

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-97-104



Иммуногистохимическое исследование увеальной меланомы и ее клеточного микроокружения

С.В. Саакян, Л.А. Катаргина, Е.Б. Мякошина, Г.П. Захарова, И.П. Хорошилова—Маслова, А.М. Майбогин
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. Гельмгольца» Минздрава России; Россия, 105062 Москва,
ул. Садовая-Черногрозская, 14/19

Контакты: Елена Борисовна Мякошина myakoshina@mail.ru

Введение. Патогенез увеальной меланомы определяется целым рядом факторов, включая молекулярно-генетические, иммунологические и др. Одним из подходов к изучению особенностей патогенеза опухолей данного типа является определение локального содержания в них отдельных субпопуляций лимфоцитов и макрофагов в сочетании с анализом пролиферативной активности опухолевых клеток.

Цель исследования – изучить иммуногистохимические особенности увеальной меланомы и ее клеточного микроокружения.

Материалы и методы. Проанализированы 24 энуклеированных глаза с увеальной меланомой (144 гистологических и 216 иммуногистохимических препаратов) без предшествующего лечения. Изучены клетки иммунного микроокружения: субпопуляции лимфоцитов и экспрессируемые макрофагами антигены CD68+ и CD163+ в строме меланомы и в 2–3 мм от нее. Определен индекс пролиферации опухолевых клеток Ki-67.

Результаты. Во всех образцах ткани увеальной меланомы выявлено наличие лимфоцитов в микроокружении опухолевых клеток. Большую часть исследуемых популяций лимфоцитов составили Т-цитотоксические CD28+–лимфоциты (абсолютное количество положительно окрашенных клеток – $607,3 \pm 431,2$; относительное – $18,84 \pm 12,12$ %) ($p = 0,018$), меньшую часть (практически в равном соотношении) – Т-хелперы CD4+, Т-цитотоксические CD8+– и CD25+–лимфоциты ($p = 0,6$). Абсолютное количество натуральных киллеров субпопуляции CD16+ оказалось ниже по сравнению с субпопуляцией CD56+ ($p = 0,05$). Однако отмечено практически равное относительное количество изучаемых субпопуляций ($p = 0,9$).

Гистологическое исследование выявило наличие в микроокружении ткани увеальной меланомы макрофагов. При иммуногистохимическом исследовании экспрессируемых противовоспалительными и проопухолевыми макрофагами антигенов CD68+ и CD163+ отмечено, что их абсолютное и относительное количество в ткани данной опухоли практически одинаковое, с небольшим преобладанием CD163+ ($p = 0,7$). Иммуногистохимический анализ показал, что в ядрах клеток меланомы в среднем содержится $575,2 \pm 388,5$ значимых клеток белка пролиферации Ki-67. Этот белок обнаружен в $16,69 \pm 10,88$ % опухолевых клеток.

Заключение. Иммуногистохимическое исследование позволяет выявить субпопуляции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, определить подтипы макрофагов и оценить индекс Ki-67 пролиферации опухолевых клеток. Полученные данные в дальнейшем дают возможность оценить значимость обнаружения отдельных субпопуляций иммунных клеток (в частности, Т-цитотоксических CD28+–лимфоцитов) в патогенезе увеальной меланомы в целях разработки таргетного воздействия, обоснования новых иммунотерапевтических подходов к лечению первичной опухоли и перепрограммирования измененных иммунных клеток.

Ключевые слова: увеальная меланома, иммуногистохимическое исследование, субпопуляции лимфоцитов, антигены макрофагов, индекс пролиферации

Для цитирования: Саакян С.В., Катаргина Л.А., Мякошина Е.Б. и др. Иммуногистохимическое исследование увеальной меланомы и ее клеточного микроокружения. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2):97–104. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-97-104.

Immunohistochemical study of uveal melanoma and its cellular microenvironment

S.V. Saakyan, L.A. Katargina, E.B. Myakoshina, G.P. Zakharova, I.P. Khoroshilova—Maslova, A.M. Maibogin
Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases; 14/19 Sadovaya-Chernogryazskaya St., Moscow 105062, Russia

Contacts: Elena Borisovna Myakoshina myakoshina@mail.ru

Introduction. Uveal melanoma pathogenesis is determined by a number of factors, including the tumor molecular genetics, the organism's immune response, and other ones. One of the approaches to studying the peculiarities of pathogenesis

of this cancer is to determine the local subpopulations of lymphocytes and macrophages in combination with the study of the proliferative activity of tumor cells.

Objective – to study the immunohistochemical features of uveal melanoma and its cellular microenvironment.

Materials and methods. 24 enucleated eyes with uveal melanoma (144 histological and 216 immunohistochemical preparations) without previous treatment were analyzed. Cells of the immune microenvironment were analyzed: lymphocyte subpopulations and CD 68+ and CD 163+ antigens expressed by macrophages in the melanoma stroma and 2–3 mm from it. The tumor cell proliferation index Ki-67 was diagnosed.

