

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
дополнительного профессионального образования
«Российская медицинская академия непрерывного профессионального
образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

ЦЫБИКОВА НАТАЛЬЯ ДАШАЗЭГБЭЕВНА

**«Меланома хориоидеи и микроРНК как биомаркер
ее прогрессирования»**

3.1.5. Офтальмология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Доктор медицинских наук,
профессор, академик РАН
Бровкина Алевтина Федоровна

Москва 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
Глава 1.Обзор литературы.....	14
1.1. Эпидемиология внутриглазной меланомы с учетом ее топографии.....	14
1.1.2. Клинико-морфологическая характеристика меланомы хориоидеи и особенности ее метастазирования.....	14
1.2. МикроРНК как эпигенетический контроль роста опухоли..	19
1.2.1. История вопроса	19
1.2.2. Функциональное значение микроРНК в жизнедеятельности человека и в онкогенезе.....	21
1.2.3. Роль микроРНК в метастазировании увеальной меланомы..	27
Глава 2. Материалы и методы	34
2.1. Общая характеристика собственных наблюдений.....	34
2.2. Методы исследования больных.....	37
2.3. Лабораторные методы исследования.....	40
2.3.1. Подготовка клинических проб.....	40
2.3.2. Методика ПЦР в режиме реального времени.....	41
2.4. Статистическая обработка результатов исследования...	43
Глава 3.Результаты собственных исследований и их обсуждение.....	44
3.1. Особенности клинической картины больных меланомой хориоидеи и факторы риска ее прогрессирования.....	44
3.2. Меланома хориоидеи и микроРНК.....	49
3.2.1. Характер изменения экспрессии микроРНК в плазме крови больных меланомой хориоидеи.....	49
3.2.2. Размеры меланомы хориоидеи и уровень экспрессии микроРНК в плазме крови больных.....	56
3.2.3. Особенности распределения микроРНК с учетом локализации опухоли в сосудистой оболочке глаза.....	69
3.2.4. Изменение уровня микроРНК в плазме крови больных меланомой хориоидеи с учетом морфологической характеристики опухоли.....	74
Заключение.....	80
Выводы.....	83
Практические рекомендации.....	83
Список литературы.....	85

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

УМ	- увеальная меланома
МХ	- меланома хориоидеи
РНК	- рибонуклеиновая кислота
мРНК	- матричная РНК
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
при-микроРНК(pri-irNA)	- первичный транскрипт микроРНК
пре-микроРНК(pre-irNA)	- шпилька-предшественник микроРНК
RISC	-(от англ. RNA-Induced Silencing Complex) мультибелковый комплекс РНК- индуцированный рибонуклеопротеиновый комплекс выключения гена
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
Cq	- значение порогового цикла ПЦР реакции
dCq	- значение разницы пороговых циклов ПЦР реакций
НЭ	- нейроэпителий
ОКТ	- оптическая когерентная томография
ОНЭ	- отслойка нейроэпителия
ПЭ	- пигментный эпителий
УЗИ	- ультразвуковое исследование
ФАГ	- флюоресцентная ангиография
Ув.	- увеличение

Введение

Актуальность темы диссертации

Уvealная меланома (УМ) – наиболее частая злокачественная опухоль сосудистой оболочки глаза меланоцитарного происхождения. По локализации УМ представлена: меланомой радужки, меланомой цилиарного тела и меланомой хориоидеи (МХ) [19, 92, 150]. До 90% опухолей локализуется в хориоидее [2, 113], а частота ее в радужке и цилиарном теле в целом достигает 10%.

Показатели заболеваемости УМ по данным литературы значительно разнятся, но в мире, в целом, ежегодно около 7000 новых зарегистрированных случаев УМ [70]. Частота выявления в Европе составляет 10,9 случаев на 1 миллион населения в год, и этот показатель с юга на север увеличивается. К примеру, в Испании и Италии, в среднем, выявляют 2 человека на 1 миллион населения в год, а в Норвегии и Дании - 9 человек на 1 миллион населения в год [131]. Заболеваемость УМ в Африке и Корее ниже - 0,2 и 0,6 случаев соответственно, на 1 миллион населения [102]. В США в среднем 5,2 на 1 миллион населения в год [24, 36]. Показатели заболеваемости УМ в России колеблются в пределах 10 - 12 человек на 1 миллион *взрослого* населения в год [3, 7, 8].

Многолетними клиническими наблюдениями подтверждены факторы риска развития гематогенных метастазов: старший возраст пациента, большие размеры опухоли, локализация в зоне экватора вне зависимости от распространения на цилиарное тело. Из морфологических характеристик выделяют, как наиболее злокачественный эпителиоидноклеточный тип опухоли. Принято считать, что наличие двух факторов риска и больше свидетельствуют в пользу наличия метастазов [4, 113]. МХ метастазирует гематогенным путем, органом-мишенью является печень (92%), в легких метастазы развиваются позднее и встречаются реже (29%) [15, 21, 42, 47]. Известно, что от метастазов в органы-мишени в течение 5 лет погибают почти 90% больных с момента постановки диагноза [98]. Доказано, что при первом обращении при появлении глазных симптомов до 2% пациентов могут иметь метастазы [113]. Большие размеры меланомы, как и прежде,

остаются одним из клинически значимых факторов риска развития метастазов [21]. По данным литературы, МХ чаще всего диагностируют на поздних стадиях роста при толщине более 5 мм и диаметре более 15 мм [2, 46]. При этом при МХ больших размеров (диаметр более 15 мм) пятилетняя смертность достигает 53% [116].

С развитием визуализирующих методов исследования внутренних органов и, в первую очередь, для выявления метастазов в печени с 80-х годов прошедшего столетия получила распространение компьютерная томография (КТ), позже магнитно-резонансная томография (МРТ) и позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ/КТ). Доказано преимущество МРТ в сравнении с другими методами [12, 30, 100, 111]. Однако эти методы исследования выявляют метастазы в печени при их размерах от 5 мм в диаметре [57]. В работе М. Diener-West с соавторами рассмотрены пациенты с первичной МХ с патоморфологически доказанными метастазами в печень через 40 лет после проведенного лечения [47]. Данная работа рассматривает способность МХ продуцировать «скрытые» или субклинические метастазы. Вопрос о раннем выявлении метастазов в литературе обсуждается на протяжении многих лет.

В начале 1990-х годов появились первые сведения о роли генетики в развитии первичных внутриглазных меланом. Речь идет о единичном случае большой УМ с обнаруженной аномалией – моносомия с потерей целой копии 3 хромосомы [71]. Позднее полученные результаты были подтверждены 30 наблюдениями из 54 случаев УМ больших размеров, локализующихся в цилиарном теле и хориоидее [105]. По мере увеличения количества исследований удалось установить, что моносомия 3 хромосомы встречается и при таких опухолях, как глиобластома, базально-клеточный рак кожи и др. [108]. Таким образом, моносомию по 3 хромосоме можно расценивать, как свидетельство предрасположенности к развитию злокачественных опухолей. Дальнейшие исследования позволили обнаружить ядерный белок, кодируемый геном-супрессором опухоли, расположенным на 3 хромосоме (VAP1 ассоциированный белок 1 – убиквитин карбокси-концевая гидролаза). Было доказано его участие в процессах регуляции клеточного цикла и репарации ДНК. По мере накопления знаний удалось

установить, что VAP1 предрасполагает к развитию не только УМ, но и других злокачественных опухолей (мезотелиома, меланома кожи, базально-клеточный рак кожи, рак почки и др.). Таким образом, и наличие VAP1 в большей степени свидетельствует о предрасположенности индивидуума к развитию злокачественной опухоли (синдром предрасположенности к опухоли VAP1) [34].

С 2000-х годов появились сведения о мутациях в генах, связанных с субъединицами G-белка- α GNAQ и GNA11 в МХ. Данная мутация встречалась с частотой приблизительно 80-90%. Авторы доказали активизацию внутриклеточных сигнальных путей в результате мутации в GNAQ и GNA11, ответственных за размножение и рост опухолевых клеток [99]. Что касается МХ, то мутация GNA11 может стимулировать рост меланоцитов. Как правило, ее обнаруживают при меланоме цилиохориоидальной локализации и наличии экстрабульбарного роста [129]. Генетические нарушения: моносомия 3 (потеря одной копии 3 хромосомы), делеция короткого плеча хромосомы 1 (моносомия 1p) и удвоение длинного плеча хромосомы 8 (дупликации 8q) представлены в работах С.В. Саакян [11, 13, 14, 15, 18]. В работах рассмотрены: ассоциация моносомии 3 с морфологическим строением УМ; связь делеции короткого плеча хромосомы 1 с наличием экстрабульбарного роста опухоли. Была доказана связь между моносомией хромосомы 3 и сниженной выживаемостью пациентов, а делеция короткого плеча хромосомы 1 с наличием экстрабульбарного роста опухоли. Исследования в области генетики УМ продолжаются [13,14, 18].

Степень разработанности проблемы

Год 1993 знаменуется открытием микроРНК при исследовании гена *lin-14*, задействованного на этапах личиночного развития нематоды *Caenorhabditis elegans* [83, 134]. И только в начале 21 века появляются первые сообщения о роли микроРНК в развитии патологии человека [32, 97]. В настоящее время микроРНК - класс малых некодирующих РНК расценивают, как окончательный носитель передачи генетической информации [53, 60, 73]. Показано, что они играют роль в

онкогенезе, участвуя в регуляции генов на всем пути их прохождения (транскрипционном, посттранскрипционном и трансляционном уровнях). Отмечен плейотропизм микроРНК, заключающийся в их способности действовать, и как онкогенны (стимулируют рост опухоли), и как супрессоры (подавляют опухолевый рост через иммунную систему) [35, 61, 63, 103, 139]. В зависимости от локализации, выделено два вида микроРНК: внутриклеточная (непосредственно в самой клетке) и внеклеточная (циркулирующая в плазме крови) [141]. Функции микроРНК могут меняться с учетом особенностей окружающей среды [67]. Доказана роль микроРНК в развитии многих опухолей: рак молочной железы, толстого кишечника, яичника, легкого и др. [125, 132, 146].

Первые публикации о роли микроРНК в развитии увеальной меланомы появились только в 2008 году. Первоначально было изучено «поведение» микроРНК в тканях самой меланомы хориоидеи и ее метастазах в печень у 24 больных [135]. Позднее опубликованы результаты исследования уровня микроРНК в тканях опухоли и в плазме крови [128]. Как следует из miRbase (выпуск 22), всего в геноме человека аннотировано 2654 микроРНК [77]. У больных УМ на май 2022, по данным литературы, исследован уровень экспрессии более 100 микроРНК. Из них доказана роль 12 микроРНК обнаруживаемых в плазме крови: микроРНК-16, микроРНК-20а, микроРНК-92b, микроРНК-106а, микроРНК-125b, микроРНК-126, микроРНК-146а, микроРНК-155, микроРНК-181а, микроРНК-199а, микроРНК-199а-5p и микроРНК-223, участвующие на разных этапах онкогенеза УМ.

Существенным недостатком имеющихся публикаций следует отметить слишком широкое использование общего термина УМ. Отсутствие деления меланомы по топографическому признаку (радужка, цилиарное тело и собственно хориоидея) не оправдано, т.к. опухоли этих локализаций представлены зачастую разными клеточными формами (меланома радужки чаще представлена веретенообразными клетками, меланома цилиарного тела – чаще имеет эпителиоидноклеточное строение, а в МХ преобладают веретенноклеточные и смешанные формы), что влияет на витальный прогноз. Кроме того, количество наблюдений в

опубликованных работах невелико (минимальное количество пациентов – 6, максимальное – 21), не учтена локализация опухоли, отсутствуют сведения о размерах. А вопросы эти принципиальные, т.к. остаются не раскрытыми именно вопросы ранней диагностики, возможного скрытого метастазирования меланомы хориоидеи. К тому же, в отечественной литературе отсутствуют публикации, посвященные данному вопросу. В связи с изложенным сформулирована цель настоящего исследования.

Цель исследования: изучить значимость уровня экспрессии микроРНК в плазме крови больных меланомой хориоидеи как биомаркера уточненной диагностики и прогнозирования скрытого метастазирования

Достижение поставленной цели реализовано посредством решения следующих **задач:**

1. Оценить особенности офтальмоскопических признаков меланомы хориоидеи с учетом ее метрических показателей при условии NoMo и изучить уровень экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-126, микроРНК-155 и микроРНК-146a в плазме крови больных меланомой хориоидеи в сравнении с контрольной группой.
2. Проанализировать влияние размеров меланомы хориоидеи от начальных до больших на уровень экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-126, микроРНК-155 и микроРНК-146a в плазме крови больных.
3. Установить степень влияния локализации меланомы хориоидеи на характер экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-126, микроРНК-155, микроРНК-146a в плазме крови больного.
4. Проанализировать корреляцию морфологических типов меланомы хориоидеи с особенностями экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-126, микроРНК-155 и микроРНК-146a в плазме крови больных.

Материал и методы исследования

Основная группа исследования состояла из 84 больных монолатеральной МХ, средний возраст $63,4 \pm 1,2$ (35-86 лет). Толщина опухоли варьировала в пределах 0,77-17,19 мм (средняя $7,21 \pm 0,43$). Контрольную группу составили 28 волонтеров, средний возраст $62,9 \pm 1,42$ (45 – 78 лет), не имеющих ни опухолевых, ни хронических аутоиммунных заболеваний.

Работа проведена в период с 2018 по 2021 год на кафедре офтальмологии ФГБОУ ДПО «РМАНПО» МЗ РФ и клинической базе «Московский городской офтальмологический центр» ГКБ им. С. П. Боткина. Лабораторное исследование проводили на базе НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО «РМАНПО».

Всем пациентам проведено плановое офтальмологическое обследование по общепринятой схеме с обязательными исследованиями: цифровым фотографированием глазного дна, эхобиометрией глаза и опухоли, оптической-когерентной томографией. С целью исключения метастазов всем больным проведено обследование: КТ или МРТ органов грудной клетки и брюшной полости.

Научная новизна работы

- ✓ Впервые в России проведен анализ уровня экспрессии микроРНК-223, микроРНК-126, микроРНК-146а и микроРНК-155 в плазме крови больных меланомой хориоидеи в стадии NoMo и подтверждена их роль как биомаркера ее наличия с учетом особенностей локализации, размеров и морфологического строения.
- ✓ Впервые установлена дисрегуляция микроРНК-27b как биомаркера начальной меланомы хориоидеи в стадии NoMo в плазме крови больных (патент 10.08.2021 №2021123797)
- ✓ Доказана значимость повышения уровня экспрессии микроРНК-223 и микроРНК-27b в плазме крови больных меланомой хориоидеи, как предиктора развивающихся гематогенных метастазов.

Теоретическая и практическая значимость

Проведенная работа по определению уровня экспрессии микроРНК в плазме крови больных меланомой хориоидеи в сложных дифференциально-диагностических случаях на основе клинических, морфологических и лабораторных методов исследования позволяет на клеточном уровне, с учетом особенностей клинико-морфологической картины и размеров опухоли, прогнозировать наличие скрытых метастазов и определять персонализированный характер лечения.

Методологическая и теоретическая база исследования

Теоретическая база исследования – изучение и анализ отечественной и зарубежной литературы о роли микроРНК в жизнедеятельности человека, онкогенезе и развитии УМ.

Методология исследования включала проведение комплекса клинических исследований, направленных на установление наличия опухолевого узла в хориоидее, его офтальмоскопических особенностей (исследование функции глаза, офтальмоскопия с учетом биомикроофтальмоскопии контактной и не контактной, цифровое фотографирование зоны поражения глазного дна, ультразвуковая и оптическая когерентная томография глаза). Уровень экспрессии микроРНК в плазме крови определяли с помощью наиболее точной в настоящее время ПЦР в режиме реального времени.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В плазме крови больных меланомой хориоидеи характерно увеличение экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, что свидетельствует об агрессивности опухоли
2. Доказано влияние размеров меланомы хориоидеи на увеличение уровня экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-126, микроРНК-155 и микроРНК-146a в плазме крови, что позволяет расценить полученные показатели как свидетельство возможного скрытого метастазирования. В большей степени это относится к микроРНК-223 и микроРНК-27b.

3. У больных преэкваatorialной меланомой хориоидеи в плазме крови выявлена дисрегуляция микроРНК-223, микроРНК-27b в сторону увеличения их экспрессии, что подтверждает наиболее злокачественное течение меланомы этой локализации.
4. Эпителиодный тип меланомы хориоидеи по сравнению с веретенноклеточным типом сопровождается бóльшей дисрегуляцией микроРНК-223 и микроРНК-27b в плазме крови больных, что подтверждает мнение о более злокачественном течении этого типа меланомы на эпигенетическом уровне.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Степень достоверности полученных результатов определена достаточным объемом исследования (84 больных меланомой хориоидеи и 28 волонтеров, не имеющих опухолевых и аутоиммунных поражений). При исследовании автором использованы современные методы обследования (оптическая когерентная томография, эхобиометрия, цифровая фоторегистрация опухолевого узла). Полученные данные проанализированы и произведены расчёты статистики с помощью стандартных методов с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel и пакета прикладных программ «Statistica»v.13.0, StatSoft Inc (США).

Апробация

Апробация диссертации состоялась 10 июня 2022 г. на расширенном заседании кафедры офтальмологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (Протокол от 10.06.2022 № 8).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационной работы внедрены в клиническую практику офтальмоонкологического отделения «МГОЦ» (Московский городской офтальмологический центр) ГКБ им. С.П. Боткина.

Основные результаты исследования внедрены в учебные рабочие планы циклов профессиональной переподготовки и повышения квалификации врачей-офтальмологов по направлению «Офтальмология», раздел офтальмоонкология.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, определена степень разработанности проблемы, на основании полученных данных сформулированы цель и задачи исследования. Лично выполнено обследование и наблюдение за пациентами (до и после лечения). Принимала непосредственное участие при УЗИ-исследовании больных и выполнении ПЦР на базе НИЦ РМАНПО. Проведен подробный анализ данных по пациентам, полученных результатов из лаборатории и их статистическая обработка.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует паспорту специальности «Офтальмология» (шифр 3.1.5.).

В соответствии с формулой специальности 3.1.5.-Офтальмология диссертационная работа включает исследование возможных методов ранней уточненной диагностики меланомы хориоидеи на основе исследования плазмы крови больных меланомой с целью определения уровня экспрессии выбранных микроРНК.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 7 научных работ в журналах и сборниках научных трудов, из них 3 – в печатных изданиях, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК РФ.

