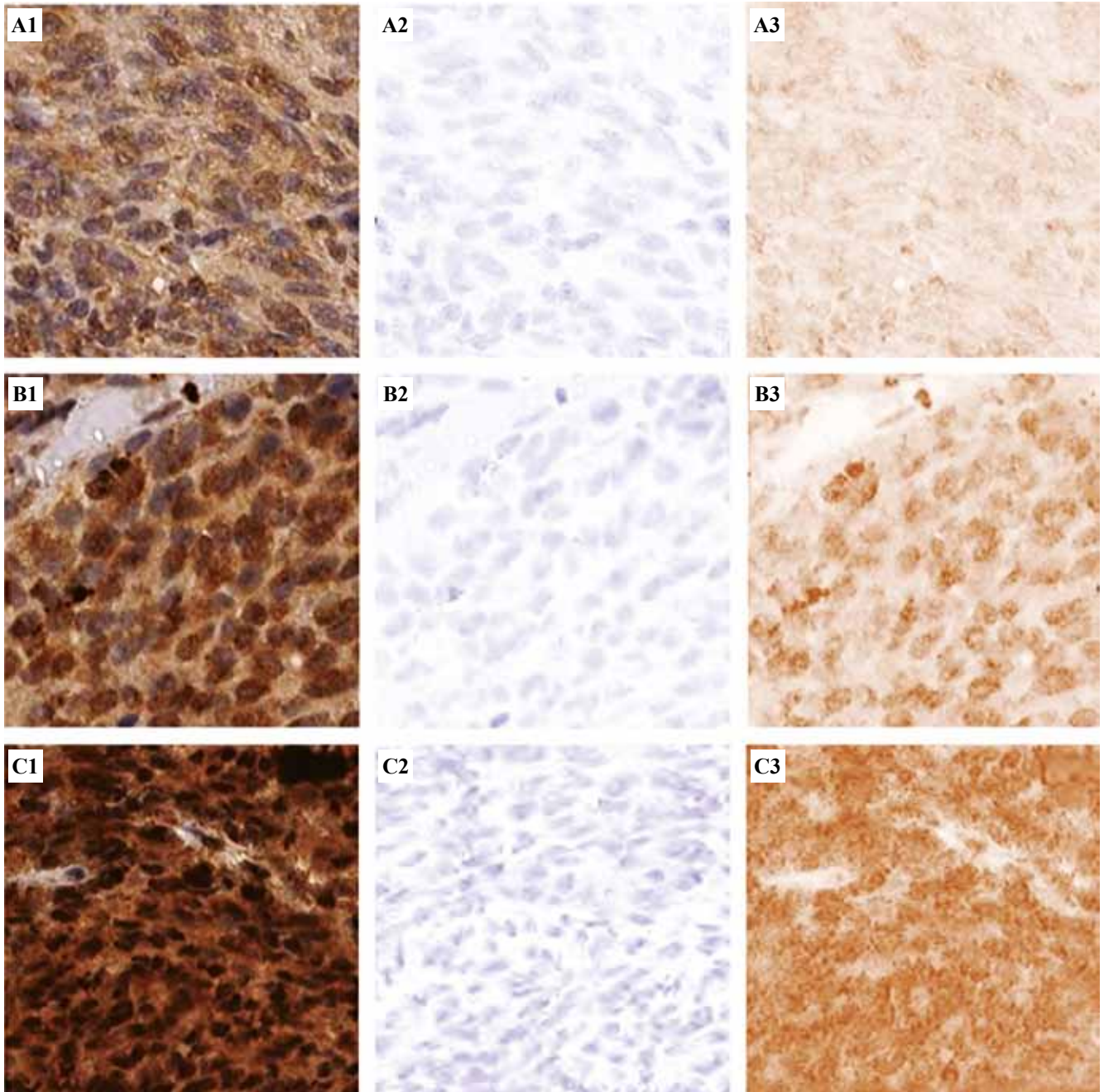


Рис. 2. Оцифрованные микропрепараты меланомы хориоидеи с экспрессией ММП-9 в опухоли трех случаев МХ (сектор А–С) с послойным разделением оцифрованных изображений (секторы А1–А2, В1–В2, С1–С2): где А, В, С – оцифрованные микропрепараты после ИГХ реакции с ММП-9 (Poly); А1, В1, С1 – отдельные изображения в окрашивании препарата только гематоксилином; А2, В2, С2 – отдельные изображения в окрашивании препарата только хромогеном, $\times 200$

Fig. 2. Digitized slides of choroidal melanoma with MMP-9 expression in tumors of three cases of choroidal melanoma (sector A–C) with layered separation of digitized images (sectors A1–A2, B1–B2, C1–C2): A, B, C – digitized slides after IHC assay with MMP-9 (Poly); A1, B1, C1 – separate images showing only hematoxylin staining; A2, B2, C2 – separate images showing only chromogen staining, $\times 200$

распаде, большом вертикальном размере опухоли (более 8 мм), инвазии опухолевых клеток в склеру. Во 2-й группе исследования случаев МХ с метастазами ММП-9 экспрессировалась преимущественно перинуклеарно в цитоплазме опухолевых клеток и более интенсивно, чем в 1-й группе исследования. Во всех случаях иммунореактивные участки были обнаружены как в опухолевых клетках, так и в компонентах стромы и микроокружения (в фибробластах), а также в компонентах нормальной ткани глаза (в сетчатке, радужной оболочке, хориоиде) (рис. 3).