Results. All tissue samples of uveal melanoma revealed the presence of lymphocytes in the microenvironment of tumor cells. A large proportion of the studied subpopulations of lymphocytes were T-cytotoxic CD28+ lymphocytes (absolute content: 607.3 ± 431.2 , relative: $18.84 \% \pm 12.12 \%$) ($p = 0.018$). A smaller proportion, but in equal proportions, were T-helpers CD4+, T-cytotoxic CD8+ and CD25+ lymphocytes ($p = 0.6$). The absolute number of natural killer cells subpopulation CD16+ was lower compared to CD56+ ($p = 0.05$). However, an almost equal relative content of the studied subpopulations was noted ($p = 0.9$).

Histological examination revealed the presence of uveal melanoma macrophages in the microenvironment of the tissue. The immunohistochemical study of CD68+ and CD163+ antigens expressed by anti-inflammatory and pro-tumor macrophages showed that their absolute and relative content in the uveal melanoma tissue is almost the same with a slight predominance of CD163+ ($p = 0.7$). Immunohistochemical analysis showed that the nuclei of melanoma cells contain, on average, 575.2 ± 388.5 significant cells of the Ki-67 proliferation protein. This protein was found in $16.69 \pm 10.88 \%$ of tumor cells.

Conclusion. Immunohistochemical study allows to identify subpopulations of lymphocytes infiltrating the tumor, to determine the subtypes of macrophages and to estimate the Ki-67 index of tumor cell proliferation. The data obtained will make it possible to further evaluate the significance of individual immune cells (in particular, T-cytotoxic CD28+ lymphocytes) in the pathogenesis of uveal melanoma in order to develop targeted effects, substantiate new immunotherapeutic approaches to the treatment of primary tumors and reprogramming altered immune cells.

Key words: uveal melanoma, immunohistochemical study, lymphocyte subpopulations, macrophage antigens, proliferation index

For citation: Saakyan S.V., Katargina L.A., Myakoshina E.B. et al. Immunohistochemical study of uveal melanoma and its cellular microenvironment. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):97–104. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-97-104.

ВВЕДЕНИЕ

Уvealная меланома (УМ) – злокачественная опухоль, характеризующаяся ранним метастазированием [1]. В настоящее время большое внимание уделяется патогенетическим аспектам неопластического процесса [2, 3]. Одним из компонентов опухолевой прогрессии являются иммунокомпетентные клетки организма человека, перепрограммированные на рост и развитие новообразования [4, 5]. Роль опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в канцерогенезе изучается давно. Исследования продолжаются по настоящее время [6]. Терапевтические, иммуномодулирующие стратегии, нацеленные на ингибирование контрольных точек иммунитета, имеют важное значение в комбинированном лечении УМ [7]. В связи с этим изучение иммунобиологии ОИЛ с акцентом на субпопуляционный лимфоцитарный состав играют большую роль в поиске новых мишеней для противоопухолевой терапии.

Наличие в ткани УМ значительного количества опухоль-ассоциированных макрофагов (ОАМ) связано с неблагоприятным прогнозом [8]. По данным литературы, из существующих типов макрофагов проангиогенными и канцерогенными считаются макрофаги M2 [9]. Углубленное изучение ОАМ и ОИЛ дает возможность проанализировать патофизиологический механизм, связанный с наличием воспаления при УМ.

Идентификация пролиферации клеток УМ имеет важнейшее значение в выживаемости и прогнозе за-

болевания [10]. Ранее доказано, что высокий индекс клеточной пролиферации коррелирует с эпителиоидно-клеточным типом УМ и связан с более высоким риском развития метастатического поражения [11]. Анализ пролиферативной активности клеток УМ в совокупности с ОАМ и ОИЛ требует более глубокого изучения.

Цель исследования – изучить иммуногистохимические особенности УМ и ее клеточного микроокружения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы 24 энуклеированных глаза с УМ (144 гистологических и 216 иммуногистохимических препаратов) без предшествующего лечения. Возраст пациентов составил от 34 до 67 лет (в среднем $55 \pm 2,7$ года). Материал фиксировали 10 % нейтральным формалином и заливали в парафин по стандартной методике. Подготовка к патоморфологическим исследованиям включала микротомию и окрашивание парафиновых срезов (толщиной 5–6 мкм) гематоксилином, эозином и пикрофуксином по методу Ван-Гизона. Анализ гистологических препаратов выполняли с помощью микроскопической системы фирмы Leica DMRB2500 (Германия).

По данным патоморфологических исследований в 9 случаях наблюдалась эпителиоидно-клеточная УМ, в 9 – веретенклеточная типа АВ, в 6 – смешанно-

клеточная (рис. 1). Проминенция опухоли составила от 1,5 до 8,9 мм (в среднем $4,7 \pm 1,8$ мм), диаметр основания – от 1,5 до 24,5 мм (в среднем $13,4 \pm 3,3$ мм). Выявлены опухоли малых размеров (5 глаз), которые локализовались юстапапиллярно с вовлечением диска зрительного нерва, что потребовало энуклеации. Преобладали опухоли хориоидеи ($n = 20$). Опухоли иридоцилиохориоидальной зоны диагностировали у 4 пациентов. По степени пигментации меланомы были слабо ($n = 11$) или умеренно ($n = 13$) пигментированными.