- 1) Бровкина А.Ф., Яровая Г.А., **Цыбикова Н.Д.** МикроРНК в офтальмологии. Офтальмология. 2021;18(2):188–197. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2021-2-188-197>
- 2) Бровкина А.Ф., **Цыбикова Н.Д.** МикроРНК-146а-предиктор развития метастазов меланомы хориоидеи. Точка зрения. Восток-Запад. 2021;1:13-16. DOI:<https://doi.org/10.25276/2410-1257-2021-1-13-16>
- 3) Бровкина А.Ф., **Цыбикова Н.Д.** МикроРНК в уточнённой диагностике меланомы хориоидеи. Acta biomedica scientifica. 2021; 6(6-1): 65-73. doi: <https://doi.org/10.29413/ABS.2021-6.6-1.8>
- 4) Бровкина А.Ф., **Цыбикова Н.Д.** МикроРНК — биомаркер агрессивности меланомы хориоидеи. Российский офтальмологический журнал. 2022; 15 (1): 7-12. <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2022-15-1-7-12>
- 5) Патент на изобретение №2021123797 от 10.08.2021 «Способ диагностики начальных меланом хориоидеи» Бровкина А.Ф., **Цыбикова Н.Д.**
- 6) **Цыбикова Н.Д.** «XII Конференция молодых ученых с международным участием «Трансляционная медицина: возможное и реальное»: сборник материалов конференции ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, М. - 2021. – стр. 254 (стр 229) ISBN 978-5-7249-3187-8
- 7) **Цыбикова Н.Д.**, Бровкина А.Ф. Сборник тезисов. Head and neck. Голова и шея. Российский журнал=Head and neck. Russian Journal. 2021; №2, том 9 (Приложение):1-178 (48). Doi: 10.25792/HN.2021.9.2 (Suppl.):1–176

Всего выступлений по теме исследования 10 – на конференциях молодых ученых РМАНПО, на международных конференциях с публикациями тезисов с результатами исследования.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 104 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка

литературы и списка сокращений. Работа иллюстрирована 23 таблицами, 29 рисунками.

Список литературы включает 150 источников, из них 19 отечественных и 131 зарубежных публикаций.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Эпидемиология внутриглазной меланомы с учетом ее топографии

По данным литературы, показатели заболеваемости УМ значительно разнятся, но в мире, в целом, ежегодно около 7000 новых зарегистрированных случаев УМ [70]. Частота их выявления в Европе составляет 10,9 на 1 миллион населения в год, и этот показатель увеличивается с юга на север. К примеру, в Испании и Италии, в среднем выявляют 2 человека на 1 миллион населения в год, а в Норвегии и Дании - 9 человек на 1 миллион населения в год [131]. Заболеваемость УМ в Африке и Корее ниже - 0,2 и 0,6 случаев соответственно на 1 миллион населения [102]. В США, в среднем 5,2 на 1 миллион населения в год [24, 36]. Показатели заболеваемости УМ в России варьируют в пределах 10 - 12 человек на 1 миллион *взрослого* населения в год [3, 7, 8]. В Москве частота МХ по обращению варьирует в пределах 10 - 12 человек на 1 миллион *взрослого* населения [3]. Показатели заболеваемости УМ в Москве составляют 8,5 - 10,24 человек на 1 миллион *взрослого* населения [4]. МХ выявляют у пациентов в возрасте 30 - 80 лет (до 75%), половину из них на шестом десятилетии жизни [5, 46].

1.1.2. Клинико-морфологическая характеристика меланомы хориоидеи и особенности ее метастазирования

Для удобства планирования лечения и оценки прогноза принято делить МХ по метрическим признакам на три группы (J.A. Shields, 1983): начальные (проминенция меланомы до 3 мм включительно, диаметр до 10 мм включительно), средние (проминенция более 3 мм до 5 мм, диаметр более 10 мм до 15 мм) и большие (проминенция более 5 мм, диаметр - более 15 мм).

Клиническая картина МХ, вне зависимости от их размеров, характеризуется всегда нарушением зрительных функций, разной проминенцией растущей опухоли, окраска ее колеблется от коричневого до желтого цвета, присутствуют вторичные изменения в сетчатке. Эти офтальмоскопические признаки обязательны. Отслойка сетчатки, особенно дистантная, и кровоизлияния на поверхности опухоли не всегда зависят от размеров опухоли. С учетом топографии опухолевого узла выделяют: преэкваториальные и постэкваториальные меланомы. Многолетними клиническими наблюдениями доказан неблагоприятный витальный прогноз у больных с преэкваториальной локализацией меланомы [48, 114].

С учетом морфологического строения выделяют веретенклеточные, эпителиоидно-клеточные и смешанные МХ [19, 93]. Одним из основных факторов риска метастазирования считают морфологический тип МХ, а наиболее агрессивным из них является эпителиоидно-клеточный тип опухоли [19, 44, 116]. Последний встречается в 5% случаев [16, 110], подавляющее же большинство меланом хориоидеи имеют веретенклеточное или смешанное строение.

Начальные МХ метастазируют в течение 5 лет наблюдения у 16% больных, тогда как средние и большие опухоли сопровождаются метастазированием у 32% и 53% больных соответственно [115]. Таргетный орган поражения – печень [56, 57, 79, 93, 115]. Недостатком диагностики МХ является их позднее выявление [5, 45, 56].

С развитием визуализирующих методов исследования внутренних органов и, в первую очередь, для выявления метастазов в печень с 80-х годов 20 столетия получила распространение компьютерная томография (КТ), позднее магнитно-резонансная томография (МРТ) и позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ\КТ). Доказано преимущество МРТ [12, 30, 100, 111]. Однако эти методы исследования визуализируют наличие метастазов в печени при их размерах от 5 мм в диаметре [57].

Биомаркеры увеальной меланомы в крови

Существует теория раннего микрометастазирования УМ. Они могут находиться в состоянии «покоя» до тех пор, пока, все еще неизвестный фактор не активизирует прогрессирование [27]. Ведется активный поиск биомаркеров и для УМ. «Идеальный биомаркер» должен быть чувствительным к опухоли, быстрым в определении, экономически доступным, стабильным, неинвазивным, иметь достаточную доклиническую и клиническую значимость. Имеющиеся единичные публикации, посвященные выделению оптимального биомаркера, имеют разноречивые точки зрения [120].

Многолетние исследования свидетельствуют, что сывороточные уровни ферментов печени (АЛТ, АСТ, ЩФ, ЛДГ и билирубин) повышаются при метастазировании МХ, однако в большинстве публикаций, посвященных этой теме, показана их низкая чувствительность [49, 55]. Низкая чувствительность и специфичность уровней ферментов печени и низкая прогностическая ценность, в значительной степени способствовали поиску новых серологических маркеров, способных обнаруживать прогрессирование заболевания.

В 1990 году D.E. Horsman с соавт. описали больного с большой УМ и генетической аномалией в опухоли - моносомией 3 (потеря целой копии 3 хромосомы). Позднее это было подтверждено у 30 больных УМ из 54 обследованных. Но в этих случаях меланома была больших размеров, локализовалась в цилиарном теле и хориоидее [105]. По мере накопления клинического материала были получены доказательства моносомии 3 хромосомы и при других опухолях (глиобластоме, базально-клеточном раке кожи и др.). Таким образом, моносомию по 3 хромосоме можно расценивать, как свидетельство предрасположенности развития злокачественных опухолей. Дальнейшее изучение позволило обнаружить ядерный белок, кодируемый геном-супрессором опухоли, расположенным на 3 хромосоме (VAP1 ассоциированный белок 1 – убиквитин карбокси-концевая гидролаза). Доказано его участие в процессах регуляции клеточного цикла и репарации ДНК. Установлено, что VAP1 предрасполагает к

развитию не только УМ, его обнаруживают и у больных другими злокачественными опухолями (мезотелиома, меланома кожи, базально-клеточный рак кожи, рак почки и др.). Таким образом, и наличие VAP1 – в большей степени свидетельствует о предрасположенности индивидуума к развитию злокачественной опухоли (синдром предрасположенности к опухоли VAP1) [34].

В конце 20 века было обращено внимание на сывороточные маркеры, выявленные у больных кожной меланомой, с целью проверки их у больных УМ. Речь идет о низкомолекулярном белке S100 β , который используют для мониторинга меланомы кожи [69]. S100 β оказался мощным прогностическим маркером при III и IV стадии меланомы кожи. А. J. Cochran с соавторами первыми опробовали его в качестве биомаркера УМ и продемонстрировали присутствие его в гистологических образцах опухоли. Последующие исследования показали меньшую значимость тканевой экспрессии S100 β в других тканях по сравнению с таковой при кожной меланоме [41]. Авторы пришли к выводу, что концентрация S100 β в сыворотке крови не имеет прогностической ценности для УМ.

Дальнейшие исследования привели к появлению сведений об онкогенных мутациях в генах, связанных с субъединицами G-белка- α GNAQ или GNA11 в МХ. Частота таких изменений по данным литературы составляла приблизительно 80-90%. Доказано, что мутации в *GNAQ* и *GNA11* активируют внутриклеточные сигнальные пути, отвечающие за размножение и рост опухолевых клеток [99]. Что касается МХ, то мутация GNA11 может стимулировать рост меланоцитов. Как правило, ее обнаруживают при меланоме цилиохориоидальной локализации и наличии экстрабульбарного роста [129]. Генетические нарушения: моносомия (потеря одной копии 3 хромосомы), делеция короткого плеча хромосомы 1 (моносомия 1p) и удвоение длинного плеча хромосомы 8 (дупликация 8q) представлены в работах С.В. Саакян [13, 14, 18]. В работах рассмотрены: ассоциация моносомии 3 с морфологическим строением УМ; связь делеции короткого плеча хромосомы 1 с наличием экстрабульбарного роста опухоли. Была доказана связь между моносомией хромосомы 3 и сниженной выживаемостью

пациентов, а делеция короткого плеча хромосомы 1 с наличием экстрабульбарного роста опухоли. Исследования в области генетики УМ продолжаются [13, 14, 18].

В 2005 году представлено первое комплексное исследование первичной культуры клеток УМ [101]. Выделено 683 белка, полученных из 393 различных генов. Из них - 18% были связаны с канцерогенными процессами: пролиферацией, инвазией, метастазированием.

Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) впервые описал в 1869 году T.R. Ashworth, как «опухолевидные клетки, которые можно увидеть в крови» [25]. И только в 1990 году начались исследования ЦОК и их связи с клиникой [118]. Наиболее частым методом выявления ЦОК при УМ оказалась полимеразная цепная реакция (ПЦР). Были оценены изменения в течение наблюдения 41 пациента УМ без метастазов на момент постановки диагноза. О наличии ЦОК в 16 случаях свидетельствовала выделенная РНК (мРНК) тирозиназы. После лечения у 11 из этих пациентов мРНК тирозинкиназы не обнаруживалась. Авторы связывают это с удалением опухоли и, как следствие, уменьшением выделения опухолевых клеток в кровь [31]. Был сделан вывод, что выделение ЦОК с помощью ПЦР мРНК тирозинкиназы до лечения может характеризовать неблагоприятный витальный прогноз. S.A. Callejo с соавторами изучали роль ЦОК УМ с использованием ПЦР у 30 пациентов с УМ [33]. У каждого пациента, в среднем, производили забор крови 4-х образцов: первый – до лечения, и последующие после лечения с интервалом в 3 месяца. ЦОК были обнаружены в 29 случаях. Корреляция между наличием ЦОК и размером опухоли, типом лечения или временем после лечения не выявлена. Авторы объясняют свои результаты использованием более чувствительной методики: забором большего количества образцов крови; большее количество ПЦР [33]. И, тем не менее, они не исключили «ложное срабатывание» при определении ЦОК. Вероятно, это связано с различиями в технике проведенных исследований. Была продолжена дальнейшая работа для устранения этих различий, что привело к изучению микроРНК.

1.2. МикроРНК как эпигенетический контроль роста опухоли

1.2.1. История вопроса

Первые упоминания о микроРНК относятся к 1993 году (V. Ambros, R. Lee и R. Feinbaum). Представлены сведения по гену *Lin-14*, задействованного на этапах личиночного развития нематоды *Caenorhordiis elegans* [83, 134]. Установлено, что количество белка *Lin-14* регулируется коротким РНК-продуктом гена *Lin-4* (антисмысловая комплементарность). Впервые был продемонстрирован новый механизм регуляции - контролирование согласования времени перехода этапов развития личинки. Через 7 лет открыта сходная пара генов *C. Elegans* короткая РНК (21 нуклеотид) гена *let-7* и в отличие от *lin-14*, обнаруженная у многих форм живых организм, что послужило толчком к дальнейшему активному изучению микроРНК у человека [23]. К 2004 году установлен достаточно многочисленный класс микроРНК - малые некодирующие РНК, которые способны регулировать такие биологические процессы, как рост, дифференцировку и апоптоз клетки [64, 84]. Особенность микроРНК – это мультитаргетность, иными словами, одна микроРНК участвует в регулировании множества белок-кодирующих генов, и противоположное действие, когда мишенью для целого ряда микроРНК является структурный ген [52].

Из ДНК в результате сложного биогенеза (рисунок 1) образуется микроРНК, которая взаимодействует с мРНК-мишенью, и в результате происходит либо деградация, либо синтез белка [80].

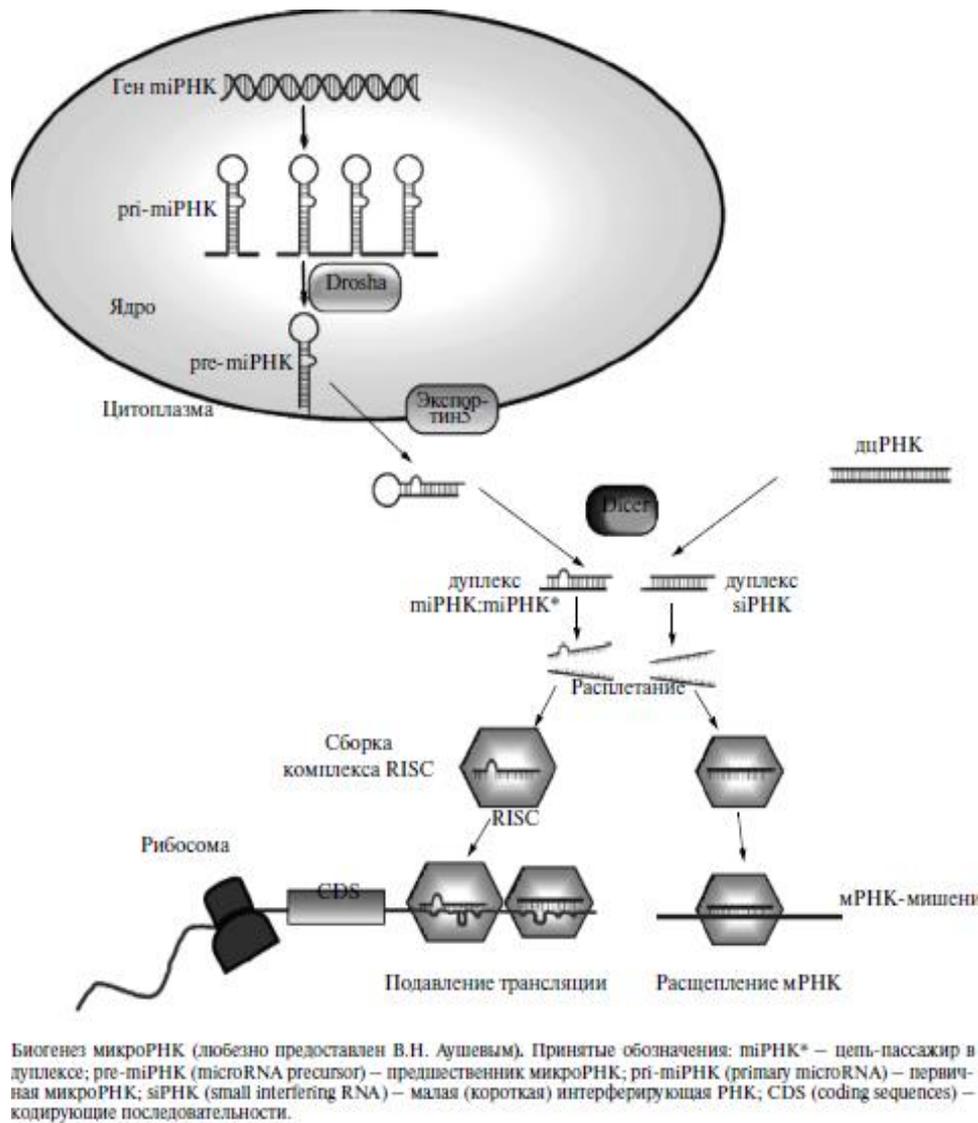


Рисунок 1. Из статьи Киселева Ф.Л. [Киселев Ф.Л. МикроРНК и рак. Молекулярная биология. 2014; 48(2):232–242].

МикроРНК закодированные в генах расположены в ядерной ДНК и локализуются в экзонах, интронах генов и между ними. Формирование (биогенез) микроРНК: вначале образуется переносчик (транскрипт). В его состав входит несколько сотен нуклеотидов и принимает участие РНК-полимераза II. В дальнейшем переносчик (транскрипт) подвергается превращению (процессингу). Фермент рибонуклеаза Drosha расщепляет переносчик (транскрипт) и формируется пре-микроРНК, состоящая из 70 нуклеотидов (между собой соединены петлей с 3' и 5' концами). Пре-микроРНК переносится из ядра в цитоплазму при помощи белка экспортина-5. В ядре под воздействием рибонуклеазы III Dicer происходит дальнейшее превращение – вырезается петля в пре-микроРНК и формируется

зрелая двухцепочная микроРНК. Каждая цепь состоит из 18-25 нуклеотидов. Функции микроРНК могут выполнять обе цепи, но есть только одна основная, а вторая цепь «пассажирская». Эндонуклеаза действует на пассажирскую цепь и приводит к распаду (деградации). Рибонуклеопротеин (PNA) формирует с основной цепью комплекс - RISC (RNA-induced silencing complex). В составе комплекса микроРНК связывается с главным каталитическим белком комплекса Argonante (Ago). В результате формируется микроРНК способная взаимодействовать мРНК -мишенью и становится устойчивой к действию эндонуклеаз.

Регистрацию микроРНК проводят в порядке их открытия. Зрелую микроРНК обозначают «miR», а предшественник (пре-микроРНК) «mir». Гомологи близкие по функциям, но разные по одному нуклеотиду регистрируют одинаковым числом, но с обязательным добавлением на конце «маленькой» латинской буквы (к примеру: miR-27a, miR-27b). При расположении микроРНК в геноме на различных позициях – к регистрационному номеру добавляют дополнительное число через дефис (к примеру: mir-2b-1, mir-2b-2). Если из одной пре-микроРНК формируется несколько различных микроРНК, то название микроРНК становится сложнее (к примеру: miR-28-5p и miR-28-3p) [23]. В Великобритании создана специальная база данных – «miRBase», в которой организованы и по порядку систематизированы известные на сегодняшний день микроРНК и добавляется информация о новых открываемых микроРНК [68].

1.2.2. Функциональное значение микроРНК в жизнедеятельности человека и в онкогенезе

Доказано, что в нормальных и поврежденных тканях работают разные микроРНК. Первые исследования были направлены на изучение внутриклеточных микроРНК в тканях для определения их роли и функций. При дальнейшем исследовании было показана возможность присутствия микроРНК и вне клеток. В жидкости организмов в плазму крови микроРНК попадают в результате пассивного

высвобождения после воспаления, апоптоза и некроза, либо в результате активной секреции в составе микровезикул, экзосом [127]. Секретируемые микроРНК за счет формирования комплексов с белками остаются стабильными в жидкостях организма и поэтому циркулирующие микроРНК являются предметом особых исследований. В литературе появились публикации о способности опухолевой клетки секретировать с помощью микровезикул микроРНК.