В ходе полуколичественной оценки экспрессии ММП-9 на оцифрованных изображениях (рис. 2) оценивали процент интенсивно окрашенных клеток опухоли и градиент окрашивания (слабое, умеренное и интенсивное окрашивание хромогеном). Так, отсутствие иммунореактивности обозначали 0 баллов, диффузное слабое окрашивание хромогеном в цитоплазме опухолевых клеток с умеренным окрашиванием единичных клеток (до 24%) оценивали как слабую ИГХ реактивность – 1 балл (рис. 2 А2), умеренную диффузную цитоплазматическую экспрессию антигена в опухоли с интенсивной экспрессией в небольших группах клеток

(25–50%) оценивали как среднюю – 2 балла (рис. 2 В2), интенсивное окрашивание большей части опухолевых клеток более 51% отмечали как 3 балла (рис. 2 С2). Экспрессию ММП-9 в клеточном окружении и нормальных структурах глаза оценивали по локализации и интенсивности окрашивания, где 0 – нет экспрессии маркера, 1 – слабая, 2 – умеренная, 3 – интенсивная, 4 – выражено интенсивная экспрессия маркера.

ИГХ экспрессию Col4 оценивали также на основании послойного разделения оцифрованных изображений. Оценку маркера в норме проводили в стенках сосудов (рис. 4А). Наличие и объемную плотность разрозненных волокон Col4 в ЭЦМ опухоли оценивали полуколичественным и количественным методом. Полуколичественная оценка Col4 в ЭЦМ: отсутствие в строме опухоли волокон Col4 – 0 баллов, наличие единичных слабоокрашенных волокноподобных участков – 1 балл (рис. 4 В), выявление в ЭЦМ очагов с окрашенными волокнами Col4 – 2 балла (рис. 4 В1); диффузные разрозненные в ЭЦМ волокна Col4 – 3 балла (рис. 4 В2). Количественный анализ представительства разрозненных волокон Col4 проводили с использованием прикладных компьютерных

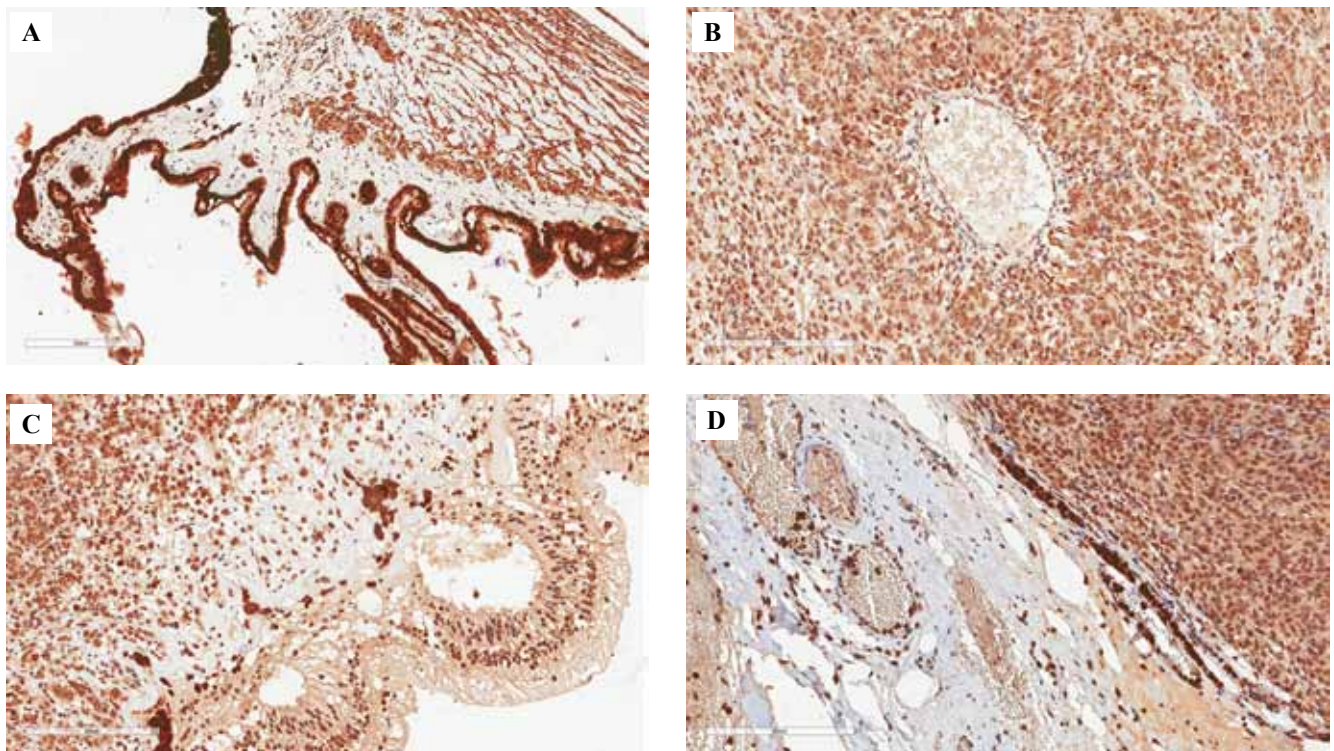


Рис. 3. Иммуногистохимическая экспрессия матриксной металлопротеиназы-9 преимущественно в цитоплазме клеток, $\times 200$.