Было определено наличие клеток иммунного микроокружения – лимфоцитов и макрофагов – в строме меланомы и в 2–3 мм от нее. Количественный подсчет выполняли в 10 полях зрения при 400-кратном увеличении.

Иммуногистохимические (ИГХ) исследования включали определение в ткани УМ абсолютного и относительного состава субпопуляций лимфоцитов: Т-хелперов CD4+, Т-цитотоксических CD8+, натуральных киллеров CD16+ и CD56+, Т-цитотоксических CD28+, CD25+. Также выполняли анализ экспрессируемых макрофагами антигенов CD68+ и CD163+, выявляли способность к пролиферации опухолевых клеток (на основе индекса пролиферации Ki-67).

В ходе ИГХ-исследования применяли поликлональные (CD163, CD16, CD28) и моноклональные (CD4 (клон 4B12), CD8 (клон C8/144B), CD56 (клон 123C3), CD 68 (клон KP1), CD25 (клон IL2R. 1)) мышиные антитела к человеческим антигенам в рабочем разведении для использования в стейнере Avtosteiner Link 48 (Dako, Дания).

Для выявления маркера пролиферации клеток Ki-67 применяли моноклональные мышиные антитела к человеческим Ki-67 антигенам (клон MIB-1). Клеточный пролиферативный индекс экспрессии Ki-67 (MIB-1) вычисляли путем определения процентного соотношения Ki-67-положительных клеточных ядер меланомы к общему количеству ядер клеток опухоли, подсчитанных при 400-кратном увеличении. Подсчет

проводился для клеточной популяции, насчитывающей не менее 1 тыс. клеток (не менее чем в 2 случайных полях зрения). В качестве системы детекции использовали систему EnVisionFlex (Dako, Дания).

Были проанализированы 216 ИГХ-препаратов. Для каждого случая изготавливали срезы толщиной 4 мкм для нанесения первичных антител и реагента негативного контроля. После депарафинизации и демаскировки антигенов ИГХ-исследование проводили в автоматическом режиме в автостейнере Dako-Link 48.

Анализировали срезы с ИГХ-реакцией, оценивали количество положительно окрашенных иммунных клеток и определяли их долю от общего числа иммунных клеток в 10 полях зрения. Положительным считали точечное или линейное, темно-коричневое, полное или частичное мембранное окрашивание клеток.

Статистические расчеты проводили в пакетах программ для Windows (Microsoft Excel, Statistica 12.5). Применяли t-критерий Стьюдента, критерии Фишера и χ^2 , уровень статистической значимости ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Согласно результатам патоморфологических исследований во всех образцах ткани УМ в микроокружении опухолевых клеток наблюдались лимфоциты. Они представляли собой клетки округлой формы с наличием круглого ядра и светлой узкой цитоплазмы (рис. 2, а). Иммуногистохимическое исследование выявило наличие различных субпопуляций лимфоцитов в микроокружении УМ. При этом большую их часть составили Т-цитотоксические CD28+-лимфоциты (абсолютное количество положительно окрашенных клеток – $607,3 \pm 431,2$; относительное количество – $18,84 \pm 12,12$ %) ($p = 0,018$) (рис. 2, б).

Меньшими долями, но в равном соотношении, были представлены Т-хелперы CD4+, Т-цитотоксические CD8+- (рис. 2в, г) и CD25+- (рис. 2, д) лимфоциты. Их абсолютное количество составило $387,6 \pm 362,5$; $409,4 \pm 383,9$ и $371,9 \pm 332,6$ положительно

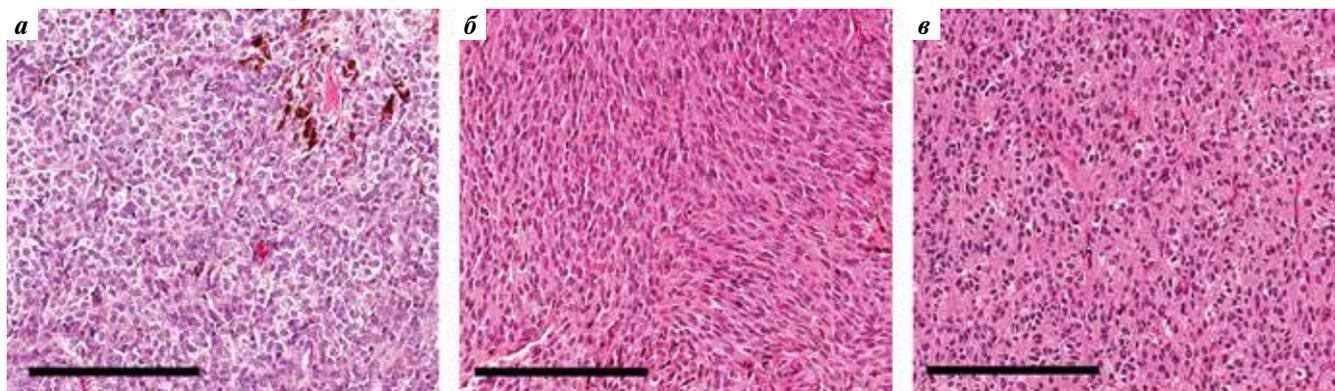


Рис. 1. Патоморфологические типы увеальной меланомы: а – эпителиоидно-клеточный; б – веретенноклеточный; в – смешанно-клеточный. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$. Шкала 200 мкм