Одна из важных функций микроРНК - регулирование активности генов. Они играют роль в определении состава белков (качество, количество) и транскриптов, участвующих в формировании отдельных тканей, органов и всего организма. Дифференцировка микроРНК также играет важную роль при злокачественной трансформации [38].

К настоящему времени доказано, что нарушение регуляции генов микроРНК приводит к развитию злокачественных опухолей и влияние их может быть осуществлено на всех стадиях опухолевого процесса – от возникновения опухоли до появления метастазов [32, 76]. Профиль микроРНК является *тканеспецифичным*, что может помочь в определении органной принадлежности опухоли [17].

G. A. Calin с соавторами в 2002 году при исследовании больных хроническим лимфолейкозом впервые выявили, что в клетках частая делеция участка хромосомы 13q14 приводит к нарушению работы двух микроРНК: микроРНК-15а, микроРНК-16-1. Это первые микроРНК - онкосупрессоры, открытые при исследовании функции микроРНК в канцерогенезе. [32]. При дальнейшем изучении лимфопролиферативных заболеваний на моделях животных подтверждены онкогенные микроРНК-21, микроРНК-155 и микроРНК-17-92 [43, 140]

Идет активное изучение роли микроРНК при опухолях различной локализации: раки молочной железы, яичника, толстой кишки, пищевода, шейки матки [75, 109, 119, 125, 126]. Доказано изменение уровня экспрессии микроРНК в тканях опухоли и плазме крови больных по сравнению с контрольной группой. В частности, у больных раком яичника в плазме крови показано повышение

концентрации экзосом, активно секретируемых путем экзоцитоза (органелл размером 50-100 нм) в сравнении с группой здоровых женщин и женщинами с доброкачественными образованиями. Данная работа одна из первых по определению в экзосомах уровня микроРНК. Авторы стремились показать, что повышение уровня микроРНК определяемых в опухоли также приводит к повышению уровня микроРНК и в экзосомах циркулирующих в крови. И оказалось, что из 218 микроРНК, определяемых в опухолевой ткани у 50 больных, уровень 175 микроРНК достоверно не отличался от уровней микроРНК в циркулирующих в крови экзосомах. Концентрация 31 микроРНК была выше в экзосомах по сравнению с тканью опухоли, а у 12 микроРНК концентрация оказалась сниженной. В группе контроля эти микроРНК не были выявлены, а в группе больных доброкачественными опухолями яичников определялись в значительно меньших концентрациях. Восемь микроРНК: микроРНК-21, микроРНК-141, микроРНК-200а, микроРНК-200б, микроРНК-200с, микроРНК-203, микроРНК-205 и микроРНК-214 характеризовались разным уровнем своей экспрессии при исследовании опухолевых клеток и экзосом. Таким образом, предложено использование данного профиля микроРНК (обнаруженных в экзосомах) в качестве скрининга для выявления бессимптомного рака яичника и при выявлении рецидива болезни [126]. Аналогичные результаты получены при исследовании микроРНК-106а, микроРНК-181b и микроРНК-203 у больных раком толстой кишки. В клетках опухоли уровень микроРНК был повышен в сравнении с контрольной группой (неизменная слизистая оболочка той же кишки). На основании полученных данных относительно проведенного исследования авторы не делают окончательных выводов, так как остается предположение, что изменение экспрессии микроРНК связано не только с наличием опухоли, но и может участвовать в развитии опухоли [109]. В более ранней публикации [117] имеются указания, что снижение микроРНК-106а ассоциировано с прогрессированием рака толстой кишки и более короткой продолжительностью жизни таких пациентов. МикроРНК-106а действует как опухолевый супрессор и в дальнейшем может быть использован в качестве прогностического маркера рака толстой кишки.

При исследовании пациентов с раком пищевода было показано, что повышение экспрессии микроРНК-223 характерно для прогрессирования опухолевого процесса. МикроРНК-223 взаимодействует с PARP (геном поли-ADP-рибозы, участвующей в репарации ДНК и апоптозе), тем самым изменяя чувствительность к химиотерапии [119].

При раке шейки матки выявлено повышение микроРНК-181a. Ген PKCD (проапоптотический ген – участвующий в апоптозе и ингибирующий неопластическую трансформацию) является мишенью микроРНК-181a. Резистентность к облучению при раке шейки матки характеризуется повышением уровня экспрессии микроРНК-181a [75]. А микроРНК-125 запускает апоптоз через регулирование экспрессии генов McL-1, Bcl-1 и IL-6R [65].

Экспрессия микроРНК-335, микроРНК-206 и микроРНК-126 снижается у больных раком молочной железы, а при метастазировании становится еще ниже [125]. Также замечено, что низкая экспрессия перечисленных микроРНК характерна для рецидива рака молочной железы. Таким образом, авторы пришли к выводу, что низкая экспрессия этих микроРНК связана с общим плохим прогнозом. Гены мишени CRK, KRAS, VEGF (CRK - белок, связывающий тирозин-фосфорилированные белки, KRAS - протоонкоген, представитель семейства белков Ras, VEGF (Vascular endothelial growth factor) – фактор роста эндотелия сосудов) при раке молочной железы участвуют в клеточной адгезии, этапах ангиогенеза и инвазии. Доказано подавление этих процессов при участии микроРНК-126 [53].

Таким образом, на основании проведенных исследований, был выделен большой ряд циркулирующих микроРНК с возможностью использования в диагностике для выявления опухолей различного гистогенеза на ранних этапах. С целью возможности диагностики и прогнозирования различных видов онкологии особый интерес представляют циркулирующие микроРНК. В таблице 1 перечислены микроРНК с разной экспрессией при различных видах опухоли.

Экспрессия микроРНК в зависимости от типа рака

Локализация	микроРНК с <i>повышенной</i> экспрессией	микроРНК с <i>пониженной</i> экспрессией
Рак легкого	21 200b 17-92 30d 86	126 30a 143 145 188 333 34s
Рак молочной железы	195 155 10b 29b-2 34a 221 222	143 145 200 126b 199a 335
Колоректальный рак	223 21 106m 92 134 29f	143 145 128a 130a 331
Рак простаты	195 203 125b 20a 231 221 375 9 141 200b	143 145 128a 146a 126
Рак печени	34s 224 18 21	12-19b 200a 125a 190a 195 16 195 199a

Перечисленные в таблице 1 микроРНК позволяют высказаться в пользу возможности микроРНК в определенных опухолях действовать как онкосупрессор или же наоборот активатор онкогенеза. В таблице 2 приведены данные литературы по выбранным нами микроРНК в общей онкологии.

Таблица 2

МикроРНК в плазме крови в общей онкологии

Микро РНК	Экспрессия: повышение\ снижение	Плазма\ ткань	Авторы	Онкология
146a	Повышается	плазма	Shen J., et al. 2008	Рак молочной железы и яичников
146a	повышается	плазма	Ebrahimi S.O., et al. 2018	Синдром поликистозных яичников
155	повышается	плазма	Gonzalez-Villasana V., et al., 2019	рак молочной железы
155	снижается (после лучевого лечения)	плазма	Esplugas R., et al., 2019	рак молочной железы
155	повышается	плазма	Due H., et al., 2019	крупноклеточная В-лимфома
126	повышается	плазма	Latchana N., et al., 2018	Меланома кожи
27b	снижается	плазма	Chen X., et al., 2018	Рак желудка
223	повышается	плазма	Zhang L., et al., 2018	Плоскоклеточный рак пищевода
223	повышается	плазма	Yu G., et al., 2019	лейкоз
223	повышается	плазма	Wei Y.T., et al., 2017	рак молочной железы

1.2.3. Роль микроРНК в метастазировании увеальной меланомы

Первая публикации появилась в 2008 году и посвящена роли микроРНК в развитии увеальной меланомы (УМ) [135]. В энуклеированных глазах в образцах меланомой цилиарного тела и собственно сосудистой оболочки (хориоидеи) выявлены микроРНК. Экспрессия let-7b и микроРНК-199a была изменена в данных образцах. В связи с этим, авторами предложена возможность применения данных микроРНК как биомаркера злокачественности УМ. Через год в Китае D. Yan с соавторами выделили микроРНК-34a и определили ген-супрессор p53 в клетках УМ (3 глаза). Для контроля использовали стандартные клеточные линии меланоцитов. С помощью вестерн-блоттинг-анализа произведен расчет экспрессии микроРНК [142]. Доказано, что микроРНК-34a характеризуются активной экспрессией в меланоцитах, но клетках УМ такой закономерности нет. Путем подавления с-Met микроРНК-34a при миграции и распространении клеток действует как супрессор УМ. Снижение экспрессии микроРНК-34a в клеточных линиях УМ подтверждены и в последующих работах [72, 87]. Схожие данные получены и при исследовании по микроРНК-137. Снижение уровня экспрессии микроРНК-137 характерно для клеток опухоли при сравнении в нормальными увеальными меланоцитами. При дальнейших исследованиях доказано участие микроРНК-137 в клеточной пролиферации в качестве супрессора [39]. На основании проведенных исследований к 2011 году было показано эпигенетическое отключение многих микроРНК во время онкогенеза УМ. Кроме сниженной экспрессия микроРНК-34a также гипоэкспрессией характеризовались микроРНК-145 и микроРНК-204. Клеточная линия меланоцитов являлась контролем в данных исследованиях [145].

На 2014 год были известны более 47 микроРНК участвующие в патогенезе УМ. Повышенная экспрессия микроРНК-145 приводила к подавлению деления клеток УМ, путем блокирования фазы G1 при переходе в S-фазу. В результате чего запускается апоптоз опухолевых клеток [90]. Четыре микроРНК с низкой экспрессией (микроРНК-144, микроРНК-32, микроРНК-34a, микроРНК-140-5p)

представляют интерес для использования как потенциальная терапевтическая мишень УМ [91]. МикроРНК-155 усиливает пролиферацию и инвазию клеток и действует как промотор в УМ. Таким образом, пятая микроРНК (микроРНК-155) выступает в качестве терапевтической мишени у пациентов с УМ [103]. Повышенная экспрессия микроРНК-181b в тканях УМ приводила к запуску клеточного цикла в опухолевых клетках УМ [148]. L.Sun с соавторами в 2015 году выделили микроРНК-454 - онкоген, участвующий в регуляции PTEN, характеризующаяся гиперэкспрессией в тканях УМ по сравнению с нормальными меланоцитами [121]. Эктопическая экспрессия микроРНК-454 приводила к активной стимуляции пролиферации клеток, образованию колоний, инвазии и индукции клеточного цикла в клетках УМ. Таким образом, к 2019 году сформировано предварительное заключение: наибольшей дисрегуляцией характеризуются микроРНК-506, микроРНК-514, микроРНК-592 и микроРНК-199a-5p при наличии (моносомии 3) высокой степени агрессивности с УМ по сравнению с УМ без хромосомных нарушений, что имело корреляционную зависимость с общей выживаемостью больных [59].

На основании проведенных исследований начались исследования по определению связи хромосомных изменений и уровнем экспрессии микроРНК, и возможное участие в метастазировании УМ. Еще до определения уровня экспрессии микроРНК A.Larsen с соавторами, выделив 3 класса УМ по степени агрессивности (26 глаз), идентифицировали хромосомные изменения методом амплификации (MLPA) на основе ПЦР. Была показана связь плохой выживаемости больных УМ с потерей хромосомы 3 и удвоением длинного плеча хромосомы 8 (дупликации 8q). Однако не удалось получить четкую корреляцию хромосомных изменений с клинико-морфологическими особенностями УМ и уровнем экспрессии микроРНК [81, 136]. Связь хромосомных изменений (моносомия 3 \ дисомия 3) в УМ с экспрессией микроРНК и клинико-морфологическими изменениями нашли свое отражение и в других исследованиях [130]. При помощи хромогенной гибридизации *in situ* (CISH) обнаружена потеря хромосомы 3 в 59% из 86 глаз с УМ. Наличие обеих копий хромосомы 3 было обнаружено в 41% УМ. Изучена

экспрессия 8 микроРНК: микроРНК-214, микроРНК-149, микроРНК-143, микроРНК-146b, микроРНК-199a, let7b, микроРНК-1238 и микроРНК-134. Обнаружено, что пять микроРНК (микроРНК-214, микроРНК-146b, микроРНК-143, микроРНК-199a и микроРНК-134) дифференциально экспрессируются в УМ с моносомией 3\дисомией 3 при УМ. Но и в этом исследовании не удалось выявить четкую корреляцию экспрессии микроРНК с метастазированием и витальным прогнозом.

Первая работа по изучению экспрессии микроРНК в плазме крови опубликована в 2012 году. Рассмотрено участие микроРНК в ангиогенезе с циркулирующими эндотелиальными клетками (ЦЭК). В исследовании приняли участие больные УМ (21 человек), которым вводили препараты с антиангиогенной активностью (дакарбазин и интерферон-альфа-2b) [128]. Установлено, что уменьшение экспрессии микроРНК-126 и микроРНК-199a, увеличение микроРНК-16 и микроРНК-106a наблюдали после введения интерферона-альфа-2b, но не после дакарбазина. Уровни микроРНК не коррелировали с уровнями фактора роста эндотелия сосудов. Ангиогенные белки после лечения также существенно не менялись. Учитывая, что все исследуемые пациенты получали системную терапию, можно предположить включение пациентов в исследование на стадии метастазирования. Других данных о пациентах нет.

Через два года после первой публикации появилась работа о небольшом исследовании 6 пациентов с УМ [20]. Авторы сообщили, что экспрессия шести «иммуномодулирующих» микроРНК (микроРНК-20a, микроРНК-125b, микроРНК-146a, микроРНК-155, микроРНК-181a и микроРНК-223) была повышена по сравнению с контрольной группой (26 волонтеров). Данные по пациентам представлены в таблице 3

Основные характеристики больных УМ

Пол	Возраст	h	d	лечение	mts(мес) сроки	mts локализация
м	58	11	14	ЭНО	24	печень
ж	66	14	17	ЭНО	9	печень
ж	74	14	20	ЭНО	6	Печень, кости, легкие
м	67	4	14	ЭНО	24	печень
м	65	3	13	ТИАБ-БТ	15	печень
м	52	6	8	ЭНО	24	Печень, кости и легкие
4-м 2-ж	63,6±3,1 (52-74)	8,66±2,03 (3-14мм)	14,33±1,65 (8-20 мм)		17±3,3 (6 –24)	

Локализация, гистологический характер опухоли – нет данных

При динамическом наблюдении (24 месяца) было отмечено повышение экспрессии перечисленных микроРНК и снижение уровня микроРНК-181a на фоне инструментально выявленных метастазов через 6 и 24 месяца. Следует отметить, что условия наблюдения за пациентами после лечения (в среднем 17±3,3 месяцев) не позволяет корректно утверждать о возникновении метастазов именно в эти сроки. Скорее всего пациенты включены в обследование на стадии микрометастазирования

Ранее было показано, что в плазме крови повышаются уровни микроРНК-125b, микроРНК-146a, микроРНК-223 и из перечисленных выше микроРНК-20a и микроРНК-155, а уровни микроРНК-181a снижаются на фоне метастазирования УМ [20]. Таким образом, участие двух микроРНК (146a и 155), вероятнее всего, принимающих участие в метастазировании меланомы, подтверждено дважды. Первоначально исследования были посвящены изучению функциональной роли конкретных микроРНК в клеточных линиях *in vitro* и образцах меланомы [121]. Оказалось, возможным использовать с диагностической и прогностической целями

микроРНК из плазмы крови и циркулирующих экзосом [128]. В плазме крови больных УМ, подвергшихся энуклеации, было идентифицировано 8 дифференциально экспрессируемых микроРНК: микроРНК-146а, микроРНК-523 - активизировали онкогенез, микроРНК-19а, микроРНК-30d, микроРНК-127, микроРНК-451, микроРНК-518f и микроРНК-1274В - подавляли противоопухолевый иммунитет таблица 4 [107].

Таблица 4

МикроРНК в плазме крови больных УМ

Активируются	Подавляются
микроРНК-146а	микроРНК-19а
микроРНК-523	микроРНК-30d
	микроРНК-127
	микроРНК-451
	микроРНК-518f
	микроРНК-1274В

К 2020 году определены микроРНК, потенциально связанные с прогрессированием УМ и риском метастазирования. К ним отнесены активизирующие онкогенез УМ: микроРНК-20а, микроРНК-let-7b, микроРНК-124, микроРНК-142, микроРНК-155, микроРНК-199 и микроРНК-224, подавляющие опухолевый иммунитет: микроРНК-181а, микроРНК-211, что представлено в таблице5 [26].

МикроРНК, потенциально связанные с прогрессированием УМ и метастатическим риском УМ

Активируются	Подавляются
микроРНК-20a	микроРНК-181a
микроРНК-124	микроРНК-211
микроРНК-155	
микроРНК-224	
микроРНК-let-7b	
микроРНК-142	
микроРНК-199	

Публикаций, посвященных роли микроРНК, их комбинаций у больных именно МХ практически нет. Обсуждаются результаты по УМ [96], однако МХ имеют свои особенности не только клинические, но и отличаются по характеру течения. Кроме того, некоторые микроРНК в исследованиях демонстрируют противоречивые результаты. Не исключено, что такие расхождения обусловлены различными по качеству образцами опухоли, разными критериями классификации и включения, используемыми в каждом исследовании, вариациями обработки образцов, предшествующими цитотоксическими обработками, неоднородностью опухоли и недооценкой гипоксии и инфекции.

На основании проанализированной литературы выделены основные микроРНК, участвующие в развитии УМ (таблица 6)

МикроРНК в плазме крови больных УМ

Микро РНК	Повышение\ снижение	плазма	Авторы	
16	повышается	плазма	Triozzi P.L., et al. 2012	УМ
20a	повышается	плазма	Achberger S., et al. 2014	УМ
92b	повышается	плазма	Triozzi P.L., et al. 2016	УМ
106a	<i>понижается</i>	плазма	Triozzi P.L., et al. 2012	УМ
125b	повышается	плазма	Achberger S., et al. 2014	УМ
126	<i>понижается</i>	плазма	Triozzi P.L., et al. 2012	УМ
146a	повышается	плазма	1) Achberger S., et al. 2014 2) Ragusa M., et al. 2015	УМ
155	повышается	плазма	Achberger S., et al. 2014	УМ
181a	повышается	плазма	Achberger S., et al. 2014	УМ
199a	повышается	плазма	Triozzi P.L., et al. 2012	УМ
199a-5p	повышается	плазма	Triozzi P.L., et al. 2016	УМ
223	повышается	плазма	Achberger S., et al. 2014	УМ

Как видно из представленной таблицы, в плазме крови больных УМ характеристика уровней 12 микроРНК менялась в зависимости от их действия. Повышенной экспрессией характеризуются -10 микроРНК, а 2 микроРНК – снижением. МикроРНК-106a и микроРНК-126 в плазме крови больных УМ характеризуются снижением уровня экспрессии [128]. Как было уже сказано выше, данная работа посвящена изучению связи микроРНК с ангиогенными белками у пациентов УМ на фоне появившихся метастазов. Таким образом, можно сделать

предварительный вывод, что характеристика данных микроРНК представлена в стадии метастазирования.