А – в клеточно-стромальных структурах цилиарного тела глазного яблока; В – в эндотелии кровеносного интра tumorального сосуда, слабая экспрессия лимфоцитами периваскулярного инфильтрата, умеренная и интенсивная экспрессия в опухолевых клетках; С – в структурах сетчатки; D – клетками соединительной ткани в склере, в ветви вортексной вены и интраваскулярных лимфоцитах

Fig. 3. IHC expression of MMP-9 predominantly in the cytoplasm, $\times 200$.

A – in the cell-stromal structures of the ciliary body of the eyeball; B – in the endothelium of the intratumoral blood vessel, weak expression in lymphocyte perivascular infiltrate, moderate and intense expression in the tumor cells; C – in the structures of the retina; D – connective tissue cells in the sclera, branches of the vortex vein and intravascular lymphocytes

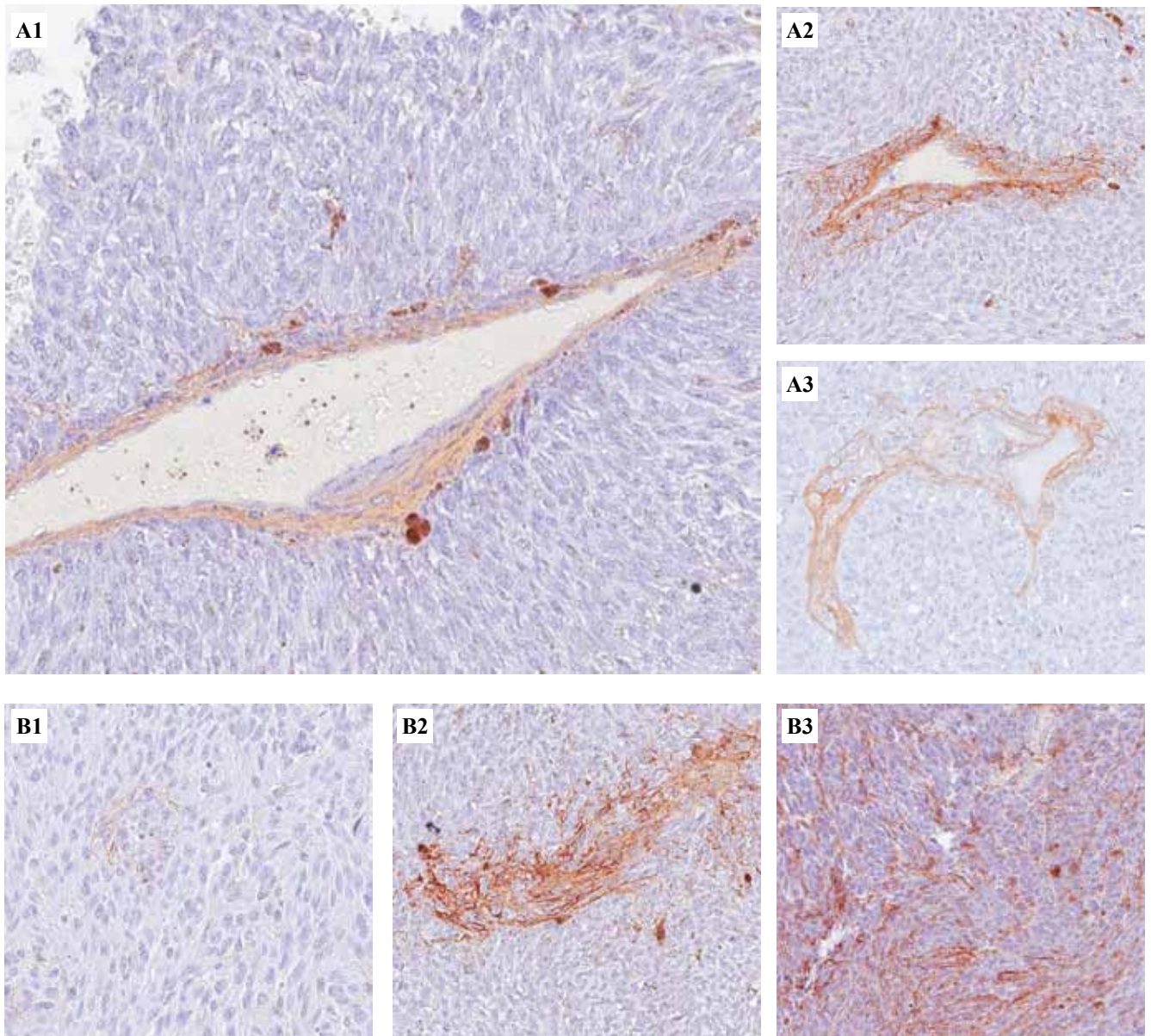


Рис. 4. Иммуногистохимическая экспрессия коллагена IV типа в сосудах опухоли (А–А2) и в ее экстрацеллюлярном матриксе (ЭЦМ) (В–В2), $\times 200$.

А1, А2 – расслоение волокон коллагена IV типа в стенке кровеносного сосуда за счет интравасциации опухолевых клеток (инвазии в стенку сосудов); В, В1, В2 – различное содержание в ЭЦМ разрозненных дезорганизованных волокон коллагена IV типа

Fig. 4. IHC expression of type IV collagen in tumor vessels (А–А2) and in their ECM (В–В2), $\times 200$.

А1, А2 – stratification of fibers of type IV collagen in the blood vessel wall due to intravasation of tumor cells (invasion into the vessel wall); В, В1, В2 – different content of scattered disorganized fibers of type IV collagen in ECM

программ с оценкой объемной плотности структур, экспрессирующих Col4.