Fig. 1. Pathomorphological types of uveal melanoma: a – epithelioid cell; б – spindle cell; в – mixed cell. Stained with hematoxylin and eosin. $\times 100$. Scale 200 microns

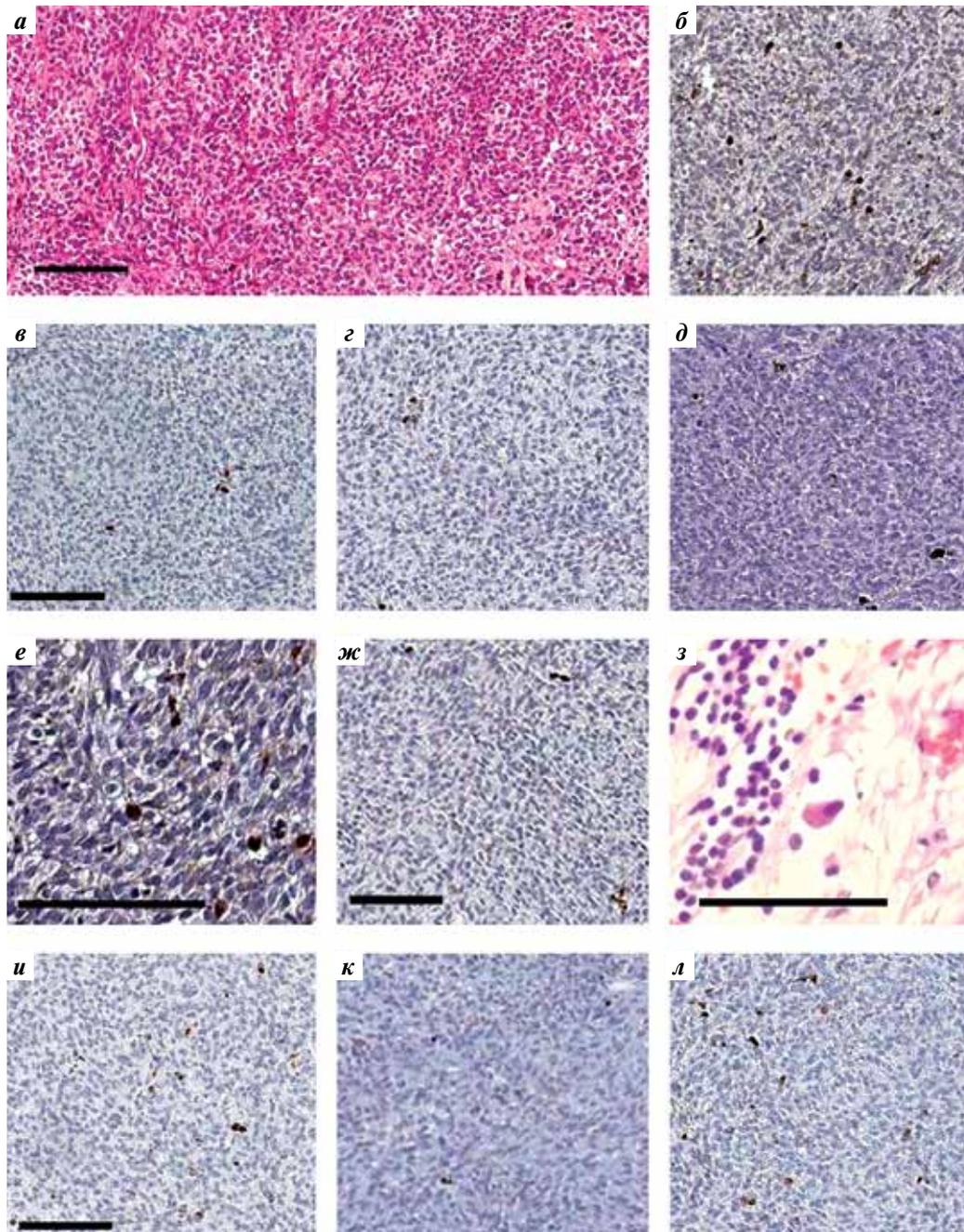


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование образцов увеальной меланомы (УМ): а – лимфоидный инфильтрат в ткани УМ (окраска гематоксилином и эозином; $\times 100$); б – положительная иммуногистохимическая (ИГХ) реакция с антителами CD28 для выявления Т-цитотоксических CD28⁺-лимфоцитов в ткани УМ ($\times 100$); в – положительная ИГХ-реакция с антителами CD4 для выявления Т-хелперов CD4⁺-лимфоцитов в ткани УМ ($\times 100$); г – положительная ИГХ-реакция с антителами CD8 для выявления Т-цитотоксических CD8⁺-лимфоцитов в ткани УМ ($\times 100$); д – положительная ИГХ-реакция с антителами CD25 для выявления CD25⁺-лимфоцитов в ткани УМ ($\times 100$); е – положительная ИГХ-реакция с антителами CD16 для выявления натуральных киллеров CD16⁺ в ткани УМ ($\times 200$); ж – положительная ИГХ-реакция с антителами CD56 для выявления натуральных киллеров CD56⁺ в ткани УМ ($\times 100$); з – макрофаг в ткани УМ (окраска гематоксилином и эозином; $\times 200$); и – положительная ИГХ-реакция с антителами CD68 для выявления макрофагов CD68⁺ в ткани УМ ($\times 100$); к – положительная ИГХ-реакция с антителами CD163 для выявления макрофагов CD163⁺ в ткани УМ; л – положительная ИГХ-реакция с антителами к белку пролиферации Ki-67 в ткани УМ ($\times 100$). Шкала 100 мкм

Fig. 2. Immunohistochemical study of uveal melanoma (UM) samples: a – lymphoid infiltrate in the UM tissue (staining with hematoxylin and eosin; $\times 100$); б – positive immunohistochemical (IHC) reaction with antibodies CD28 for the detection of T-cytotoxic CD28⁺ lymphocytes in the tissue UM ($\times 100$); в – positive IHC reaction with antibodies CD4 for the detection of T-helpers CD4⁺ lymphocytes in the tissue UM ($\times 100$); г – positive IHC reaction with CD8 antibodies to detect T-cytotoxic CD8⁺ lymphocytes in the UM tissue ($\times 100$); д – positive IHC reaction with antibodies CD25 for the detection of CD25⁺ lymphocytes of tissue UM ($\times 100$); е – positive IHC reaction with antibodies CD16 for the detection of natural killer cells CD16⁺ in the tissue UM ($\times 200$); ж – positive IHC reaction with antibodies CD56 for the detection of natural killer cells CD56⁺ in the tissue UM ($\times 100$); з – macrophage in the tissue UM ($\times 300$; staining with