В соответствии с современными представлениями микроРНК признают ключевыми регуляторами экспрессии генов и кодируемых ими белков. Что дает основание утверждать, что молекулы микроРНК принимают участие в физиологических функциях клеток и тканей различных органов. Однако конкретные механизмы их участия пока остаются малоизвестными. В настоящее время исследования роли микроРНК в регуляции различных функций глаза и их нарушений при патологических процессах весьма ограничены. Тем не менее, анализ данных литературы, касающихся исследования спектра и уровня микроРНК при УМ, указывают на перспективность таких исследований [29, 78, 123, 137, 143, 144]. Таким образом, на основании проанализированных работ можно выделить специфические циркулирующие в плазме крови микроРНК, имеющие потенциальную диагностическую ценность для раннего выявления УМ, что позволило продолжить это направление в нашем исследовании.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Общая характеристика собственных наблюдений

Работа выполнена на кафедре офтальмологии Российской медицинской академии непрерывного последипломного образования Минздрава РФ, обследование больных проводили на базе «Московский городской офтальмологический центр» ГКБ им.С.П. Боткина. Лабораторное исследование по измерению уровней экспрессии микроРНК проводили на базе Научно-исследовательского института молекулярной и персонализированной медицины РМАНПО (директор НИИ молекулярной и персонализированной медицины д.м.н. Мирзаев К.Б., исполнители: Буре И.В.).

В исследовании приняли участие 84 больных МХ (таблица 7), средний возраст $63,4 \pm 1,2$ (35-86 лет). Мужчин -31 (37%) и женщин - 53 (63%). Все пациенты заполнили письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Критериями включения пациентов в группы были:

- ✓ установленный диагноз меланомы хориоидеи в стадии NoMo на основании клинической, офтальмоскопической картины, результатов инструментальных методов исследования.

Критериями исключения были:

- ✓ наличие визуализируемого экстабульбарного узла;
- ✓ наличие инструментально подтвержденных метастазов (проведение энуклеации в связи с болевым синдромом);
- ✓ больные МХ, имеющие в анамнезе другие опухолевые заболевания
- ✓ больные МХ, имеющие в анамнезе аутоиммунные заболевания

С учетом толщины опухоли все больные были разделены на три традиционные группы: начальные МХ (проминенция до 3 мм), средние (проминенция более 3 мм и до 5 мм) и большие (проминенция более 5 мм). Размеры МХ варьировали по проминенции в пределах от 0,77 мм до 17,19 мм, средняя проминенция $7,21 \pm 0,43$ мм, диаметр от 3 мм до 19,87 мм, средний диаметр $12,81 \pm 0,36$ мм. Данные о проминенции и диаметру получены с помощью УЗ-биометрии опухолевого узла.

Характеристика пациентов по группам, гендерному признаку и возрасту

Группа	n больных	пол		Возраст ср.значение от и до (лет)
		м	ж	
начальные МХ	16 (19%)	3 (10%)	13 (25%)	64,13±2,6 от 46 до 81
средние МХ	13 (15,5%)	8 (26%)	5 (9%)	65,54±3,53 от 43 до 86
Большие МХ	55 (65,5%)	20 (64%)	35 (66%)	62,7±1,5 от 35 до 83
Всего	84	31 (37%)	53 (63%)	63,4±1,2 от 35 до 86

В зависимости от расположения опухолевого узла – всех 84 больных разделили на 2 группы: постэкваториально (75 больных) – 89% и преэкваториально (9 больных) – 11%.

Больным с большими МХ (55 человек) проведено хирургическое лечение – энуклеация с последующим патоморфологическим исследованием. Веретеночеточная МХ выявлена в 45 глазах, меланома смешанного типа с преобладанием веретенообразных клеток в 6 глазах и эпителиоидночеточная меланома в 4 глазах. Учитывая преобладание в группе смешанных МХ веретенообразных клеток – мы объединили эту группу с группой веретеночеточной МХ в одну. Таким образом: группа веретеночеточной МХ составила - 51 глаз и эпителиоидночеточной МХ – 4 глаза.

Группа контроля состояла из 28 волонтеров (мужчин -14; женщин – 14) в возрасте от 45 до 78 лет (62,9±1,42) не имеющих опухолевых или хронических аутоиммунных заболеваний (таблица 8). Все волонтеры также заполнили письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Критериями включения добровольцев в группу были:

- ✓ возраст от 40 до 80;
- ✓ из глазной патологии: наличие сенильной катаракты;
- ✓ заключение терапевта (с указанием артериального давления, и с анализами крови – холестерин в пределах нормы).

Критериями исключения были:

- ✓ из глазной патологии: наличие глаукомы, воспалительных заболеваний глаз;
- ✓ тяжелая сопутствующая патология (сахарный диабет);
- ✓ хронические аутоиммунные заболевания; наличие онкологических заболеваний.

Таблица 8

Характеристика контрольной группы по гендерному признаку и возрасту

	n волонтеров	пол		Возраст ср.знач от и до (лет)
		м	ж	
КОНТРОЛЬ	28	14	14	62,9±1,42 от 45 до 78

2.2. Методы исследования больных

Всем пациентам проведено полное клиническое офтальмологическое обследование по общепринятой схеме.

- Визометрию (определение остроты зрения) осуществляли с использованием проектора знаков «Томеу» (Япония) и набора корригирующих линз по стандартной методике при каждом визите больного.

- Тонometriю проводили контактным методом с использованием тонометра Маклакова (грузом 10 г) под местной анестезией 0,4% раствором инокаина. Диаметр отпечатка измеряли линейкой Поляка Б.Л. и бесконтактным методом – тонометром «Huvitz» Non-contact tonometer (Корея).
- Периметрию проводили на стандартном сферопериметре «Периком» по общепринятой методике с использованием объектов белого цвета различной яркости и величины (с учетом остроты зрения пациента)
- Биомикроскопию проводили на щелевой лампе «Zeiss» (Германия) при 10-, 16- и 24-кратном увеличении, при этом оценивали состояние кожных покровов век, переднего отдела глаза: конъюнктивы, состояние эписклеральных сосудов, прозрачность роговицы, глубину передней камеры и прозрачность влаги, форму зрачка и его реакцию на свет, рельеф радужки, хрусталик и стекловидное тело;
- Офтальмоскопию проводили последовательно, начиная с прямой с использованием офтальмоскопа «Keeler Ltd.» (Великобритания) в условиях медикаментозного мидриаза (2-кратные инстилляциии 0,5% раствора тропикамида).
- Биомикроофтальмоскопию выполняли на щелевой лампе «Zeiss» (Германия) с помощью бесконтактной линзы для непрямой офтальмоскопии «Volk Optical Inc» 78D и 90D (США) или контактной трехзеркальной линзой Гольдмана «Volk Optical Inc» (США) после предварительной инстилляционной анестезии 0,5% раствором алкаина.
- Диафаноскопию (рисунок 3) проводили в темном помещении, в условиях максимального медикаментозного мидриаза, с помощью трансиллюминатора «Welch Allyn Inc.», США.

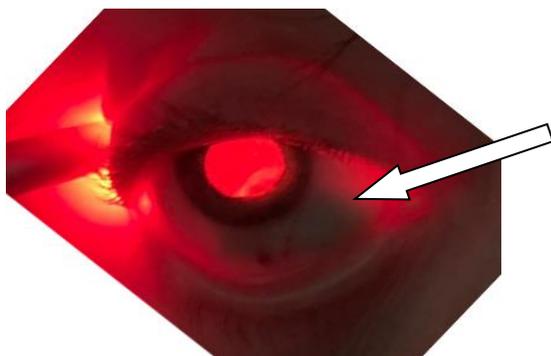


Рисунок 3. Фото глаза на фоне диафаноскопии больной Х., 55 лет. Диагноз: OD-цилиохориоидальная меланома. Стрелкой указана тень опухоли на склере по меридианам – 4 - 6:30 часов.

-Гониоскопию выполняли линзой Гольдмана после предварительной двухкратной инстилляционной анестезии 0,5% раствором алкаина.

-Ультразвуковое сканирование проводили в отделении функциональной диагностики на аппарате ультразвуковой эхографии глаза – фирмы «A/B Scan Tomey UD 6000» (Япония) (заведующий отделением функциональной диагностики Добросердов А.В.).

-Оптическую когерентную томографию проводили при центральной локализации опухоли на аппарате ОКТ (фирмы Германия)

-Цифровое фотографирование глазного дна выполняли с помощью фундус-камеры TRC-50EX (Япония).

-Гистологическое исследование энуклеированных глаз проводила в патогистологической лаборатории ГКБ им.С.П. Боткина, к.м.н. Нечеснюк С.Ю. (рисунок 3)

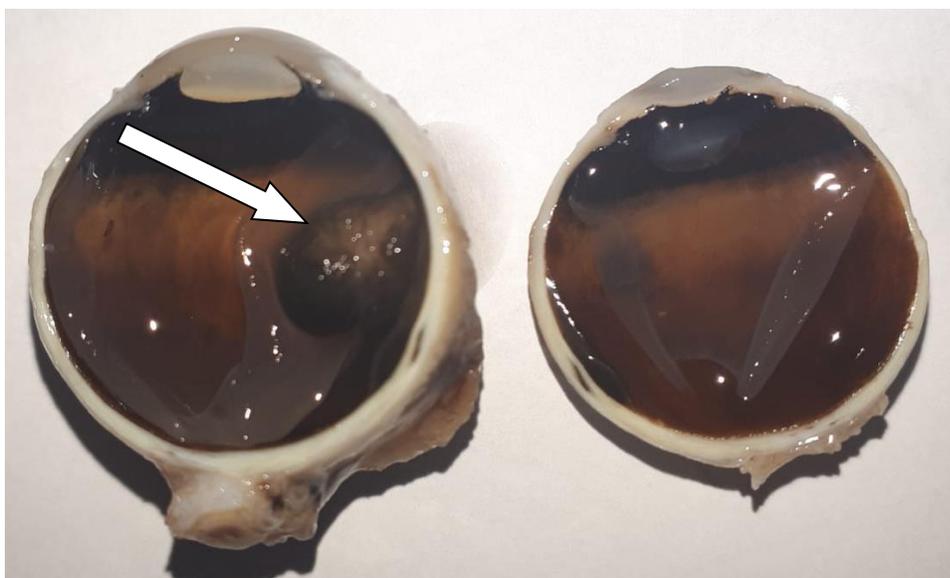


Рисунок 3. Макрофото глаза больного Г., 68 лет. На разрезе видна опухоль темно-коричневого цвета толщиной 6,68 мм (стрелка).

С целью исключения метастазов всем больным до лечения проведено обследование органов грудной клетки и органов брюшной полости (компьютерная томография или магнитно-резонансная томография).

2.3. Лабораторные методы исследования

Материалом для исследования уровня экспрессии микроРНК служила плазма венозной крови, полученная от пациентов и контрольной группы. Перед исследованием все участники были информированы о целях исследования, после чего получено письменное информированное согласие.

Образцы крови пациентов объемом 4 мл были собраны до начала лечения в период от марта 2019 года до декабря 2020 года.

2.3.1. Подготовка клинических проб

Отбор образцов периферической крови участников исследования проводили в процедурном кабинете. Кровь (4 мл) отбирали в одноразовые стерильные пробирки с антикоагулянтом этилендиаминуксусной кислотой (ЭДТА). Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивали для перемешивания с антикоагулянтом и затем устанавливали в специальный штатив. После чего штатив в специальной транспортной сумке доставлялся в Научно-исследовательский институт молекулярной и персонализированной медицины РМАНПО. Для получения плазмы пробирку центрифугировали в течение 10 минут при ускорении 2000 оборотов в минуту, после чего плазму (супернатант) крови отделяли от клеточного осадка и переносили в стерильные пробирки объемом 2 мл, незамедлительно замораживали и хранили до использования в холодильниках при температуре -80°C.

Выделение суммарной РНК, включая микроРНК, проводили в соответствии с протоколом производителей, с использованием реагента Qiazol и набора miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Хильден, Германия) с небольшими модификациями. Реагент

Qiazol добавляли к 500 мкл плазмы в объемном соотношении 2:1. После внесения в пробирку хлороформа и последующего центрифугирования для разделения фаз, водную фазу переносили в новую пробирку и добавляли к ней 1,5 объема 100% этанола. Раствор, содержащий РНК, загружали в колонку miRNeasy и подвергали дальнейшей отмывке в соответствии с инструкциями производителя. Окончательный объем элюции составлял 15 мкл. Концентрация и чистота полученной РНК оценивалась на спектрофотометре для микрообъемов Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Нью-Йорк, США). Процесс выделения повторяли для каждого образца до получения достаточного количества РНК для следующих этапов.

2.3.2. Методика ПЦР в режиме реального времени

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора Mi Script II RTKit (Qiagen) в соответствии с рекомендованным протоколом. Для получения кДНК использовали 300 ng суммарной РНК, выделенной из каждого образца, которую вносили в реакционную смесь (3,8мкл 5x miScript Hi Flex Buffer, 2 мкл 10XmiScript Nucleics Mix, 1 мкл miScript Reverse Transcriptase Mix, 2,2мкл экзогенного контроля cel-miR-39-3p и свободная от РНКаз вода до 20 мкл) и инкубировали 60 минут при 37 °С, с последующим увеличением температуры до 95°С на 5 минут для инактивации транскриптазы.

ПЦР в реальном времени повторяли три раза для каждой анализируемой микроРНК, а также экзогенного контроля cel-miR-39-3p, с использованием набора MiScriptSYBRGreenPCRKit (Qiagen), пресинтезированного праймера miScript Primer Assay (Qiagen) для контроля и подобранных в лаборатории праймеров для микроРНК (последовательности указаны в таблице 9) в объеме реакционной смеси 12 мкл (2 мкл полученной кДНК, 5 мкл 2x Quanti Tect SYBR Green PCRMaster Mix, 1 мкл 10x miScript Universal Primer, 1 мкл 10x miScript Primer Assay к исследуемым микроРНК и свободная от РНКаз вода до 12 мкл). ПЦР в реальном времени ставили на приборе (рисунок 3) CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Геркулес, США) по рекомендованной производителем программе (15 минут при 95 °С для

активации Hot Star TaqDNA Polymerase и 40 трехступенчатых циклов (94 °С - 15 сек., 55 °С– 30 сек., 70 °С – 30 сек.)). Экспрессия микроРНК была нормализована относительно экзогенного контроля cel-miR-39-3p.



Рисунок 4. Фото прибора CFX96 Real-Time PCR Detection System для проведения ПЦР

Таблица 9

Последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени

микроРНК	Последовательность
miR-146a	5'- TGAGAACTGAATTCCATGGGTТААА -3'
miR-155	5'-ТТААТГСТААТСГТГАТАGGGGTAAAA-3'
miR-126	5'- САТТАТТАСТТТТGGTACGCGAAAA -3'
mir-27b	5'- AGAGCTTAGCTGATTGGTGAACAA -3'

miR-223	5'- CGTGTATTTGACAAGCTGAGTTAA -3'
---------	----------------------------------

В контрольной группе определяли уровень экспрессии каждой микроРНК в плазме крови волонтеров в возрасте $62,9 \pm 1,42$ (45-78) лет, аналогичных возрасту поражения больных МХ. Для выбранных микроРНК было выделено индивидуальное среднее значение с целью дальнейших расчетов. Таким образом,

контроль для:

микроРНК-146а = $0,013 \pm 0,005$;

микроРНК-155 = $0,039 \pm 0,007$;

микроРНК-223 = $0,04998 \pm 0,0345$;

микроРНК-126 = $0,148 \pm 0,033$;

микроРНК-27b = $0,000098 \pm 0,000016$.

В последующем все расчеты были проведены по каждой микроРНК с учетом ее контроля. МикроРНК измеряют в условных единицах. В нашем исследовании контроль принят за 100 %, определение уровня экспрессии каждой микроРНК из исследованных (выше или ниже контрольных показателей) определяли в процентах отклонения от уровня контроля.

2.4. Статистическая обработка результатов исследования

Экспрессия микроРНК (x) выражалась в относительных единицах, вычисляемые по формуле $x = 2^{-\Delta Ct}$, где ΔCt – рабочие значения изменения цикла получения продукта относительно внутреннего контроля экспрессии микроРНК cel-miR-39-3p. Статистический анализ полученных данных производили с помощью стандартных методов статистической обработки с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel и пакета прикладных программ «Statistica» v.13.0, StatSoftInc (США). Данные представлены значениями медианы и интерквартильного размаха для непараметрических переменных. Полученные

значения экспрессии проверяли на нормальность распределения с дальнейшим применением корреляции Спирмена и U-критерия Манна–Уитни для сравнения независимых переменных. Критический уровень значимости принимался равным 5%, т. е. нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$. Проводили ROC-анализ для определения наиболее чувствительной микроРНК.

Глава 3. Результаты собственных исследований и их обсуждение

3.1. Особенности клинической картины больных меланомой хориоидеи и факторы риска ее прогрессирования

Обследовано 84 больных с диагнозом МХ (стадия N_0M_0). Из них мужчин -28 и женщин -56. Средний возраст составил $63,4 \pm 1,2$ лет (35- 86 лет). Средняя толщина опухоли составила $7,21 \pm 0,43$ мм (0,77-17,19 мм), средний диаметр $12,81 \pm 0,36$ мм (3-19,87 мм). С учетом проминенции опухоли больные разделены на три группы (таблица 10).

Таблица 10

Распределение больных с учетом проминенции меланомы

Группа	Проминенция МХ (мм)	Количество больных
Начальные МХ	$2,09 \pm 0,15$ (0,77- 2,8)	16
Средние МХ	$4,35 \pm 0,19$ (3,11 - 4,99)	13
Большие МХ	$9,38 \pm 0,41$ (5,03 - 17,19)	55

У пациентов первых двух групп ($n=29$), имевших толщину опухоли до 5 мм, средние показатели по проминенции составили $3,10 \pm 0,24$ мм (0,77 - 4,99), по диаметру $11,04 \pm 0,6$ мм (0,3 - 14,98). Всем проведена брахитерапия. Больным, имевшим МХ толщиной более 5 мм, проведена энуклеация. Тип опухоли установлен при патогистологическом исследовании. В группе больших меланом

проминенция опухоли варьировала от 5,03 до 17,19 мм. В связи с чем больных этой группы мы разделили на три подгруппы по толщине опухоли (таблица 11).