В ходе анализа нами установлено, что ММП-9 экспрессируется в 100% образцов клетками опухоли (2–3 балла), компонентами ее клеточного и стромального микроокружения с интенсивностью от умеренной до выраженной (2–3 балла), а также компонентами нормальной ткани глаза (сетчатка, хориоидея) преимущественно умеренной интенсивности (1–3 балла) (табл.). При этом отмечено, что интенсивность экспрес-

сии ММП-9 снижалась в компонентах микроокружения МХ преимущественно в области ее «верхушки», граничащей с сетчаткой. Интенсивность экспрессии ММП-9 не была ассоциирована с клиническими характеристиками болезни. Тем не менее нами отмечено увеличение уровня экспрессии ММП-9 в опухолях с выраженным тканевым распадом, большим вертикальным размером, а также при инвазии в склеру. Кроме того, установлено, что экспрессия ММП-9 в клетках новообразования во всех образцах положительно коррелирует

Оценка интенсивности иммуногистохимической экспрессии MMP-9 и Col4 в МХ 1-й и 2-й групп исследования |
Assessment of the intensity of IHC expression of MMP-9 and Col4 in choroidal melanoma of study groups 1 and 2

Меланома хориоидеи Choroidal melanoma	ИГХ исследование IHC		
	MMP-9 (баллы), Me (Q) MMP-9 (scores), Me (Q)		разрозненные волокна Col4 (объемная плотность), Me (Q) scattered Col4 fibers (density), Me (Q)
	в клетках опухоли in tumor cells	в окружении in the microenvironment	
1 ГИ МХ Group 1 choroidal melanoma (n=25)	2 (1; 3)	2 (1; 2)	0,4 (0,2 ;1,2)
2 ГИ МХ Group 2 choroidal melanoma (n=18)	3 (2; 3)	1 (1; 2)	1,8 (1,0; 2,4)
	p=0,08	p=0,1	p=0,034*
подгруппа (метастатические очаги МХ в печени) subgroup (metastases of choroidal melanoma in the liver) (n=10)	2 (2; 3)	2 (2; 3)	0,3 (0,1; 1,0)
Инвазия в склеру обнаружена/отсутствует: 1 ГИ: n=13/n=12; 2 ГИ: n=9/n=9 Invasion of the sclera detected/absent: group 1: n=13/n=12; group 2: n=9/n=9			
1 ГИ МХ Group 2 choroidal melanoma	2 (2; 3)/2 (1; 2), p=0,07	1 (0; 2)/1 (1; 2), p=0,4	0,7 (0,2; 1,2)/0,3 (0,2; 1,2), p=0,4
2 ГИ МХ Group 2 choroidal melanoma	3 (2; 3)/2 (2; 3), p=0,004*	1 (1; 2)/1(1; 2), p=0,08	2,2 (1,0; 2,4)/1,4 (1,0; 2,4), p=0,003*
Некроз в опухоли обнаружен/отсутствует: 1 ГИ: n=9/n=16; 2 ГИ: n=5/n=13 Necrosis in the tumor is detected/absent: group 1: n=9/n=16; group 2: n=5/n=13			
1 ГИ МХ group 1 choroidal melanoma	2 (2; 3)/2 (1; 2), p=0,08	1 (0; 2)/1 (1; 2), p=0,07	0,6 (0,2; 1,2)/0,5 (0,2; 1,2), p=0,62
2 ГИ МХ group 2 choroidal melanoma	3 (2;3)/2 (2;3), p=0,032*	1 (1;2)/1 (1;2), p=0,06	2,1 (1,0; 2,4)/1,3 (1,0; 2,4), p=0,0023*
Толщина опухоли, мм Tumor thickness, mm			
7–8	2 (1; 2)	1 (1; 2)	0,5 (0,2; 2,4)
9–10	2 (1; 2)	1 (1; 2)	1,0 (0,2; 2,4)
11–12	3 (2; 3)	2 (1; 2)	1,3 (0,2; 2,4), p=0,023*

* – статистически значимые различия | statistically significant differences

ГИ – группа исследования, MMP-9 – матриксная металлопротеиназа-9, МХ – меланома хориоидеи, Col4 – коллаген 4-го типа

с содержанием данного маркера в лимфоцитах и макрофагах опухолевого микроокружения (коэффициент Спирмена, $r=0,401$; $p=0,003$).

При этом статистически значимая зависимость уровня экспрессии исследованного маркера с показателями внутриорганной распространенности опухоли и гистологическим типом ее строения не обнаружена.

Обсуждение

В отношении МХ показано, что моносомия хромосомы 3 [9] и инактивирующие мутации *VAP I* [10]

в 50% случаев увеличивают прометастатическое поведение клеток МХ и рассматриваются как неблагоприятные прогностические показатели метастазирования опухоли. Несмотря на это, главные механизмы метастазирования МХ остаются неизвестными, и как следствие отсутствуют эффективные методы лечения метастатической болезни [11].

Наряду с этим несомненным остается понимание того, что ЗНО прогрессирует в динамически изменяющемся ЭЦМ. Он представляет собой внеклеточный каркас ткани и посредством биохимических и биомеха-

нических сигналов оказывает воздействие на рост, миграцию, дифференцировку клеток образования, а также неоангиогенез и иммунный ответ в опухоли. Так, на примере эпителиальных ЗНО M.W. Pickup et al. показали, что такие биохимические и биомеханические сигналы инициируются в ходе дезорганизации ЭЦМ, способствующей росту, прогрессированию и метастазированию ЗНО [12].