hematoxylin and eosin); и – positive IHC reaction with antibodies CD68 for the detection of macrophages CD68⁺ in the tissue UM ($\times 100$); к – positive IHC reaction with antibodies CD163 for the detection of macrophages CD163⁺ in the tissue of the UM ($\times 100$); л – positive IHC reaction with antibodies to the proliferation protein Ki-67 in the UM tissue ($\times 100$). Scale 100 microns

Таблица 1. Иммуногистохимическое исследование субпопуляций лимфоцитов в ткани увеальной меланомы

Table 1. Immunohistochemical study of lymphocyte subpopulations in uveal melanoma tissue

| Субпопуляция лимфоцитов Lymphocyte subpopulation | Абсолютное количество положительно окрашенных клеток субпопуляций лимфоцитов, M ± m (мин.—макс.) Absolute number of lymphocyte subpopulations, M ± m (min—max) | Относительное количество субпопуляций лимфоцитов (%), M ± m, (мин.—макс.) Relative number of lymphocyte subpopulations, %, M ± m (min—max) |
|---|---|--|
| Т-хелперы CD4+ T-helpers CD4+ | 387,6 ± 362,5 (5–2500) | 8,18 ± 4,45 (2,80–20,91) |
| Т-цитотоксические CD8+ T-cytotoxic CD8+ | 409,4 ± 383,9 (3–1600) | 7,59 ± 4,96 (0–16,26) |
| Т-цитотоксические CD28+ T-cytotoxic CD28+ | 607,3 ± 431,2 (11–1920) | 18,84 ± 12,12 (3,17;42,02) |
| CD25+ | 371,9 ± 332,6 (5–1800) | 8,19 ± 4,52 (2,59–17,36) |
| Натуральные киллеры CD16+ Natural killers CD16+ | 394,3 ± 387,1 (4–1520) | 9,77 ± 6,07 (1,84–25,04) |
| Натуральные киллеры CD56+ Natural killers CD56+ | 466,8 ± 436,6 (2–1600) | 9,02 ± 4,71 (1,12–14,93) |

Таблица 2. Иммуногистохимическое исследование экспрессируемых макрофагами антигенов CD68+ и CD163+ в ткани увеальной меланомы

Table 2. Immunohistochemical study of CD68+ and CD163+ antigens expressed by macrophages in uveal melanoma tissue

| Вид макрофагов Type of macrophages | Абсолютное количество различных видов макрофагов положительно окрашенных клеток, M ± m (мин.—макс.) The absolute number of different types of macrophages in uveal melanoma tissue, M ± m (min—max) | Относительное количество различных видов макрофагов, %, M ± m (мин.—макс.) Relative content of different types of macrophages in the uveal melanoma tissue, %, M ± m (min—max) |
|--|---|---|
| M2-макрофаги CD68+ M2 macrophages CD68+ | 457,2 ± 381,8 (4–1530) | 10,52 ± 5,58 (1,67–24,59) |
| M2-макрофаги CD163+ M2 macrophages CD163+ | 461,6 ± 376,9 (4–2100) | 11,20 ± 7,89 (0–30,61) |

окрашенных клеток соответственно, относительное количество – 8,18 ± 4,45; 7,59 ± 4,96 и 8,19 ± 4,52 % соответственно ($p = 0,6$).