Таблица 11

Распределение в группе больших опухолей

Подгруппа	Проминенция МХ (мм)	Количество больных
1	6,02±0,17 (5,03 - 6,92)	16
2	8,5±0,25 мм (7,07-10)	17
3	12,5±0,4 мм (10,41- 17,19)	22

Клиническая картина МХ на протяжении более пяти веков достаточно подробно описана. Но офтальмологическая картина отличается полисимптоматичностью, меняется в зависимости от размеров и локализации меланомы. На рисунке 5 представлена офтальмоскопическая картина МХ трех групп с учетом метрических данных.

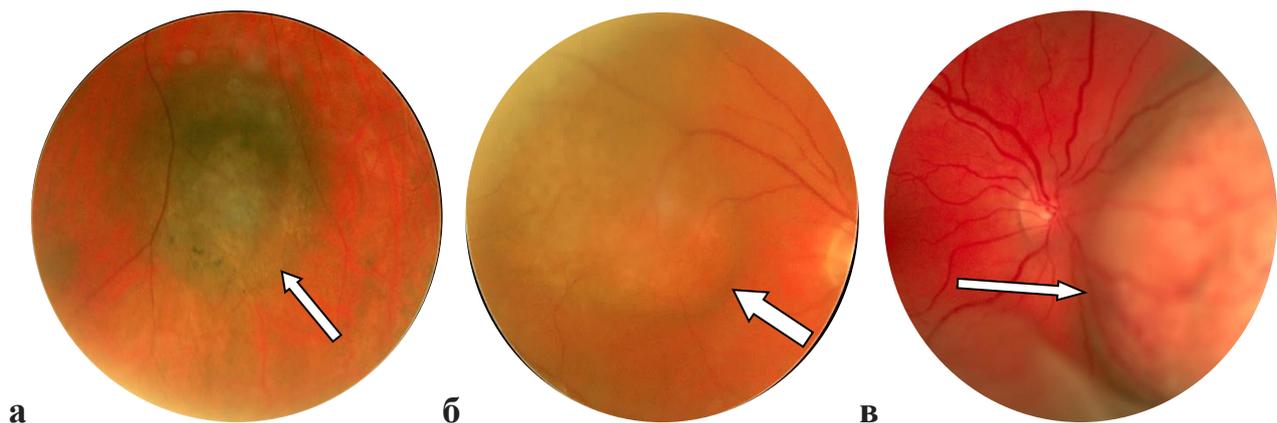


Рисунок 5. Глазное дно больных МХ. **а.** общий вид начальной МХ, проминенция 1,5 мм (1 группа); **б.** общий вид меланомы средних размеров, проминенция 3,28мм (2 группа); **в.** общий вид МХ больших размеров, проминенция 9,62 мм (3 группа). Стрелками обозначен узел опухоли.

Начальная МХ (16 глаз) в наших наблюдениях офтальмоскопически была представлена небольшим округлыми (7 глаз) или овальной формы (9 глаз) узлами, проминенция которых колебалась в пределах 0,77 – 3,0 мм (средняя проминенция $2,09 \pm 0,15$ мм).

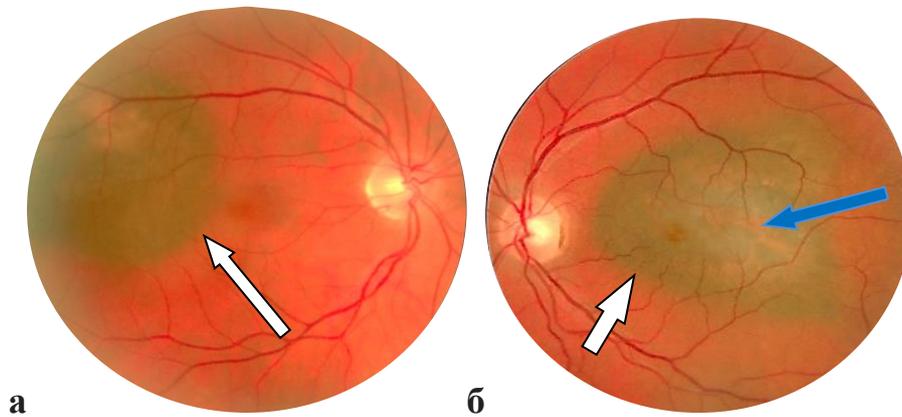


Рисунок 6. а и б. Фото глазного дна больных меланомой хориоидеи а. белой стрелкой обозначена опухоль; б. синей стрелкой – поля оранжевого пигмента.

В 11 глазах при толщине опухоли не более 2 мм сетчатка прилежала, хорошо просматривались глубже лежащая ткань (рисунок 6). При увеличении толщины опухоли от 2 мм удавалось визуализировать офтальмоскопически и подтвердить по данным ОКТ – начальную отслойку сетчатки (5 глаз). Особенно полезным оказалась ОКТ при слабой окраске опухоли. Границы опухоли во всех 16 глазах были нечеткими. При достижении толщины МХ от 2 мм вокруг очага или на его поверхности становились офтальмоскопически различимыми друзы пигментного эпителия сетчатки. Как правило, друзы были мелкого калибра (5 глаз), в 3 глазах друзы - среднего калибра. В наших случаях, как правило, друзы имели неравномерное распределение (7 глаз), равномерное распределение только в 3 глазах. По данным литературы исчезновение друз в процессе динамического наблюдения расценивают как признак прогрессии опухоли [113]. Как показали наши исследования и данные литературы [10], симптом «исчезновения» друз связан с отслойкой нейроэпителия, возникающего при опухолях более 2 мм: друзы становятся невидимыми в результате нарастания отслойки нейроэпителия и деформации наружных слоев сетчатки.

Поля оранжевого пигмента визуализированы в 15 глазах при минимальной толщине опухоли 2 мм (рисунок 6). По мере роста опухоли офтальмоскопическая картина менялась. При толщине меланомы от 3 мм и более на поверхности слабо пигментированной опухоли желтовато-коричневой окраски при контактной биомикроофтальмоскопии визуализировались новообразованные сосуды (7 глаз). Они были как единичными, расположенными в ткани опухоли, так и хаотично расположенными. Наличие новообразованных сосудов в опухолях светлой окраски проминенцией 2 мм доказаны с помощью ФАГ [1, 44]. Сетчатка в первых двух группах, как правило, прилежала к поверхности опухоли, и в 5 глазах при толщине более 4,89 мм отслойка сетчатки была более выраженной.

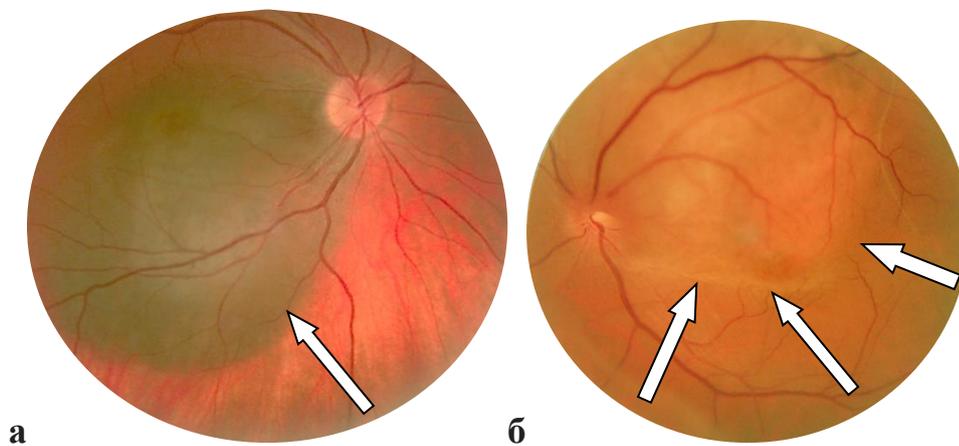


Рисунок 7. Фото глазного дна больших меланомой хориоидеи. **а.** пигментированная МХ, стрелкой обозначена опухоль; **б.** беспигментная МХ, стрелки указывают на опухоль.

Большие МХ (55 глаз) офтальмоскопически были представлены обширным проминирующим очагом. Цвет опухоли варьировал (рисунок 7) от интенсивно пигментированного (36 глаз) до беспигментного (4 глаз). При больших диаметрах $13,74 \pm 0,42$ мм (6,63-19,87мм) границы опухоли офтальмоскопировались по окружности с трудом, но более четко определялся ее крутой край. В 15 глазах имела место почти тотальная отслойка сетчатки и опухоль просматривалась через отслоенную сетчатку с трудом, тень опухоли, ее размеры, конфигурацию удавалось определить только на эхограмме. В этих случаях степень пигментации была определена при патоморфологическом исследовании. В итоге интенсивно

пигментированная меланома диагностирована в 51 глазу. В 40 глазах при толщине меланомы более 7 мм отслойка сетчатки локализовалась по периферии. На поверхности опухоли офтальмоскопически сетчатка «прилежала» и ее «отстояние» от поверхности визуализировали только по эхограмме (31 глаз). Поверхность опухоли была бугристая в 38 глазах, гладкая в 17 глазах. При толщине опухоли от 6 мм в надлежащей сетчатке определялись кровоизлияния (34 глаза), они имели вид «капли» крови на поверхности или «расплывшегося пятна» (рисунок 8).

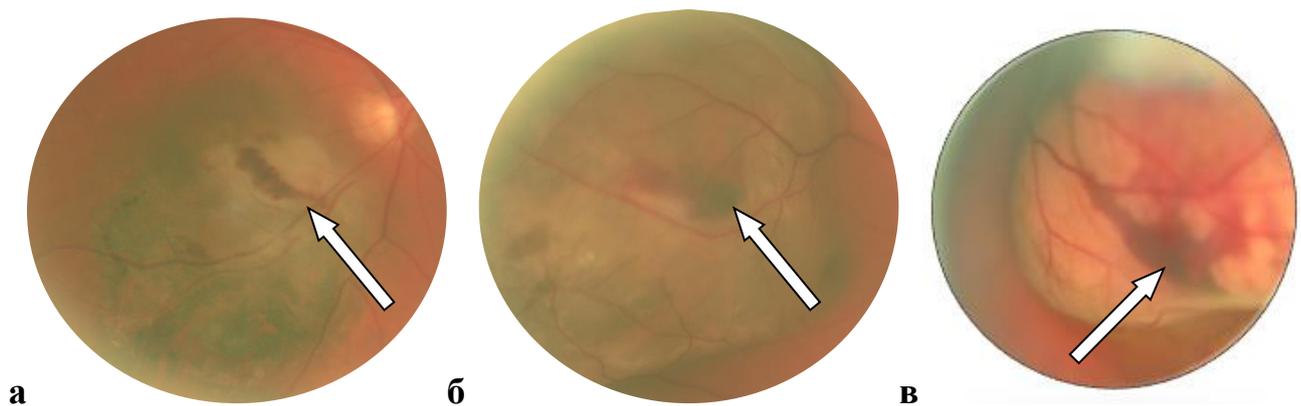


Рисунок 8. Фото глазного дна больных меланомой хориоидеи. **а**, **б** и **в**. стрелками обозначены кровоизлияния на поверхности меланомы.

Грибовидная форма МХ диагностирована у 48 больных (рисунок 9). В 45 глазах визуализированы новообразованные сосуды в большом количестве. При толщине опухоли более 7 мм наблюдали «выход» ее в стекловидное тело. Дистантную отслойку сетчатки визуализировали у 18 больных, этот симптом расценивают, как признак агрессивного роста опухоли [115].

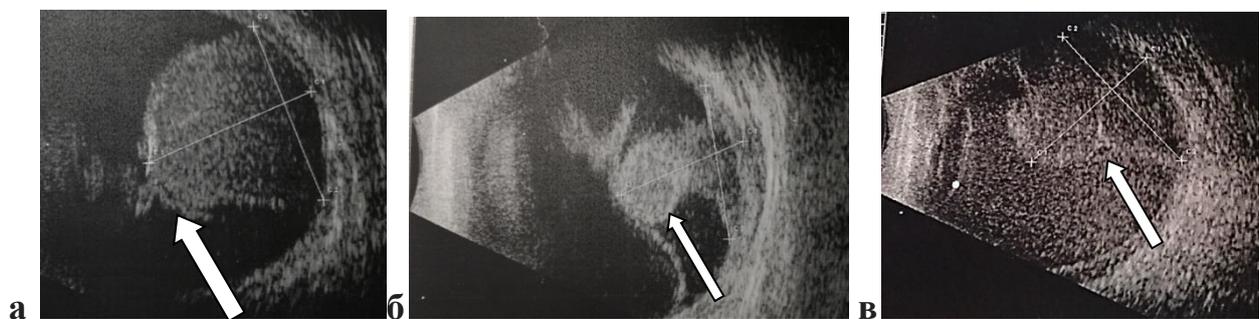


Рисунок 9. Эхограммы глаз с большими МХ. Стадии развития МХ грибовидной формы. **а**. начало формирования ущемления опухоли в стекловидной пластинке

(стрелка); **б.** выход головки опухоли в стекловидное тело (стрелка); **в.** грибовидная форма МХ с тотальной отслойкой сетчатки.

Таким образом, меньше всего богата офтальмоскопическими симптомами начальная меланома, и порою ведущим признаком диагноза меланомы являются функциональные нарушения. Что касается средних и больших МХ, то биомикроофтальмоскопические симптомы представлены достаточно широко, и диагноз меланомы не вызывает сомнения. Это согласуется с появившимися в литературе, в последние годы, мнением о возможности точной офтальмоскопической диагностики МХ [115].

3.2. Меланома хориоидеи и микроРНК

3.2.1. Характер изменения экспрессии микроРНК в плазме крови больных меланомой хориоидеи

Проанализирован характер изменения экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-126, микроРНК-155 и микроРНК-146a в плазме крови 84 больных МХ (стадия N₀M₀). Для сравнения использованы результаты исследования указанных микроРНК в плазме крови 28 волонтеров контрольной группы, аналогичных по возрасту. Оказалось, что уровень экспрессии всех перечисленных микроРНК был увеличен у всех 84 больных МХ. Статистические расчеты представлены в таблице 12 и на рисунке 10.

Таблица 12

Сравнение уровня экспрессии микроРНК в плазме крови 84 больных меланомой хориоидеи и 28 волонтеров

МикроРНК	Контроль n=28	пациенты n=84	Сдвиг %	p
223	0,04998±0,0345	0,236±0,023	↑4,72 > 372%	p<0,001
27b	0,000098±0,000016	0,000396±0,000035	↑4,04 > 304%	p<0,001
126	0,148±0,033	0,318±0,021	↑2,15 > 115%	p<0,001
155	0,039±0,007	0,063±0,002	↑1,62	p<0,001

			>62%	
146a	$0,013 \pm 0,005$	$0,022 \pm 0,003$	$\uparrow 1,69$ >69%	$p=0,002$

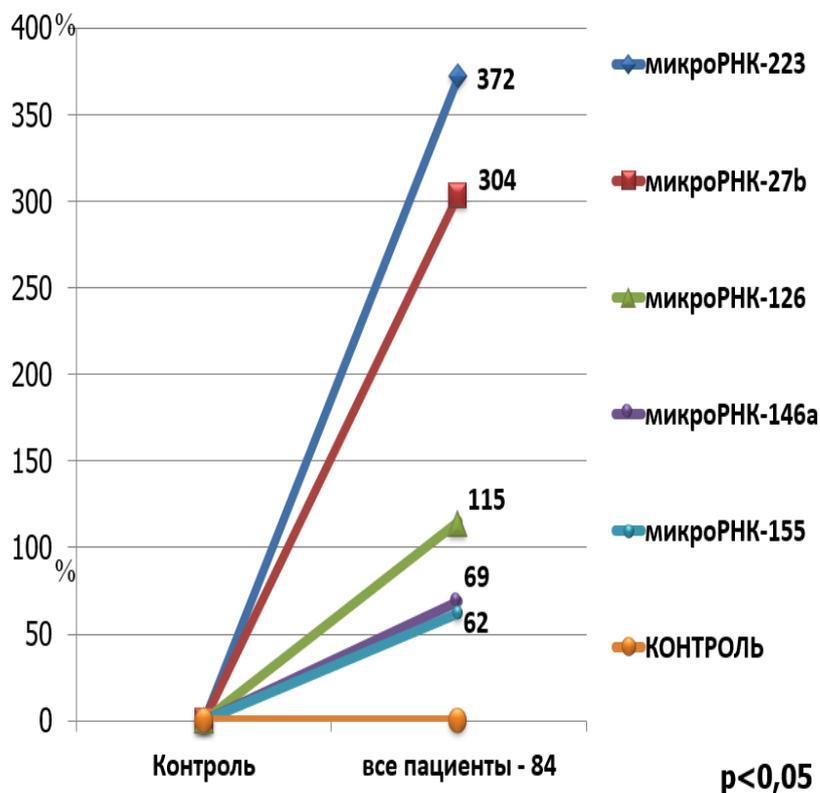


Рисунок 10. График повышения экспрессии микроРНК у больных меланомой хориоидеив процентах в сравнении с контрольной группой, принятой за 100%. Статистически достоверны ($p < 0,05$)

Однако показатели уровня экспрессии микроРНК оказались не равнозначными. Как видно из представленных графика 10 и таблицы 12, в плазме крови 84 больных МХ наибольшая экспрессия характерна для микроРНК-223 и микроРНК-27b (372% и 304% соответственно). Промежуточное положение занимает микроРНК-126, экспрессия которой была повышена на 115%. Незначительное повышение экспрессии (на 62% и 69%) характерно для микроРНК-155 и микроРНК-146 соответственно. Для понимания такой значительной разницы между микроРНК построены столбчатые диаграммы (рисунок 11).