M.W. Pickup et al. обнаружили, что для большинства ЗНО характерны десмопластические изменения в ткани, которые характеризуются хроническим воспалением, преобладанием активных фибробластов, повышенным ангиогенезом и реконструкцией белков ЭЦМ [12]. В эксперименте *in vivo* на мышах K.R. Levental et al. установили причинно-следственную связь между десмопластическими изменениями в ЭЦМ и злокачественной трансформацией (малигнизацией) в пренеопластической ткани [13]. Известно, что развитие инвазивной карциномы из предраковой патологии (например, карциномы *in situ*) проходит определенные этапы, каждый из которых связан с разными структурно-организационными и биомеханическими изменениями ЭЦМ. Так, на примере молочной железы продемонстрировано, что при карциноме *in situ* свой инвазивный рост опухолевые клетки начинают с реконструкции базальной мембраны и выхода за ее пределы в окружающую ткань. При этом происходит истончение базальной мембраны с потерей в ее составе белков (ламелина), а также

увеличение количества интерстициального коллагена вокруг очага [14].

После инвазии (вторжения атипичных клеток за пределы базальной мембраны в окружающую ткань) дезорганизованный ЭЦМ способствует метастазированию опухолевых клеток. Как показано Y.A. Miroshnikova et al., «жесткий» каркас ЭЦМ из пучков коллагена I типа и фибронектина способствует направленной миграции клеток ЗНО [15]. Затем происходят интравазация атипичных клеток и миграция их с током крови с последующей экстравазацией и формированием вторичных очагов опухоли. Состояние ЭЦМ будет влиять на судьбу мигрировавшей атипичной клетки: гибель посредством апоптоза, «спящее состояние» дормантной клетки или активное размножение с формированием метастатического очага опухоли [16].

В отношении МХ процессы ее метастазирования аналогично связаны с состоянием микроокружения опухоли как в первичном очаге, так и во вторичном (рис. 5).

ММП – семейство цинксодержащих эндопептидаз, которые способны регулировать биологическое поведение новообразования – апоптоз, пролиферацию, дифференцировку и миграцию клеток, а также индуцировать неоангиогенез за счет высвобождения активной формы фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) [17–19]. Отмечено участие ММП-9 (желатиназа В) в аутокринной регуляции апоптоза

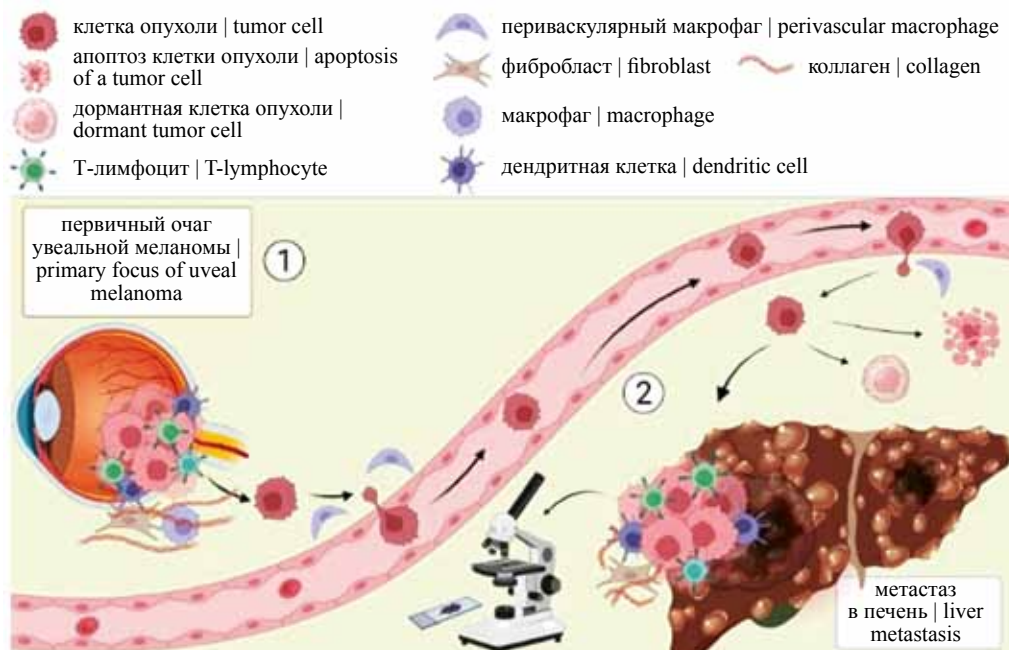


Рис. 5. Схема гематогенного метастазирования клеток увеальной меланомы в печень, где 1 – первичный очаг опухоли в глазном яблоке; 2 – печень с метастазом опухоли. На схеме отражены некоторые клеточно-стромальные компоненты микроокружения опухоли, принимающие участие в росте и прогрессировании увеальной меланомы.

Рисунок сформирован с использованием программы BioRender

Fig. 5. Schematic representation of hematogenous metastases of uveal melanoma cells to the liver, where 1 is the primary tumor focus in the eyeball; 2 is the liver with tumor metastases. The diagram shows some cellular-stromal components of the tumor microenvironment involved in the growth and progression of uveal melanoma. The drawing is created with BioRender

и клеточной пролиферации. Кроме того, ММП-9 активно участвует в разрушении коллагена базальных мембран и его денатурации, что является одним из механизмов ангиоинвазии опухоли.

Показано, что к повышению уровня ММП-9 приводит активность сигнального пути «фактор роста гепатоцитов/мезенхимально-эпителиального перехода» (hepatocyte growth factor, HGF/mesenchymal-epithelial transition factor, MET) [20]. Все это ведет к опосредованной стимуляции пролиферации, ангиогенеза и метастазирования опухоли [20]. Активация данного сигнального пути является одним из механизмов в развитии резистентности опухоли к химиотерапии [20].