Анализ 2 субпопуляций натуральных киллеров CD16+ и CD56+ показал, что абсолютное количество CD16+ оказалось ниже по сравнению с CD56+ ($p = 0,05$) (рис. 2, e, ж; табл. 1). Однако отмечено отсутствие статистически значимых различий в относительном количестве этих субпопуляций ($p = 0,9$).

Гистологическое исследование выявило наличие в микроокружении ткани УМ макрофагов. При окраске гематоксилином и эозином они представляли собой клетки небольших размеров, как правило, овальной формы с четкими границами и глубокими складками оболочки с эксцентрично расположенным ядром (рис. 2з). Согласно данным ИГХ-исследования экспрессируемых противовоспалительными и проопухолевыми макрофагами антигенов CD68+ и CD163+ их абсолютное и относительное содержание в ткани УМ было практически одинаковым, с небольшим преобладанием CD163+ ($p = 0,7$) (рис. 2, и, к; табл. 2).

В ходе ИГХ-исследования о наличии белка пролиферации Ki-67 в ядрах клеток меланомы свидетельствовало коричневое окрашивание на фоне светло-голубых опухолевых клеток (рис. 2л). В 10 полях зрения выявлено в среднем 575,2 ± 388,5 значимых клеток. Это составило 16,69 ± 10,88 % относительного количества опухолевых клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Увеальная меланوما – злокачественная опухоль, в патогенезе которой большую роль играют молекулярно-генетические мутации, запускающие неадекватный иммунный ответ организма [12]. Злокачественный неопластический процесс приводит к метастазированию [13]. Несмотря на то, что существуют различные стратегии лечения УВ, ни одна из них не показала увеличения показателей общей выживаемости [14–16]. Это обуславливает необходимость поиска новых терапевтических мишеней.

Исследованию «воспалительного» клеточного микроокружения опухоли посвящен ряд работ [17–19].

Большую роль в неоангиогенезе, пролиферации, прогрессировании новообразования и неблагоприятном витальном прогнозе при УМ играет наличие лимфоцитарного и макрофагального инфильтратов [20–24]. В связи с этим особое внимание уделяют иммунофенотипированию лимфоцитарного инфильтрата в микроокружении опухоли [25]. По мнению ученых, инфильтрация ткани меланомы CD4+ и CD8+-Т-лимфоцитами оказывает прямое цитотоксическое воздействие на клетки опухоли [26]. По данным литературы проангиогенными и канцерогенными свойствами обладают макрофаги M2 [9]. Некоторые исследователи считают, что наличие в ткани УМ значительного количества опухоль-инфильтрирующих макрофагов связано с неблагоприятным прогнозом [8]. Содержание в ткани меланомы макрофагов CD68+ подтверждено, хотя их значимость в витальном прогнозе разноречива [27].

Наши комплексные ИГХ-исследования, проведенные впервые в России, показали наличие ОИЛ и ОАМ во всех изученных образцах слабо и умеренно пигментированных форм первичной УМ. Было выявлено, что в основном встречаются CD28+-лимфоциты, реже – Т-хелперы CD4+, Т-цитотоксические CD8+- и CD25+-лимфоциты (в равном соотношении). Также в микроокружении опухоли обнаружено больше CD56+ натуральных киллеров по сравнению с CD16+.

Иммуногистохимическое исследование макрофагов показало практически одинаковое содержание CD68+ и CD163+.

Ранними событиями канцерогенеза являются нарушение механизмов пролиферации и апоптоза клеток