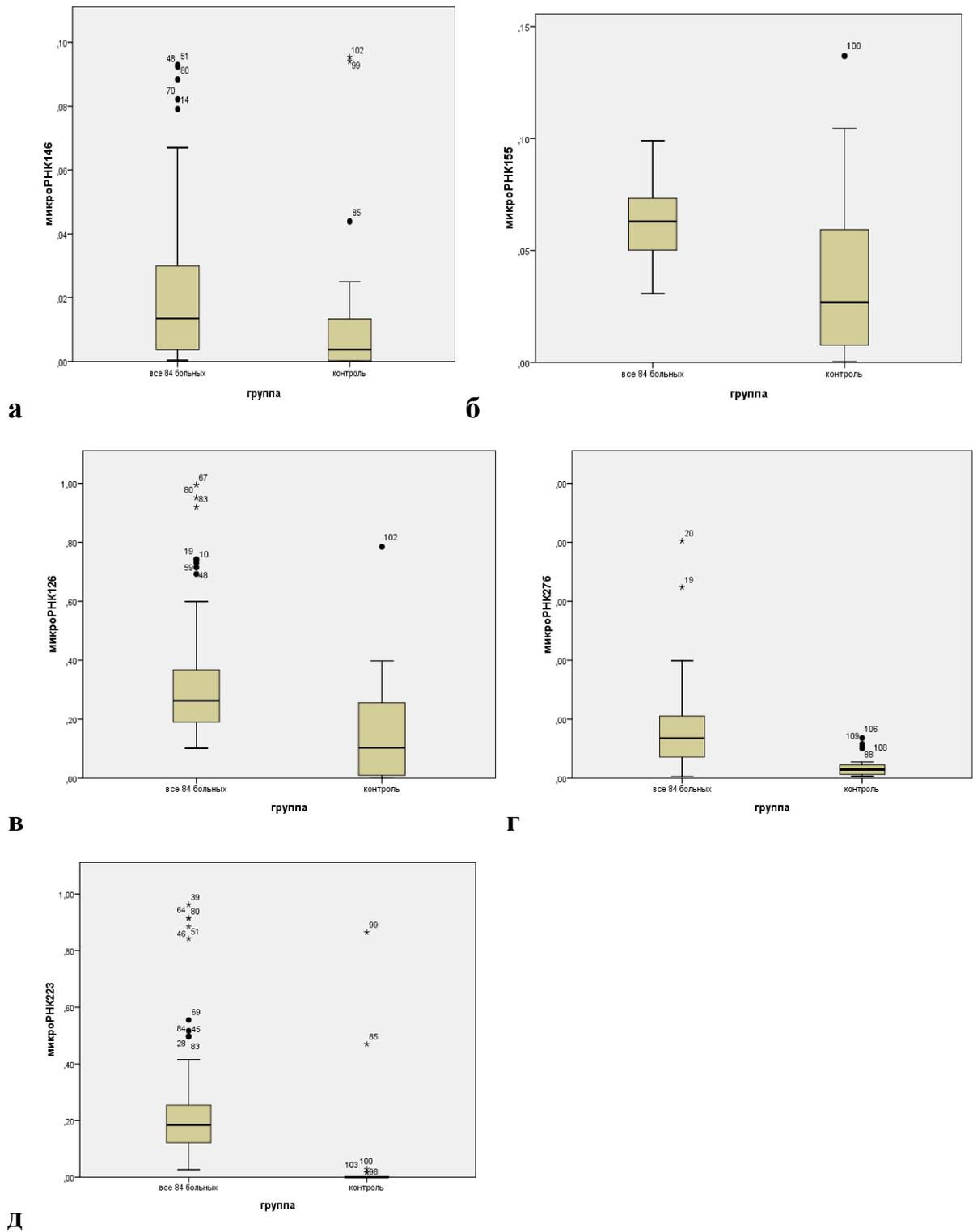


Рисунок 11. Столбчатые диаграммы – сравнение уровня экспрессии микроРНК в плазме крови 84 больных МХ с контрольной группой. **а.** микроРНК-146а; **б.** микроРНК-155; **в.** микроРНК-126; **г.** микроРНК-27b; **д.** микроРНК-223.

Как следует из представленных столбчатых диаграмм, значительная разница в уровне экспрессии в плазме крови между группой больных и контролем оказалась

характерной для микроРНК-223 и микроРНК-27b, что подтверждает результаты выше приведенных расчетов.

МикроРНК-223 описана впервые в 2004 году при изучении дифференциации клеток, участвующих в гемопоэзе [37], а позднее было указано на участие этой микроРНК в развитии лейкоза [62]. Доказано, что микроРНК-223 участвует в регуляции миелоидных супрессорных клеток (myeloid-derived suppressor cells - MDSC) [88]. Показано, что микроРНК-223 воздействуя на MEF2C заметно подавляет дифференцировку клеток костного мозга. Дальнейшее изучение микроРНК-223 выявило низкую ее экспрессию при колоректальном раке, раке шейки матки и гепатоцеллюлярной карциноме, а при раке предстательной железы, раке молочной железы и раке желудка, напротив зафиксировали повышенную экспрессию [51, 86, 138, 149]. Таким образом, микроРНК-223 может выполнять противоположные функции в различных типах рака, т.е. обладает плейотропизмом – способностью одного гена влиять на несколько признаков (множественное действие генов) [61].

МикроРНК-27b, рассматривают в качестве биомаркера при сквамозно-клеточном раке языка и раке яичника. Доказано участие этой микроРНК в росте и развитии данных опухолей [40]. Насколько нам известно, на декабрь 2022 года, исследование микроРНК-27b у больных УМ не проводили, и этот биомаркер, как показатель агрессивности МХ, использован нами впервые¹. Имеются публикации о роли микроРНК-27a в тканях меланомы [122, 124]. Авторы показали, что генистеин заметно ингибирует экспрессию микроРНК-27a и усиливает экспрессию целевого гена ZBTB10 при УМ. В эксперименте продемонстрировано, что генистеин в зависимости от концентрации подавлял рост клеток УМ *in vivo* и *in vitro*. Таким образом, уровень экспрессии микроРНК-27a повышается в тканях УМ и может быть расценен, как ее онкоген. Именно эти микроРНК (27b и 223), не зависимо от размеров опухоли, в наших исследованиях, имели наибольшую экспрессию в плазме крови больных МХ (304% и 372% соответственно).

1. патент №2021123797 от 10.08.2021 «Способ диагностики меланомы хориоидеи»

МикроРНК-126 относят к ангиогенным микроРНК: показано ее участие в онкогенезе посредством подавления ингибиторов VEGF-индуцированной пролиферации в эндотелиальных клетках, путем воздействия на регуляцию целостности сосудов и нарушение процессов ангиогенеза [94]. Доказана диагностическая ценность повышения уровня микроРНК-126 при сквамозно-клеточном раке языка и гепатоцеллюлярном раке [28]. Авторы дали положительную характеристику микроРНК-126 в качестве маркера активности опухолевого процесса. По нашим данным микроРНК-126 по своей активности у больных МХ занимает 3 место и уровень ее экспрессии достигает 115% ($p < 0,05$).

Что касается **микроРНК-146а** и **микроРНК-155**, то незначительное увеличение их экспрессии (на 69 и 62% соответственно) не совпадает с данными литературы. Так, S. Achberger с соавторами, обследуя всего 6 больных с большими увеальными меланомами, пришел к выводу, что микроРНК-146а, микроРНК-155 характеризуются повышенной экспрессией до начала лечения и увеличиваются по мере появления метастазов, что можно расценивать как свидетельство активизации опухолевого процесса [20]. МикроРНК-146а, по данным литературы, относят к иммунным микроРНК, обладающими иммуносупрессивным действием [85]. Эта микроРНК является мишенью MITF-фактора (Microphthalmia-associated Transcription Factor-Microphthalmia - связанный транскрипционный фактор) протоонкогенного (обычного гена, который может стать онкогеном из-за мутаций или повышения экспрессии) фактора транскрипции действующего как главный регулятор развития, функционирования и выживания меланоцитов. Он также может быть вовлечен в процесс пигментации и роста хориоидальной меланомы.

По данным литературы, микроРНК-155 относят к наиболее активной при опухолях как в ее ткани, так и в биологических жидкостях [73], также, как и микроРНК-146а относят к иммунным микроРНК. Доказано участие микроРНК-155 в клеточном и гуморальном иммунитете, но авторы осторожны в своих высказываниях, поскольку ее роль до конца не ясна [43]. Известно только, что повышенная экспрессия микроРНК-155 связана с плохим витальным прогнозом и

высоким риском развития метастазов при аденокарциноме легкого, раке мочевого пузыря и лимфобластном лейкозе [103]. Как показали наши исследования микроРНК-155 у больных МХ дает наименьший процент прироста экспрессии (62%). Но для уточнения диагностической значимости полученных различий по результатам исследования уровня экспрессии микроРНК мы провели ROC-анализ (таблица 13 и рисунок 12).

Таблица 13

ROC-анализ микроРНК: группа больных МХ (84) и контроль (28)

МикроРНК	AUC	Чувствительность %	Специфичность %	p
микроРНК-223	0,934	93	99	p<0,05
микроРНК-27b	0,870	86	80	p<0,05
микроРНК-126	0,788	64	88	p<0,05
микроРНК-155	0,730	57	100	p<0,05
микроРНК-146a	0,700	75	63	p<0,05

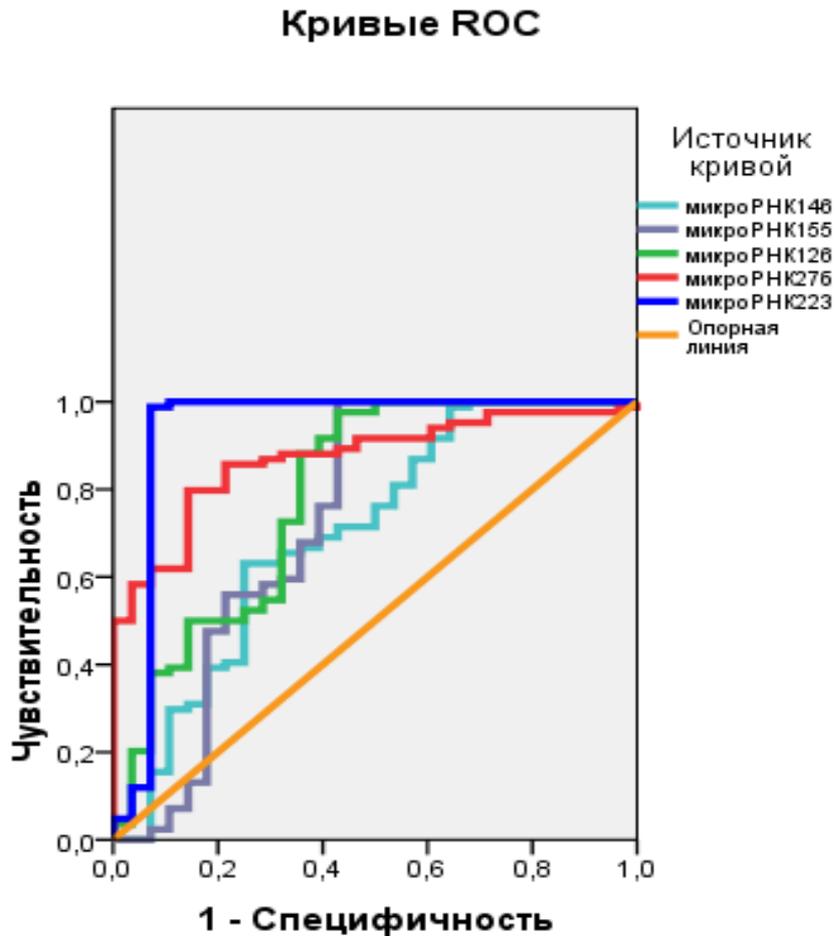


Рисунок 12. ROC-кривые диагностической значимости микроРНК. Классификатор на основе бинарной логистической регрессии выбранных микроРНК. На ROC-кривых представлены результаты разделения 2-х групп: больные МХ (84 человека) в сравнении с контрольной группой (28 человек).

Как видно из представленных кривых (рисунок 12) и таблицы 13, две микроРНК обладают наиболее предсказательной способностью выявления больных МХ, а именно микроРНК-223 ($AUC=0,934$; чувствительность-93%, специфичность-99%) и микроРНК-27b ($AUC=0,870$; чувствительность-86%, специфичность-80%).

Заключая данный раздел работы, позволим себе высказать мнение, что в плазме крови больных на фоне одиночного узла МХ в стадии N_0M_0 возникает увеличение экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-126, микроРНК-146 и микроРНК-155. Но, в плане уточненной диагностики МХ наиболее перспективные микроРНК: микроРНК-223 и микроРНК-27b. Что касается микроРНК-126, микроРНК-146а и микроРНК-155 то, хотя они и характеризуется увеличением

уровня экспрессии, величина их резко отличается от величины экспрессии микроРНК-223 и микроРНК-27b. Именно это позволяет нам, и ограничить их применение в клинической практике.

3.2.2. Размеры меланомы хориоидеи и уровень экспрессии микроРНК в плазме крови больных

По степени проминенции МХ с учетом метрической классификации больные были разделены на три группы: начальные МХ - толщина до 3 мм (16 глаз); средние при толщине от 3,11 до 4,99 мм (13 глаз). Большую группу составили меланомы (55 глаз) толщиной более 5 мм.

Уровень экспрессии исследованных микроРНК в каждой из групп представлен на рисунке 13

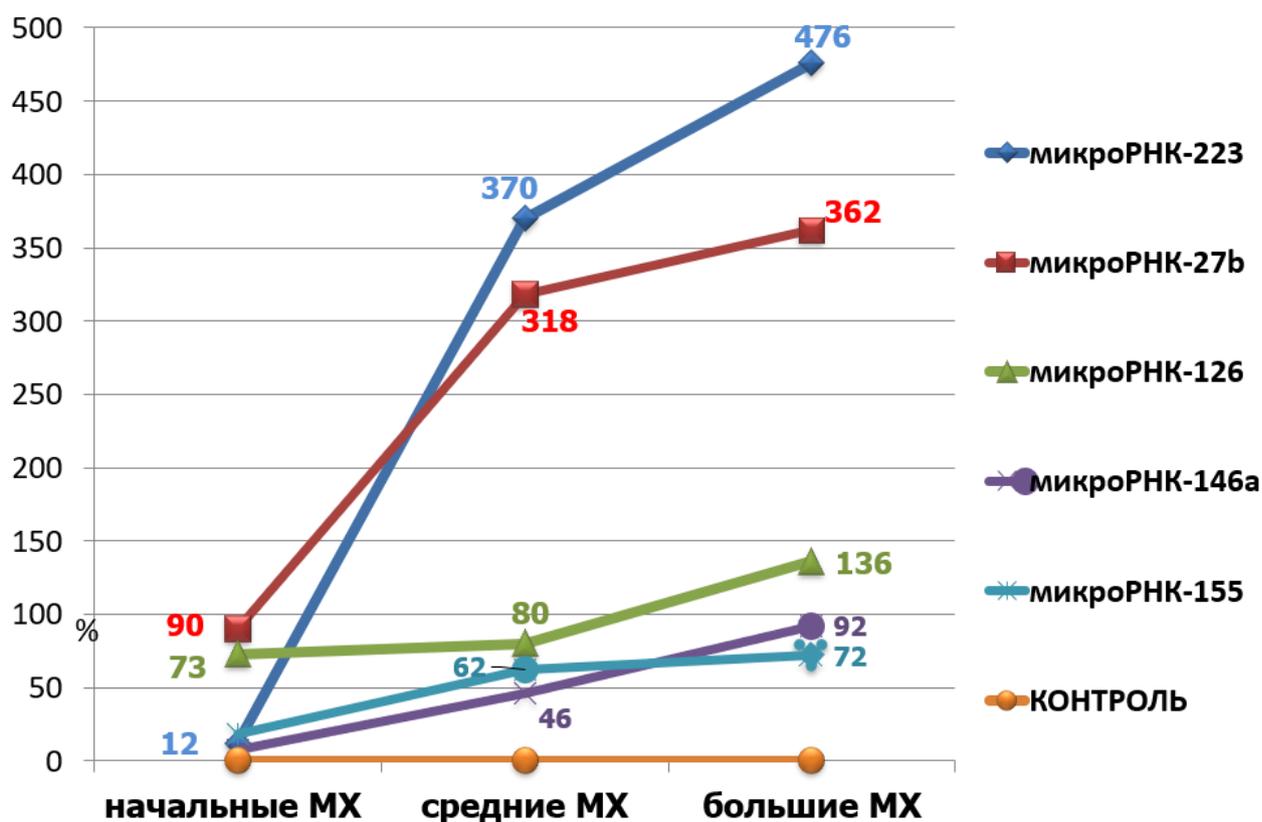


Рисунок 13 Графики распределения уровня экспрессии микроРНК (%) в зависимости от размеров меланомы хориоидеи (сравнение контрольная группа - 100%). Результаты статистически достоверны ($p < 0,05$).

Представленный график экспрессии микроРНК в группах показал разный уровень экспрессии: наименьшим он был в группе начальных МХ (рис.14), максимальным- в группе больших МХ. Разница в уровне экспрессии при начальных и больших меланомах оказалась более выраженной для микроРНК-223, микроРНК-27b и микроРНК-126. При этом микроРНК-27b характеризовалась наибольшим увеличением экспрессии в группе начальных МХ (90%).

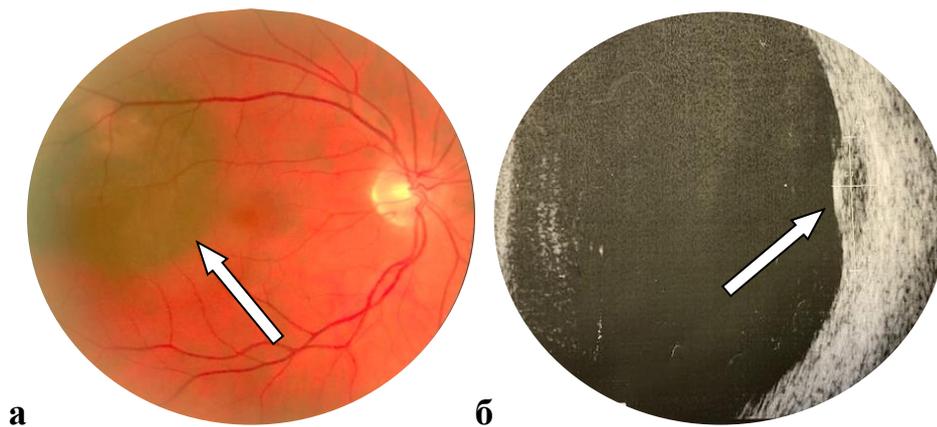


Рисунок 14. Фото глазного дна больного в возрасте 65 лет. Диагноз: начальная меланома хориоидеи. **а.** фото глазного дна (стрелкой обозначена опухоль); **б.** эхограмма того же больного, визуализируется тень опухоли (стрелка) толщиной 1,58 мм.

При средних МХ (рисунок 15) наиболее высокую экспрессию демонстрировали микроРНК-223 (370%) и микроРНК-27b (318%). Примечательным для этих двух микроРНК явился характерный резкий подъем уровня экспрессии в сравнении с начальными МХ.

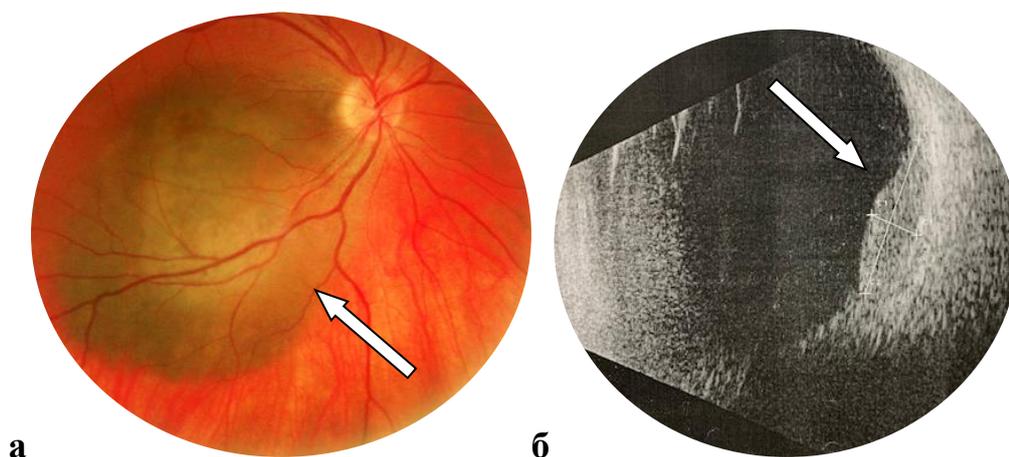


Рисунок 15. Фото глазного дна больного в возрасте 58 лет. Диагноз: средняя меланома хориоидеи. **а.** фото глазного дна, стрелкой обозначена опухоль; **б.** эхограмма того же глаза. Стрелкой обозначена тень опухоли, толщина 4,12мм.