Зарубежными исследователями показано, что опухолевые клетки увеальной меланомы и в первичных, и в метастатических очагах окружены фибронектином, коллагеном IV типа, ламинином. Также в эксперименте *in vitro* M. Bérubé et al. показано, что перечисленные белки формируют благоприятную микросреду для опухолевых клеток, делая их более устойчивыми в том числе к воздействию химиопрепарата (цисплатин) [21].

М.А. Чернявская и соавт. выявили взаимосвязь концентрации ММП-9 в слезной и внутриглазной жидкости при МХ и сделали вывод о возможности их исследования для оценки интенсивности локальных процессов пролиферации у пациентов с МХ [22]. Это косвенно подтверждает результаты нашего исследования, отражающие более агрессивное течение патологического процесса с преобладанием ИГХ экспрессии ММП-9 в более крупных, васкуляризованных, инвазирующих склеру увеальных меланом.

S. Zheng et al. отметили роль оценки ИГХ экспрессии ММП-9 в прогнозе немелкоклеточного рака легкого [23]. В ряде работ продемонстрировано снижение безрецидивной выживаемости у пациентов с раком толстой кишки при повышенной экспрессии ММП-9 [24–25], тогда как в раке мочевого пузыря экспрессия ММП-9 более чем в 25% клеток была рассмотрена как прогностический критерий высокой общей выживаемости (68%) и безрецидивной 5-летней выживаемости (36%) [26]. В опухолях с низкой экспрессией ММП-9 или при ее отсутствии общая выживаемость и безрецидивная 5-летняя выживаемость были меньше и составляли 48% и 19%, соответственно [26]. В меланоме кожи экспрессия ММП-9, по данным некоторых публикаций, не имела прогностического значения [27].

Несмотря на то, что ММП-9 определяется в структурах глаза при норме и патологии, Y. El-Shabrawi et al. в своей работе по исследованию экспрессии ММП-9 в увеальной меланоме показали, что ММП-9 экспрессировалась преимущественно в эпителиоидных (71,4% случаев) и эпителиоидном компоненте смешанно-клеточных увеальных меланом (67%) и в меньшем количестве в веретенчатом компоненте опухоли (10%) [28]. При этом показатели выживаемости для ММП-9 экспрессирующих меланом составили 27% против 85% случаев без экспрессии ММП-9 [28].

В ходе нашего исследования не были получены статистически значимые корреляционные связи уровня экспрессии ММП-9 в зависимости от гистологического варианта опухоли.

Тем не менее до сих пор остается мало изученной клинико-патогенетическая значимость характера экспрессии ММП-9 при метастазирующих МХ.

Полезным является исследование состава ЭЦМ и особенностей распределения его основных структурных компонентов. Коллаген IV типа (Col4) в норме обнаруживается в базальных мембранах сосудов. Нарушение архитектоники в опухоли в ходе взаимодействия атипичных клеток и микроокружения может приводить к структурному повреждению Col4. Эти процессы делают возможным проявление метастатического потенциала ЗНО.

Базальные мембраны (БМ) представляют собой плоские биологические матрицы, разделяющие тканевые компартменты в организме. Считается, что их своеобразная «листовидная» или «пластинчатая» структура является результатом ассоциации двух независимых белковых сетей – ламинина и Col4 [29]. В эксперименте показано, что ламинин индуцирует процессы сборки Col4, который наряду с фибронектином, ламинином, коллагеном I типа входит в состав стенок PAS-позитивных паттернов, сформированных в ходе васкулярной мимикрии. Коллаген I типа обнаруживается фокально и лишь в некоторых ШИК-позитивных паттернах васкулярной мимикрии, может синтезироваться опухолевыми клетками независимо от стромального ответа [30].

С целью регистрации наличия этих паттернов васкулярной мимикрии A. Thies et al. рекомендовали использовать более простое гистохимическое ШИК-окрашивание [31].

С помощью количественной ПЦР в реальном времени некоторыми авторами было показано, что клетки меланомы, склонной к метастазированию, больше продуцируют ламинин [32] и коллаген IV типа [33], а также фибронектин [32–33]. Описанные белки ЭЦМ (Col4, фибронектин) могут быть компонентами в ШИК-позитивных паттернах, сформированных при васкулярной мимикрии.

Показано, что гистогенез стромы МХ сложен и может состоять из множества паттернов, матрикс которых генерируется опухолевыми клетками в ходе процесса «васкулярной мимикрии» [30]. Утолщенные фиброваскулярные перегородки, сформированные в процессе местной реакции стромы, выявляются в меньшем количестве [30]. Они могут быть отдифференцированы от внесосудистых матричных паттернов васкулярной мимикрии на основе толщины и содержания ламинина, а также с помощью иммуногистохимии [30].

Заключение

Протеолитические ферменты имеют важное значение в прогрессировании злокачественных новообразо-

ваний. Семейство металлопротеиназ, вырабатываемых как клетками опухоли, так и ее микроокружением – макрофагами, лимфоцитами, фибробластами, компонентами экстрацеллюлярного матрикса, участвуют в разрушении внеклеточного матрикса и формируют компоненты для ремоделирования ткани. Таким образом, ММП-9 играют важную роль в процессе интраваскулярного роста и метастазирования меланомы хориоидеи. Росту и прогрессированию опухоли способствуют процессы ауторегуляции в ней с ремоделированием микроокружения.