[25]. Одним из методов определения пролиферативной активности опухоли служит подсчет индекса Ki-67 [28]. Его пограничные значения различаются в зависимости от локализации опухоли. В случае меланоцитарных новообразований индекс Ki-67 менее 10 % свидетельствует о низком уровне пролиферации, 10–20 % – о пограничном уровне, более 20 % – о высоком уровне [28]. Иммунореактивность Ki-67 коррелирует с доброкачественностью или злокачественностью меланоцитарных поражений [29]. Проведенное ИГХ-исследование показало наличие $16,69 \pm 10,88$ % клеток с положительной реакцией с Ki-67 в ткани УМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммуногистохимическое исследование позволило выявить в ткани слабо и умеренно пигментированной УМ наличие субпопуляций лимфоцитов со значительным преобладанием Т-цитотоксических CD28+-лимфоцитов. Наблюдалось практически одинаковое количество экспрессируемых противовоспалительными и проопухолевыми макрофагами антигенов CD68+ и CD163+. Иммуногистохимическое исследование белка пролиферации Ki-67 в ядрах клеток меланомы показало, что он содержится в $16,69 \pm 10,88$ % опухолевых клеток. Полученные данные позволяют в дальнейшем оценить значимость отдельных иммунных клеток (в частности, субпопуляции Т-цитотоксических CD28+-лимфоцитов) в патогенезе УМ с целью разработки таргетного воздействия, обоснования новых иммунотерапевтических подходов к лечению первичной опухоли и перепрограммирования измененных иммунных клеток.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бровкина А.Ф., Панова И.Е., Саакян С.В. Офтальмоонкология: новое за последние два десятилетия. Вестник офтальмологии 2014;130(6):13–9. [Brovkina A.F., Panova I.E., Saakyan S.V. Ophthalmic oncology: new over the past two decades. Vestnik oftal'mologii = Ophthalmology bulletin 2014;130(6): 13–9. (In Russ.)].
2. Саакян С.В., Балацкая Н.В., Катаргина Л.А. и др. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при увеальной меланоме. Медицинская иммунология 2019;21(4):765–72. [Saakyan S.V., Balatskaya N.V., Katargina L.A. et al. Subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in uveal melanoma. Meditsinskaya immunologiya = Medical immunology 2019;21(4):765–72. (In Russ.)].
3. Саакян С.В., Амирян А.Г., Цыганков А.Ю. и др. Клинические, патоморфологические и молекулярно-генетические особенности увеальной меланомы с высоким риском метастазирования. Российский офтальмологический журнал 2015;8(2):47–52. [Saakyan S.V., Amiryany A.G., Tsyganov A.Yu. et al. Clinical, pathological and molecular genetic features of uveal melanoma with a high risk of metastasis. Rossiyskiy oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal 2015;8(2):47–52. (In Russ.)].
4. Fidler I.J., Kim S.J., Langley R.R. The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis. J. Cell Biochem 2007;101(4): 927–36. DOI: 10.1002/jcb.21148.
5. Саакян С.В., Захарова Г.П., Мякошина Е.Б. Тучные клетки в микроокружении увеальной меланомы. Архив патологии 2019;81(6):63–70. [Saakyan S.V., Zakharova G.P., Myakoshina E.B. Mast cells in the microenvironment of uveal melanoma. Arkhiv patologii = Archive of pathology 2019;81(6):63–70. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/patol20198106163.
6. Johansson J., Siarov J., Kiffin R. et al. Presence of tumor-infiltrating CD8+ T cells and macrophages correlates to longer overall survival in patients undergoing isolated hepatic perfusion for uveal melanoma liver metastasis. Oncoimmunology 2020;10(9):1854519. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1854519.
7. Lee N., Zarka L.R., Mihm M.C. Jr. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes in melanoma prognosis and cancer