Экспрессия микроРНК в группе начальных и средних МХ приведены в таблице 15.

Таблица 15

Уровень экспрессии микроРНК в плазме крови больных начальной и средней меланомой хориоидеи

микро РНК	Контроль n=28	Начальные МХ h=2,09±0,15мм (0,77 - 2,8) n=16	Сдвиг %	p	Средние МХ h=4,35±0,19 мм (3,11 - 4,99) n=13	Сдвиг %	p
223	0,04998± 0,0345	0,056± 0,003	↑1,12 >12%	p<0,001	0,235± 0,027	↑4,7 >370%	p<0,001
27b	0,000098± 0,000016	0,0000186±0,00 0358	↑1,90 >90%	p=0,007	0,000410± 0,000418	↑4,18 >318%	p=0,017
126	0,148± 0,033	0,256±0,04	↑1,73 >73%	p=0,010	0,266±0,05	↑1,79 >80%	p=0,019
155	0,039± 0,007	0,045± 0,003	↑1,18 >18%	<u>p=0,180</u>	0,063± 0,004	↑1,62 >62%	p=0,019
146a	0,013± 0,005	0,014± 0,005	↑1,08 >8%	<u>p=0,421</u>	0,019± 0,003	↑1,46 >46%	p=0,005

Как следует из таблицы, наименьшие уровни экспрессии в группах начальных и средних меланом имели микроРНК-146а и микроРНК-155, что позволяет оценить их в диагностическом плане, как менее успешные. Позволим себе сделать заключение о нецелесообразности их использования в уточненной диагностике меланом до 5 мм. С целью подтверждения сформулированного заключения, методом ROC-анализа изучили диагностическую значимость микроРНК в двух группах больных МХ (представлено в таблице 16 и на рисунке 16).

Таблица 16

ROC-анализ микроРНК в группах больных начальными (16) и средними (13) МХ.

Микро РНК	Начальная МХ				Средняя МХ			
	AUC	Чувствительность	Специфичность	p	AUC	Чувствительность	Специфичность	p
223	0,929	93	100	p<0,05	0,931	93	100	p<0,05
276	0,748	68	69	p<0,05	0,635	79	62	p<0,05
126	0,734	57	94	p<0,05	0,728	64	85	p<0,05
155	0,623	57	100	<u>p=0,186</u>	0,728	61	84	p<0,05
146а	0,574	39	88	<u>p=0,432</u>	0,769	75	92	p<0,05

Как следует из таблицы, микроРНК-223 представлена активно увеличенной экспрессией как в группе начальных, так и в группе средних МХ; что касается микроРНК-27б и микроРНК-126, то их активность более показательна в группе начальных МХ. МикроРНК-155 и микроРНК-146а начинают активизироваться при опухолях средних размеров.

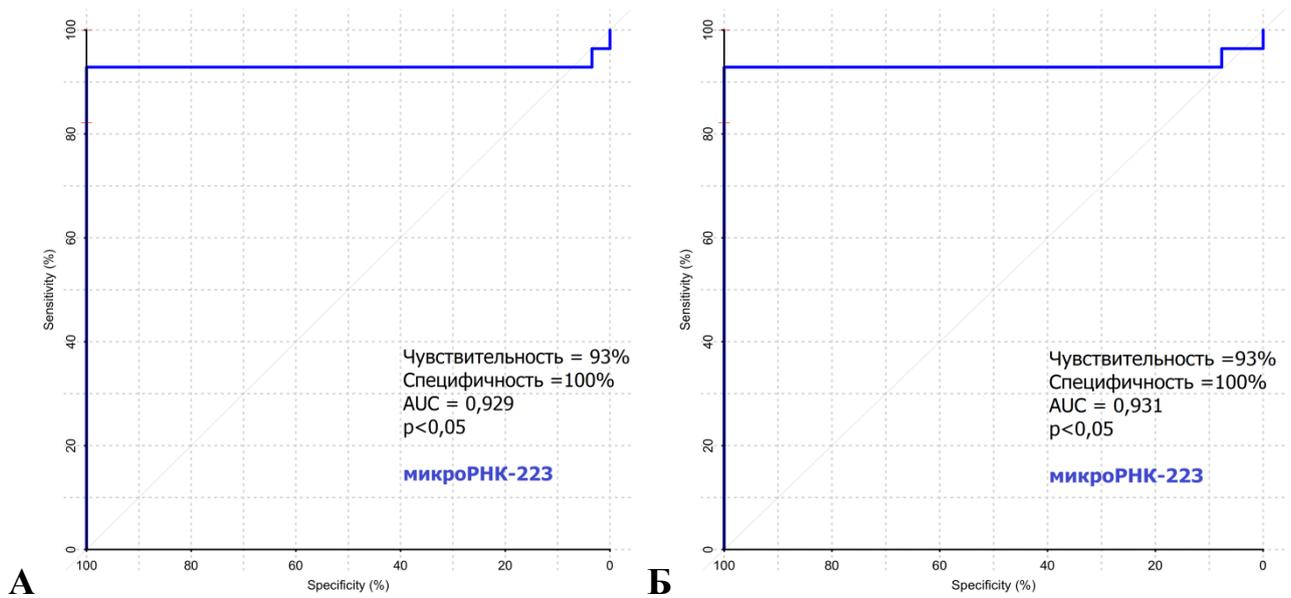


Рисунок 16. ROC-кривые диагностической значимости микроРНК-223: **А.** группа начальных МХ; **Б.** группа средних МХ.

Как показал ROC-анализ в группах начальных и средних МХ, наиболее показательны по результатам экспрессии микроРНК-223 (рисунок 16).

Для больших МХ (рисунок 17), как и для средних, наиболее высокую экспрессию демонстрирует микроРНК-223 (476%), микроРНК-27b (362%) и микроРНК-126 (136%).

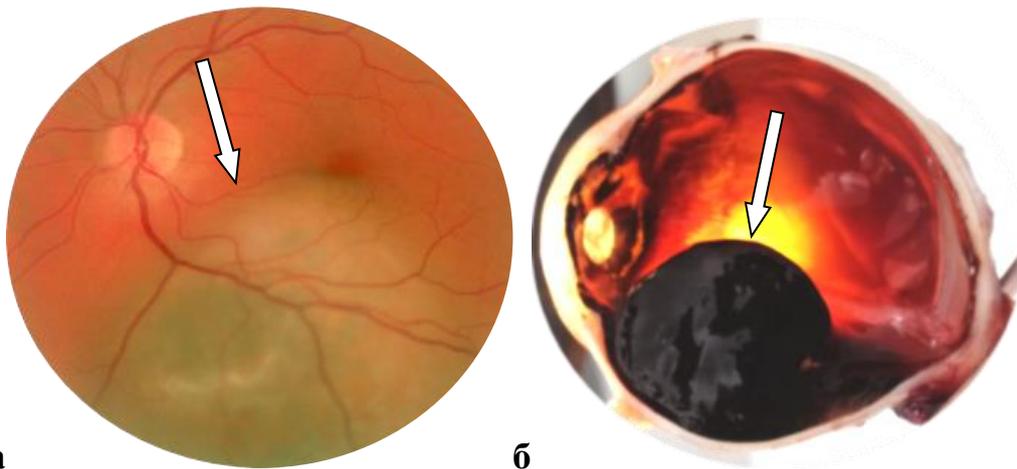


Рисунок 17. **а.** Фото глазного дна больного в возрасте 62 года. Диагноз: большая меланома хориоидеи, стрелкой обозначена опухоль; **б.** тот же глаз: макропрепарат в разрезе (после энуклеации), стрелкой обозначен узел темно-коричневой опухоли толщиной 7,89 мм.

Результаты ROC-анализа представлены в таблице 17.

Таблица 17

ROC-анализ микроРНК: группа больших МХ (55) и контроль (28)

МикроРНК	AUC	Чувствительность %	Специфичность %	p
микроРНК-223	0,936	93	98	p<0,05
микроРНК-27b	0,962	86	96	p<0,05
микроРНК-126	0,818	68	84	p<0,05
микроРНК-155	0,762	79	67	p<0,05
микроРНК-146a	0,721	75	65	p<0,05

Таблица подтверждает высокую чувствительность и специфичность 3-х микроРНК: микроРНК-223, микроРНК-27b и микроРНК-126. Что касается микроРНК-155 и микроРНК-146a, то у них на фоне достаточно высокой чувствительности (79% и 75% соответственно) имеется низкая специфичность, что позволяет расценить эти микроРНК недостаточно информативными при решении диагностических вопросов даже при больших МХ.

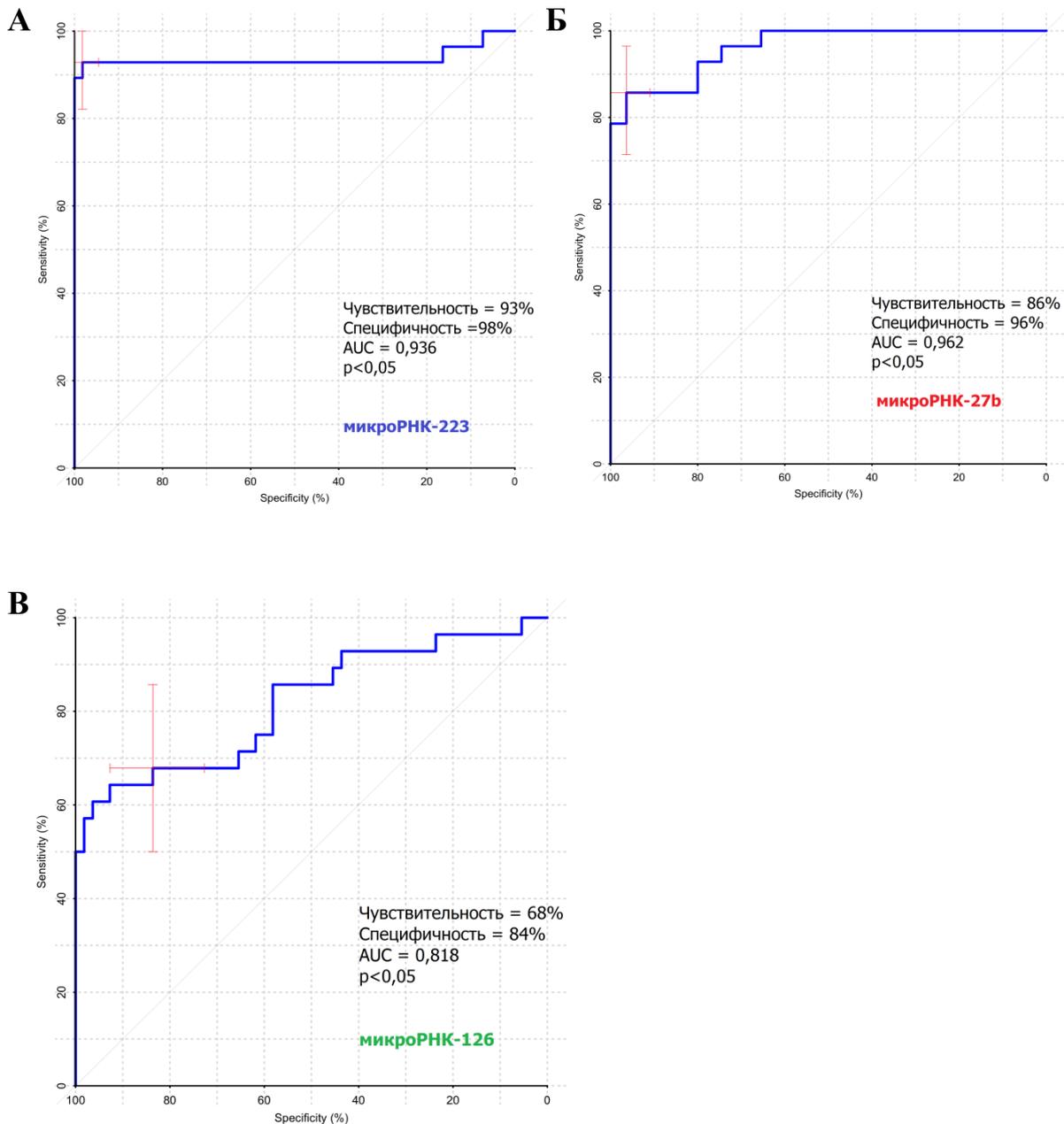


Рисунок 18. ROC-кривые диагностической значимости микроРНК:

А. микроРНК-223; **Б.** микроРНК-27b; **В.** микроРНК-126

Как видно из таблицы и ROC-кривых наиболее предсказательной способностью для выявления больных с большими МХ обладают три микроРНК, а именно микроРНК-27b (AUC=0,962; чувствительность-86%, специфичность-96%), микроРНК-223 (AUC=0,936; чувствительность-93%, специфичность-98%) и микроРНК-126 (AUC=0,818; чувствительность-68%, специфичность-84%),

При анализе уровня экспрессии каждой микроРНК отдельно оказалось, что **микроРНК-223** в плазме крови (рисунок 19) больных *начальной* МХ

характеризуется низким уровнем экспрессии – всего 12%. Но, уже в следующей по величине группе опухолей (средние МХ) уровень экспрессии ее резко возрастает (370%) и увеличивается в 30,8 раза. А разница в уровне экспрессии в группах малых и больших МХ увеличивается практически, в 40 раз. Полученные результаты позволяют высказать предположение, что микроРНК-223 вероятнее всего демонстрирует более выраженную активность меланомы при ее средних и больших размерах.

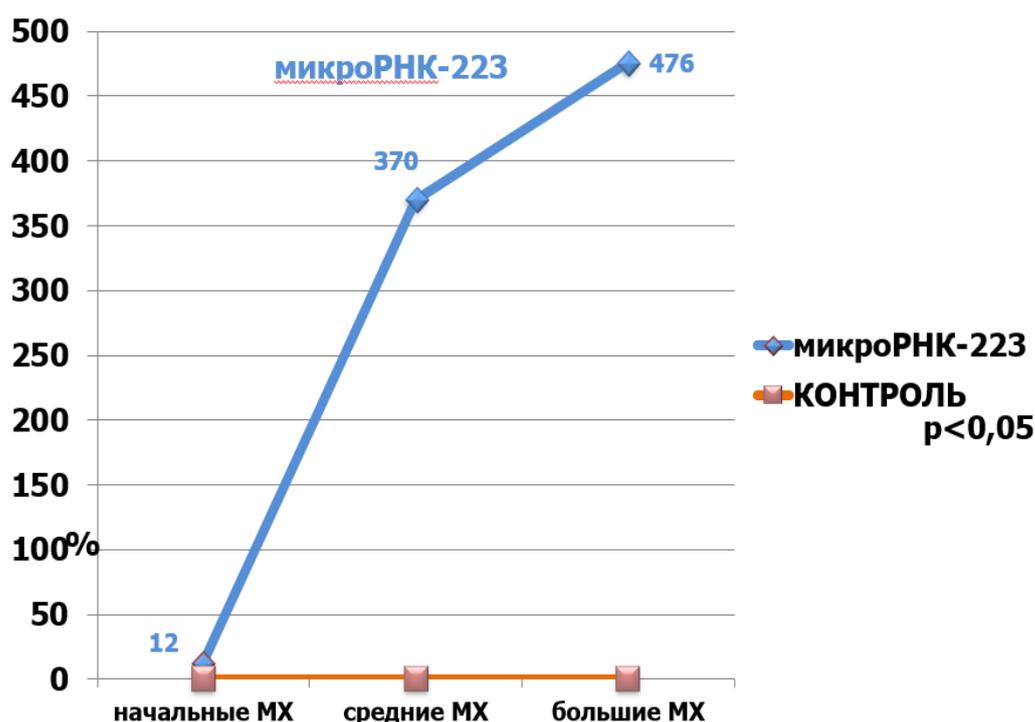


Рисунок 19. Повышение экспрессии микроРНК-223 с учетом размеров опухоли, статистически достоверно ($p < 0,05$).

МикроРНК-27b (рисунок 20) характеризуются наиболее высоким уровнем экспрессии (90%) в плазме крови больных начальными МХ, которая продолжает увеличиваться при средних и больших МХ (рисунок 14).

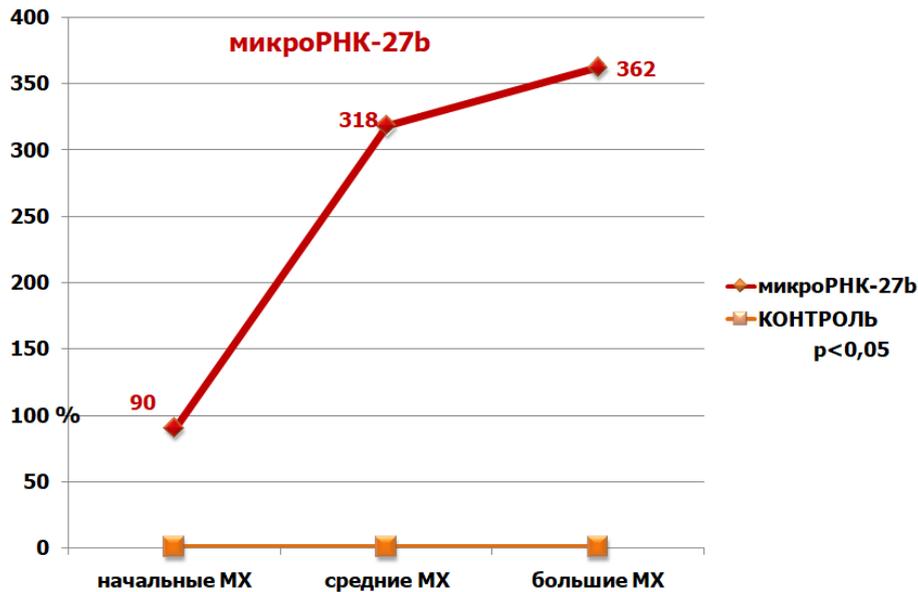


Рисунок 20. График экспрессии микроРНК-27b при разных размерах опухоли. Статистически достоверно ($p < 0,05$).

Таким образом, для микроРНК-27b характерно увеличение экспрессии в плазме крови, начиная с начальных МХ.

МикроРНК-126 также демонстрирует повышение экспрессии в плазме крови больных с начальной меланомой (рис.21), но на 73%. На фоне средних МХ экспрессия остается практически такой же, при больших МХ рост экспрессии увеличивается всего в 1,8 раза. Учитывая участие микроРНК-126 в ангиогенезе опухоли [104], уровни экспрессии в группе начальных и средних МХ, вероятно обусловлены начинающимся процессом опухолевого ангиогенеза, поэтому и достигает максимума в группе больших МХ.