Иммуногистохимическое исследование экстрацеллюлярного матрикса в меланомах хориоидеи (ММП-9, коллагена IV типа) позволяет выявить различия в их экспрессии в меланоме хориоидеи с отдаленными метастазами и без метастазов, а также в нормальных тканях глаза (сетчатка, хориоидея, склера). При этом их не следует считать факторами прогноза болезни и нецелесообразно рассматривать в качестве потенциального диагностического маркера метастазирования меланомы хориоидеи. Полученные результаты могут быть дополнительными к рутинному патогистологическому исследованию при выделении прогностически неблагоприятной группы и для мониторинга течения заболевания. Это намечает пути для поиска прогностических критериев метастазирования опухоли.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.Ю. Шаманова, Е.Л. Казачков, И.Е. Панова.
Сбор и обработка материала – А.Ю. Шаманова.
Написание текста – А.Ю. Шаманова.
Редактирование – А.Ю. Шаманова, Е.Л. Казачков, И.Е. Панова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A. Yu. Shamanova, E.L. Kazachkov, I.E. Panova.
Collected the data and performed the analysis – A. Yu. Shamanova.
Wrote the paper – A. Yu. Shamanova.
Edited the manuscript – A. Yu. Shamanova, E.L. Kazachkov, I.E. Panova.

Литература/References

1. Панова И.Е., Власова О.С., Гюнтнер 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, Gyuntner EI, Samkovich EV, Shamanova AYU. 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.
2. Мяделец О.Д. Основы цитологии, эмбриологии и общей гистологии: Медицинская книга. Нижний Новгород: Издательство НГМА, 2002. 361 с.
Myadelets OD. Fundamentals of cytology, embryology and general histology: Medical book. Nizhny Novgorod: Izdatel'stvo NGMA, 2002. 361 p. (In Russ.).
3. Наумова Л.А., Стародумова В.А. Экстрацеллюлярный матрикс как информационная клеточная микросреда. Бюллетень сибирской медицины. 2020;19(4):215–225. DOI: 10.20538/1682-0363-2020-4-215-225.
Naumova LA, Starodumova VA. Extracellular matrix as a cellular information microenvironment. Bulletin of Siberian Medicine. 2020;19(4): 215–225 (In Russ.). DOI: 10.20538/1682-0363-2020-4-215-225.
4. Серов В.В., Пальцев М.А., Ганзен Т.Н. Руководство к практическим занятиям по патологической анатомии. Москва: Медицина, 1998. 544 с.
Serov VV, Paltsev MA, Ganzen TN. Guide to practical classes on pathological anatomy. Moscow: Medicine, 1998. 544 p. (In Russ.).
5. Jansen KA, Donato DM, Balcioglu HE, Schmidt T, Danen EH, Koenderink GH. A guide to mechanobiology: Where biology and physics meet. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1853(11 Pt B): 3043–52. DOI: 10.1016/j.bbamer.2015.05.007.
6. HE Grossniklaus, CG Eberhart, TT Kivela (eds.). WHO Classification of tumours of the eye. Lyon: IARC Press, 2018. 4th ed. V. 12. 224 p.
7. Петров С.В., Раихлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. 4-е изд. Казань: Татмедиа, 2012. 624 с.
Petrov SV, Raikhlin NT. Guidelines for immunohistochemical diagnosis of human tumors. 4th ed. Kazan: Tatmedia, 2012. 624 p. (In Russ.).
8. Д.Л. Кумар, Л. Рудбек (ред.). Иммуногистохимические методы: Руководство. Пер. с англ. / Под ред. Г.А. Франка, П.Г. Малькова. Москва: 2011. 224 с.
GL Kumar, L Rudbeck (eds.). Immunohistochemical methods: A Guide. Translated from English / Edited by GA Frank, PG Malkov. Moscow, 2011. 224 p. (In Russ.).
9. Thomas S, Pütter C, Weber S, Bornfeld N, Lohmann DR, Zeschmigg M. Prognostic significance of chromosome 3 alterations determined by microsatellite analysis in uveal melanoma: A long-term follow-up study. *Br J Cancer.* 2012;106(6):1171–6. DOI: 10.1038/bjc.2012.54.
10. Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, Duan S, Cao L, Worley LA et al. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science.* 2010;330(6009):1410–3. DOI: 10.1126/science.1194472.
11. Landreville S, Agapova OA, Matatall KA, Kneass ZT, Onken MD, Lee RS et al. Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest and differentiation in uveal melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(2):408–16. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0946.
12. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 2014;15(12):1243–53. DOI: 10.15252/embr.201439246.
13. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell.* 2009;139(5):891–906. DOI: 10.1016/j.cell.2009.10.027.
14. Acerbi I, Cassereau L, Dean I, Shi Q, Au A, Park C et al. Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM

- stiffening and immune cell infiltration. *Integr Biol (Camb)*. 2015;(10):1120–34. DOI: 10.1039/c5ib00040h.
15. Miroshnikova YA, Rozenberg GI, Cassereau L, Pickup M, Mouw JK, Ou G et al. alpha5beta1-Integrin promotes tension-dependent mammary epithelial cell invasion by engaging the fibronectin synergy site. *Mol Biol Cell*. 2017;28(22):2958–77. DOI: 10.1091/mbc.E17-02-0126.
 16. Goddard ET, Bozic I, Riddell SR, Ghajar CM. Dormant tumour cells, their niches and the influence of immunity. *Nat Cell Biol*. 2018;20(11): 1240–9. DOI: 10.1038/s41556-018-0214-0.
 17. Герштейн Е.С., Огнерубов Н.А., Кушлинский Н.Е. Ассоциированные с опухолью протеазы и их тканевые ингибиторы. В кн.: Н.Е. Кушлинский, М.А. Красильников (ред.). Биологические маркеры опухолей: фундаментальные и клинические исследования. Москва: Издательство РАМН, 2017. С. 197–230.
Gerstein ES, Ognerubov NA, Kushlinsky NE. Tumor-associated proteases and their tissue inhibitors. In: NE Kushlinsky, MA Krasilnikov (eds.). *Biological tumor markers: basic and clinical research*. Moscow: Izdatel'stvo RAMN, 2017. P. 197–230 (In Russ.).
 18. Merchant N, Nagaraju GP, Rajitha B, Lammata SL, Jella KK, Buchwald ZS et al. Matrix metalloproteinases: Their functional role in lung cancer. *Carcinogenesis*. 2017;38(8):766–80. DOI: 10.1093/carcin/bgx063.
 19. Hieronimus B, Pfohl J, Busch C, Graeve L. Expression and characterization of membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) and its different forms in melanoma. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42(1):198–210. DOI: 10.1159/000477311.
 20. Tanaka R, Terai M, Londin E, Sato T. The role of HGF/MET signaling in metastatic uveal melanoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(21):5457. DOI: 10.3390/cancers13215457.
 21. Bérubé M, Talbot M, Collin C, Paquet-Bouchard C, Germain L, Guérin SL et al. Role of the extracellular matrix proteins in the resistance of SP6.5 uveal melanoma cells toward cisplatin. *Int J Oncol*. 2005;26(2):405–13. PMID: 15645125.
 22. Чернявская М.А., Ефремов А.В., Черных В.В., Пустоветова М.Г. Содержание матриксной металлопротеиназы-9 в слезной и внутриглазной жидкости при меланоме хориоидеи. Сибирский научный медицинский журнал. 2015;35(3):16–20. Доступно по адресу: <http://sibmed.net/article/344/3-3-2015.pdf> (получено 01.08.2022).
Chernyavskaya MA, Efremov AV, Chernykh VV, Pustovetova MG. Content of matrix metalloproteinase-9 in the lacrimal and intraocular liquids in choroidal melanoma. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2015;35(3):16–20 (In Russ.). Available from: <http://sibmed.net/article/344/3-3-2015.pdf> (accessed 01.08.2022).
 23. Zheng S, Chang Y, Hodges KB, Sun Y, Ma X, Xue Y et al. Expression of KISS1 and MMP-9 in non-small cell lung cancer and their relations to metastasis and survival. *Anticancer Res*. 2010;30(3):713–8. PMID: 20392988.
 24. Buhmeida A, Bendardaf R, Hilska M, Collan Y, Laato M, Syrjänen S et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in stage II colorectal carcinoma. *J Gastrointest Cancer*. 2009;40(3–4):91–7. DOI: 10.1007/s12029-009-9091-x.
 25. Bendardaf R, Buhmeida A, Hilska M, Laato M, Syrjänen S, Syrjänen K et al. MMP-9 (gelatinase B) expression is associated with disease-free survival and disease-specific survival in colorectal cancer patients. *Cancer Invest*. 2010;28(1):38–43. DOI: 10.3109/07357900802672761.
 26. Vasala K, Pääkko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) immunoreactive protein in urinary bladder cancer: A marker of favorable prognosis. *Anticancer Res*. 2008;28(3B):1757–61. PMID: 18630455.
 27. Väisänen AH, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. Comparison of the prognostic value of matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous melanoma. *Hum Pathol*. 2008;39(3):377–85. DOI: 10.1016/j.humpath.2007.06.021.
 28. El-Shabrawi Y, Ardjomand N, Radner H, Ardjomand N. MMP-9 is predominantly expressed in epithelioid and not spindle cell uveal melanoma. *J Pathol*. 2001;194(2):201–6. DOI: 10.1002/1096-9896(200106)194:2<201::AID-PATH840>3.0.CO;2-O.
 29. Coelho-Sampaio T, Tenchov B, Nascimento MA, Hochman-Mendez C, Morandi V, Caarls MB et al. Type IV collagen conforms to the organization of poly laminin adsorbed on planar substrata. *Acta Biomater*. 2020;111:242–53. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.05.021.
 30. Lin AY, Maniotis AJ, Valyi-Nagy K, Majumdar D, Setty S, Kadkol S et al. Distinguishing fibrovascular septa from vasculogenic mimicry patterns. *Arch Pathol Lab Med*. 2005;129(7):884–92. DOI: 10.5858/2005-129-884-DFSFVM.
 31. Thies A, Mangold U, Moll I, Schumacher U. PAS-positive loops and networks as a prognostic indicator in cutaneous malignant melanoma. *J Pathol*. 2001;195(5):537–542. DOI: 10.1002/path.988.
 32. Chen HB, Chen L, Zhung JK, Chow VW, Wu BQ, Wang ZH et al. Expression of laminin in metastatic melanoma cell lines with different metastatic potential. *Anticancer Res*. 2001;21(1A):505–8. PMID: 11299788.
 33. Daniels KJ, Boldt HC, Martin JA, Gardner LM, Meyer M, Folberg R. Expression of type VI collagen in uveal melanoma: Role in pattern formation and tumor progression. *Lab Invest*. 1996;75(1):55–66. PMID: 8683940.

Информация об авторах

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.

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

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

Author information

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>

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>

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>