- immunotherapy. *Pathology* 2016;48(2):177–87.
DOI: 10.1016/j.pathol.2015.12.006.
8. Bronkhorst I.H., Ly L.V., Jordanova E.S. et al. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;3;52(2):643–50.
DOI: 10.1167/iovs.10-5979.
 9. Toivonen P., Mäkitie T., Kujala E. et al. Microcirculation and tumor-infiltrating macrophages in choroidal and ciliary body melanoma and corresponding metastases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(1):1–6.
DOI: 10.1167/iovs.03-0622.
 10. Mooy C.M., de Jong P.T., Van der Kwast T.H. et al. Ki-67 immunostaining in uveal melanoma. The effect of pre-enucleation radiotherapy. *Ophthalmology* 1990;97(10):1275–80.
DOI: 10.1016/s0161-6420(90)32420-x.
 11. Al-Jamal R.T., Kivela T. Ki-67 immunopositivity in choroidal and ciliary body melanoma with respect to nucleolar diameter and other prognostic factors. *Curr Eye Res* 2006;31(1):57–67.
DOI: 10.1080/02713680500478535.
 12. Tian T., Olson S., Whitacre J. et al. The origins of cancer robustness and evolvability. *Integr Biol* 2011;3(1):17–30.
DOI: 10.1039/c0ib00046a.
 13. Lane A.M., Kim I.K., Gragoudas E.S. Survival rates in patients after treatment for metastasis from uveal melanoma. *JAMA Ophthalmol* 2018;136(9):981–6.
DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2018.2466.
 14. Rantala E.S., Hernberg M., Kivela T.T. Overall survival after treatment for metastatic uveal melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Melanoma Res* 2019;29(6):561–8.
DOI: 10.1097/CMR.0000000000000575.
 15. Hept M.V., Heinzerling L., Kähler K.C. et al. Prognostic factors and outcomes in metastatic uveal melanoma treated with programmed cell death-1 or combined PD-1/cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 inhibition. *Eur J Cancer* 2017;82:56–65.
DOI: 10.1016/j.ejca.2017.05.038.
 16. Roma-Rodrigues C., Mendes R., Baptista P.V. et al. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2019;20(4):840.
DOI: 10.3390/ijms20040840.
 17. Bronkhorst I.H.G., Jager M.J. Uveal melanoma: the Inflammatory microenvironment. *J Innate Immunity* 2012;4:454–62.
DOI: 10.1159/000334576.
 18. Саакян С.В., Захарова Г.П., Мякошина Е.Б. Клеточное микроокружение увеальной меланомы: клинико-морфологические корреляции и предикторы неблагоприятного прогноза. *Молекулярная медицина* 2020;18(3):27–33. [Saakyan S.V., Zakharova G.P., Myakoshina E.B. Cellular micro-environment of uveal melanoma: clinical and morphological correlations and predictors of poor prognosis. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine* 2020;18(3):27–33. (In Russ.)]. DOI: 10.29296/24999490-2020-03-04.
 19. Франк Г.А., Кузнецова О.А., Завалишина Л.Э. и др. Исследование PD-L1-статуса рака молочной железы с использованием моноклонального антитела SP142 и перспективы для определения лечебной тактики. *Архив патологии* 2019;81(5):5–10. [Frank G.A., Kuznetsova O.A., Zavalishina L.E. et al. Investigation of PD-L1-status of breast cancer using monoclonal antibody SP142 and prospects for determining therapeutic tactics. *Arkhiv patologii = Archive of pathology* 2019;81(5):5–10. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/patol2019810515.
 20. Oble D.A., Loewe R., Yu P. et al. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun* 2009;9(1):3.
 21. McLean I.W., Saraiva V.S., Burnier M.N. Pathological and prognostic features of uveal melanomas. *Can J Ophthalmol* 2004;39:343–50.
DOI: 10.1016/s0008-4182(04)80004-8.
 22. Qin Y., Bollin K., Petaccia de Macedo M. et al. Immune profiling of uveal melanoma identifies a potential signature associated with response to immunotherapy. *J Immunother Cancer* 2020;8(2):e000960.
DOI: 10.1136/jitc-2020-000960.
 23. Krishna Y., McCarthy C., Kalirai H. et al. Inflammatory cell infiltrates in advanced metastatic uveal melanoma. *Human Pathology* 2017;66:159–66.
DOI: org/10.1016/j.humphath.2017.06.005.
 24. Ly L.V., Bronkhorst I.H.G., van Beelen E. et al. Inflammatory cytokines in eyes with uveal melanoma and relation with macrophage infiltration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(11):5445–51.
DOI: 10.1167/iovs.10-5526.
 25. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420(6917):860–7. DOI:10.1038/nature01322.
 26. Tobal K., Deuble K., Mccartney A. et al. Characterization of cellular infiltration in choroidal melanoma. *Melanoma Res* 1993;3(1):63–5. DOI: 10.1097/00008390-199304000-00009.
 27. Mantovani A. Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines. *Lab Invest* 1994;71(1):5–16.
 28. Sun X., Kaufman P.D. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma* 2018;127(2):175–86. DOI:10.1007/s00412-018-0659-8.
 29. Новикова И.А., Максимова Н.А., Позднякова В.В. и др. Некоторые иммуногистохимические особенности меланоцитарных образований кожи. *Современные проблемы науки и образования* 2016;5:1–8. [Novikova I.A., Maksimova N.A., Pozdnyakova V.V. et al. Some immunohistochemical features of skin melanocytic formations. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education* 2016;5:1–8. (In Russ.)].

Благодарность. Авторы выражают благодарность д.м.н., профессору, академику РАН, заслуженному деятелю науки Российской Федерации Г.А. Франку и д.б.н., профессору кафедры патологической анатомии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России Л.Э. Завалишиной за помощь в проведении исследований, научное консультирование и научное редактирование статьи.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to G.A. Frank, MD, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Honored Scientist of the Russian Federation, and L.E. Zavalishina, PhD, Professor of the Department of Pathological Anatomy of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia for assistance in conducting research and scientific consulting and scientific editing of the article.

Вклад авторов

С.В. Саакян, Л.А. Катаргина, И.П. Хорошилова—Маслова: разработка концепции и дизайна исследования;

Е.Б. Мякошина: разработка концепции и дизайна исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка полученных данных, написание текста статьи, редактирование статьи;

Г.П. Захарова: разработка концепции и дизайна исследования, сбор и обработка материала, редактирование статьи;

А.М. Майбогин: редактирование статьи.

Authors' contribution

S.V. Sahakyan, L.A. Katargina, I.P. Khoroshilova–Maslova: development of the concept and design of the study;
E.B. Myakoshina: development of the concept and design of the study, collection and processing of the material, statistical processing of the data obtained, article writing, article editing;
G.P. Zakharova: development of the concept and design of the study, collection and processing of material, article editing;
A.M. Maybogin: article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.В. Саакян / S.V. Saakyan: <https://orcid.org/0000-0001-8591-428X>
Л.А. Катаргина / L.A. Katargina: <https://orcid.org/0000-0002-4857-0374>
Е.Б. Мякошина / E.B. Myakoshina: <https://orcid.org/0000-0002-2087-7155>
Г.П. Захарова / G.P. Zakharova: <https://orcid.org/0000-0002-0824-534X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients gave written informed consent to participate in the study.