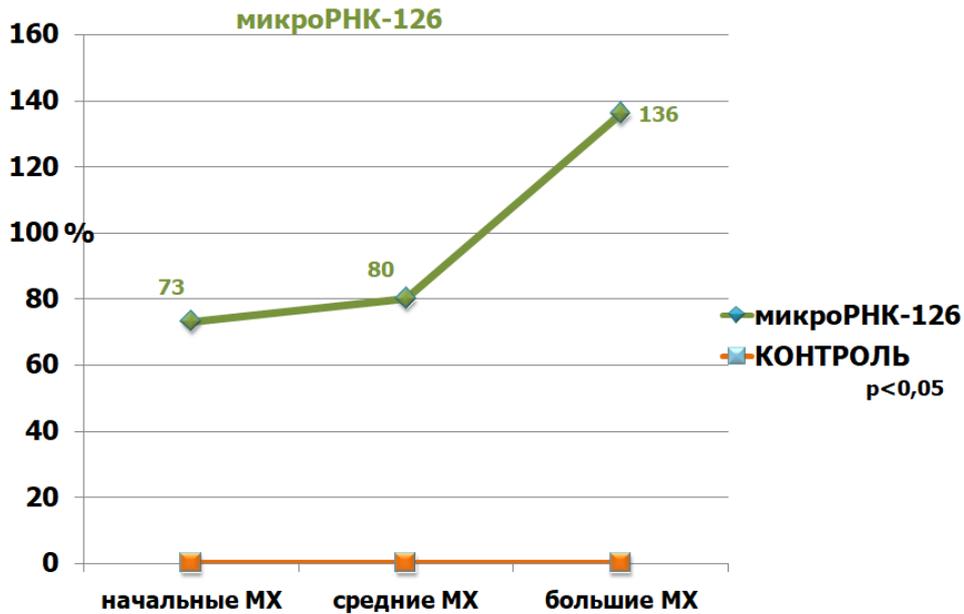


Рисунок 21. График повышения экспрессии микроРНК-126 с учетом размеров меланомы хориоидеи. Статистически достоверно ($p < 0,05$).

МикроРНК-146а в плазме крови больных начальной МХ (рисунок 22) имели незначительное превышение экспрессии (8%), но это оказалось статистически недостоверным ($p > 0,05$). При больших опухолях этот показатель также имеет некоторую тенденцию к увеличению (в 11,5 раза). Положительные результаты исследования по микроРНК-146а, опубликованные ранее в литературе [20], скорее всего, обусловлены большими размерами меланом в наблюдаемых случаях, да и подтверждались они заключением «увеличение экспрессии» без количественного контроля.

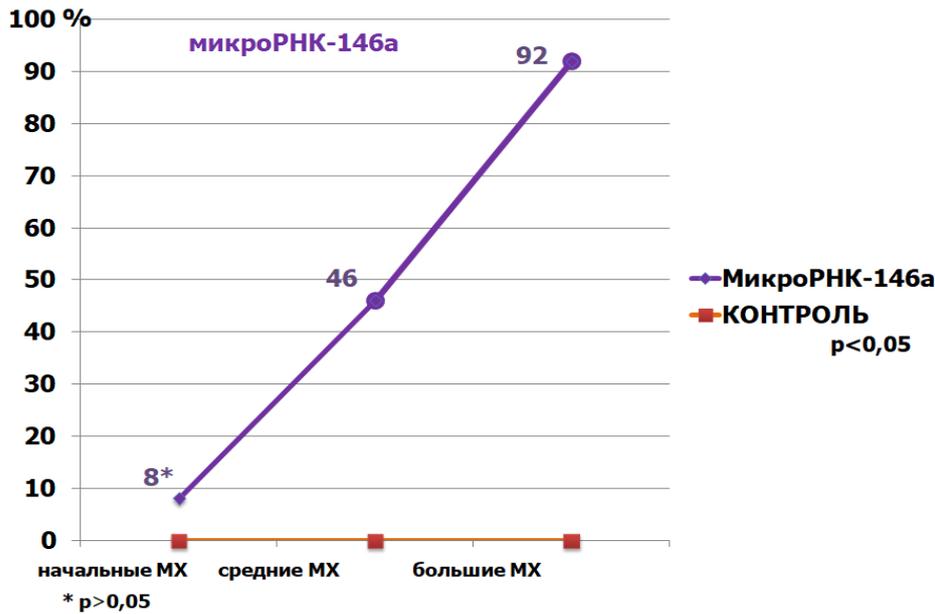


Рисунок 22. График повышения экспрессии микроРНК-146а с учетом размеров опухоли. Статистически достоверно ($p < 0,05$), * $-p > 0,05$.

МикроРНК-155 в плазме крови больных начальной МХ характеризовалась статистически недостоверным результатом, а в группе средних и больших МХ разница показателей экспрессии оказалась незначительной (рис. 23)

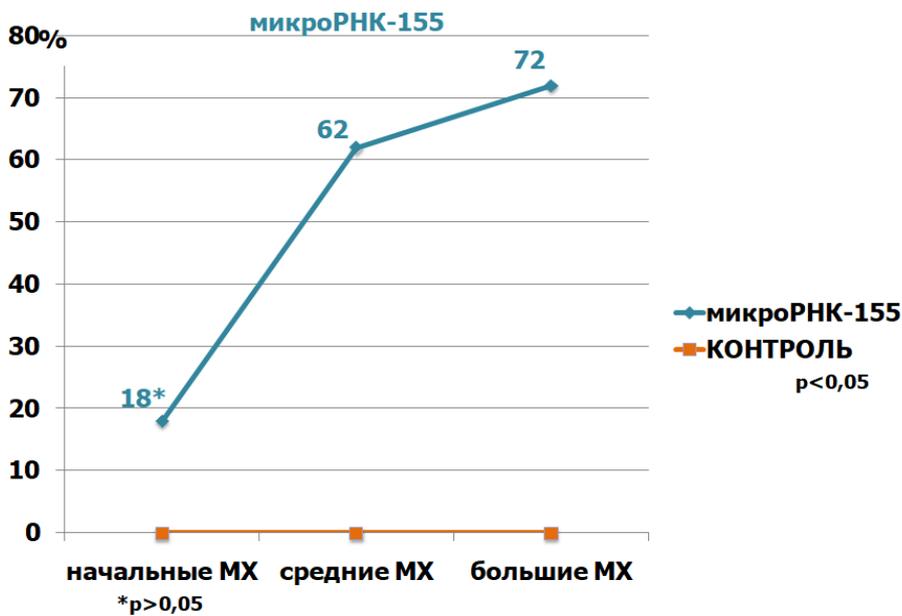


Рисунок 22. График повышения экспрессии микроРНК-155 с учетом размеров опухоли. Статистически достоверно ($p < 0,05$), *недостоверно- $p > 0,05$.

Суммируя изложенное, позволим себе заключить, что несмотря на то, что все исследованные микроРНК хотя и имели тенденцию к повышению уровня своей экспрессии по мере увеличения размеров опухоли, все же наиболее активными оказались микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-126. Полученные результаты подтверждены оценкой уровня экспрессии микроРНК в группе больших опухолей, имеющих проминенцию от 5,03 мм до 17,19 мм (таблица 18).

Таблица 18

Уровень экспрессии микроРНК в плазме крови в группе больших МХ с учетом размера опухоли (55 больных)

микроРНК	n=28 Контроль	h> 5 до 7 мм n=16		h>7 до 10 мм n=17		h>10 мм n=22	
		h=6,02±0,17 (5,03 –6,92)	Сдвиг %	h=8,5±0,25 (7,07 - 10)	Сдвиг %	h=12,5±0,4 (10,41 – 17,19)	Сдвиг %
223	0,04998 ±0,034 5	0,243±0,053	↑4,86 > 386% p<0,001	0,262± 0,059	↑5,24 > 424% p<0,001	0,341± 0,049	↑6,82 > 582% p<0,001
27b	0,00009 8±0,00 0016	0,000428± 0,0000445	↑4,37 > 337% p<0,001	0,000442± 0,0000412	↑4,51 > 351% p<0,001	0,00048± 0,0000579	↑4,90 > 390% p<0,001
126	0,148± 0,033	0,270±0,01	↑1,82 > 82% p<0,001	0,339± 0,041	↑2,29 > 129% p<0,001	0,413± 0,058	↑2,79 > 179% p<0,001
155	0,039± 0,007	0,065±0,004	↑1,67 > 67% p=0,013	0,067± 0,003	↑1,72 > 72% p=0,003	0,069± 0,003	↑1,77 > 77% p=0,001
146a	0,013± 0,005	0,021± 0,005	↑1,62 > 62% p=0,017	0,024± 0,008	↑1,85 > 85% p=0,015	0,029± 0,005	↑2,23 > 123% p<0,001

Как видно из представленной таблицы, при разделении группы больших МХ на три подгруппы сохраняется тоже соотношение – постепенное увеличение уровня

экспрессии микроРНК по мере увеличения толщины опухоли и экспрессия достигает максимума при меланоме толщиной более 10 мм (таблица 19).

Таблица 19

Увеличение экспрессии микроРНК в плазме крови с учетом проминенции меланомы хориоидеи

проминенция МХ мм (средние показатели)	n	Увеличение экспрессии микроРНК в % (сравнение с контролем)				
		223	27b	126	146a	155
0,77 - 2,8 (2,09±0,15)	16	12	90	73	8*	18*
3,11 - 4,99 (4,35±0,19)	13	370	318	80	46	62
5,03 - 6,92 (6,02±0,17)	16	386	337	82	62	67
7,07 - 10 (8,5±0,25)	17	424	351	129	85	72
10,41 - 17,19 (12,5±0,4)	22	582	390	179	123	77
		>48,5	>4,3	>2,5	>15,4	>4,3

* - статистически недостоверные результаты $p=0,421$, $p=0,180$ (соответственно).

Остальные данные статистически достоверные.

Несмотря на недостоверные результаты по микро-146a и микроРНК-155, есть основание высказать мнение о меньшем увеличении всех микроРНК в группе начальных МХ (исключение микроРНК-27b и микроРНК-126) и постепенном увеличении их активности по мере увеличения опухоли на каждые 2 мм. Оказалось, что по сравнению с начальными меланомами проминенцией до 2,2 мм, при больших опухолях активность микроРНК по уровню экспрессии их в плазме крови нарастает от 2,5 (микроРНК-126) до 48,5 раз (микроРНК-223). МикроРНК-27b, микроРНК-155 имеют аналогичный разрыв соответственно в 4,3 раза и микроРНК-146a - в 15,4 раза.

Резюмируя изложенное, позволим себе заключить: рост меланомы хориоидеи четко сопровождается количественным увеличением активности исследованных микроРНК, что, с учетом данных литературы, позволяет судить об увеличении агрессивности меланомы хориоидеи с увеличением ее размеров.

3.2.3. Особенности распределения микроРНК с учетом локализации опухоли в сосудистой оболочке глаза

Многолетними клиническими наблюдениями доказано, что локализация МХ влияет на витальный прогноз [113]. Преэкваториальная локализация меланомы (рисунок 24) приводит к более раннему появлению гематогенного метастазирования и, особенно, при распространении опухоли на цилиарное тело [6, 95]. Что касается опухолей хориоидеи, то, по мнению авторов, их расположение в постэкваториальной зоне не оказывает подобного влияния.

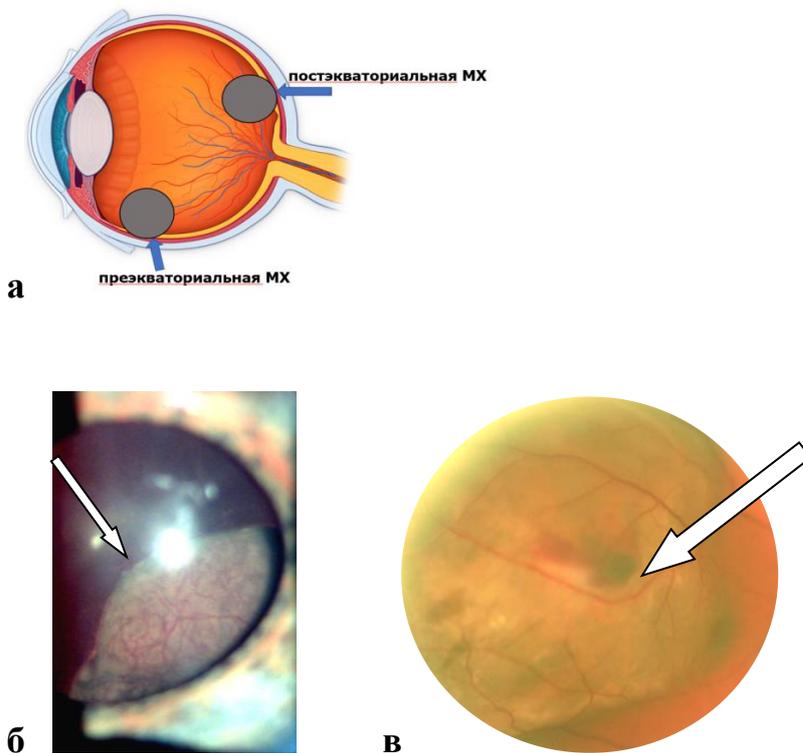


Рисунок 24. **а.** Схематическое изображение локализации внутриглазной меланомы; **б.** фото переднего отдела глаза в свете биомикроскопии- на фоне мидриаза в просвете зрачка хорошо просматривается узел слабопигментированной

МХ (стрелка) преэкваториальной локализации; **в.** фото глазного дна больного МХ, стрелкой обозначен узел постэкваториальной МХ.

С учетом локализации опухоли все больные (84 человека) были разделены на две группы: преэкваториальное расположение МХ (9 человек) и постэкваториальное (75 человек).

Характер экспрессии микроРНК и ее уровень представлены в таблице 20.

Таблица 20

Характер и уровень экспрессии микроРНК в плазме крови 84 больных меланомой хориоидеи с учетом локализации

Микро РНК	Контроль <i>n</i> =28	Постэкваториально <i>n</i> =75	Сдвиг- %	Преэкваториально <i>n</i> =9	Сдвиг- %	разница
223	0,04998± 0,0345	0,218339±0,021	↑4,36 > 336 p<0,01	0,380153± 0,1076	↑7,60 > 660 p<0,01	> 324
27b	0,000098 ± 0,000016	0,000377± 0,000038	↑3,84 > 284 p<0,01	0,000549± 0,0000967	↑5,60 > 460 <0,01	> 176
126	0,148± 0,033	0,300498± 0,019	↑2,03 > 103 p<0,01	0,467± 0,117	↑3,16 > 216 p=0,0007	> 113
146	0,013± 0,005	0,021± 0,003	↑1,61 > 61 p=0,166	0,032±0,0094	↑2,46 > 146 p=0,07	> 85
155	0,039± 0,007	0,062± 0,002	↑1,59 > 59 p<0,01	0,0721±0,004	↑1,84 > 84% p=0,012	> 25

Как следует из таблицы, все микроРНК характеризуются повышенной экспрессией, но степень активности их различается. Рисунок 25 иллюстрирует характер и последовательность этого повышения.

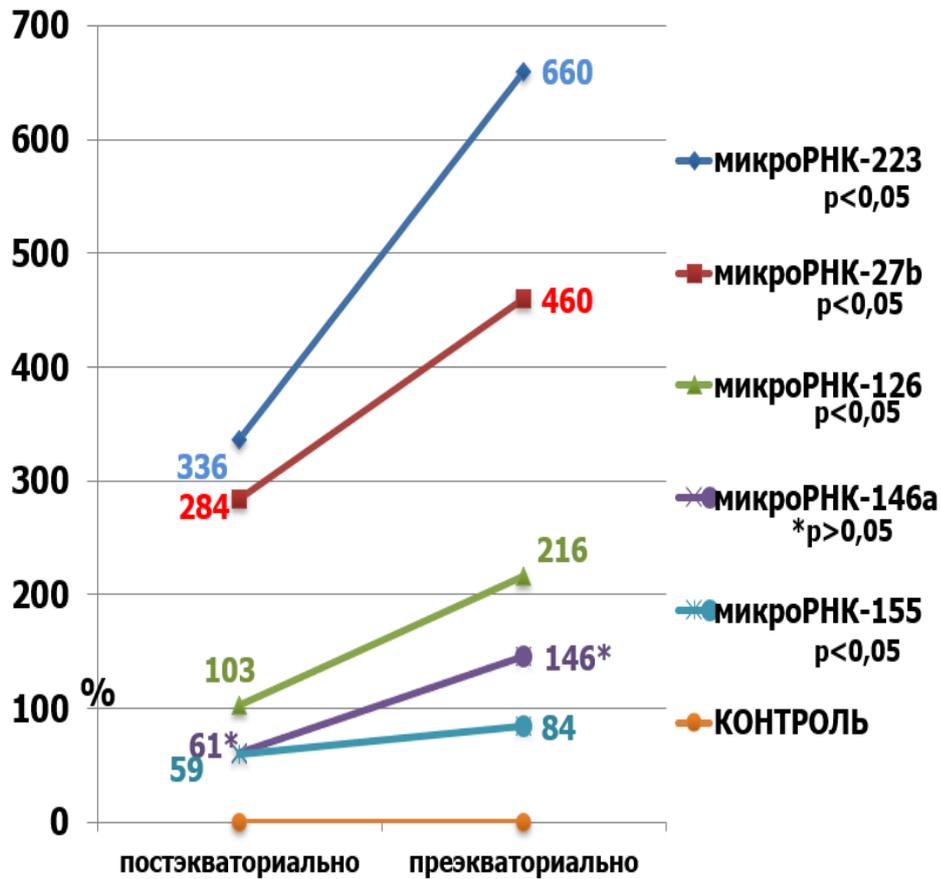


Рисунок 25. График повышения экспрессии микроРНК с учетом локализации опухоли. Статистически достоверно ($p < 0,05$), *недостоверные - $p > 0,05$.

Оказалось, что в группе больных преэкваториальной локализации также наиболее активны онкогенные микроРНК (микроРНК-223 и микроРНК-27b). Экспрессия микроРНК-223 в глазах с преэкваториальной локализацией увеличивалась практически в 2 раза, а микроРНК-27b – в 1,64 раза. Что касается микроРНК-126 и микроРНК-146a, относящихся к группе проангиогенных микроРНК, то они при такой локализации также характеризовались увеличением своей экспрессии в 2 – 2,4 раза. Практически не менялся уровень экспрессии микроРНК-155, которая как известно, относится к группе провоспалительных микроРНК. Таким образом, микроРНК, определяющие характер онкогенеза (микроРНК-223, микроРНК-27b) у больных преэкваториально расположенной меланомой демонстрируют свою большую активность в пролиферации опухолевых

клеток. Увеличение любой злокачественной опухоли возможно только при формировании собственной сосудистой сети, что подтверждает высокий уровень экспрессии микроРНК-126, микроРНК-146а.

С целью подтверждения сформулированных выше позиций мы провели контрольный статистический - ROC-анализ. Результаты представлены в таблице 21.

Таблица 21

ROC-анализ микроРНК: в двух группах (постэкваториальная МХ-75 и преэкваториальная МХ-9) и контроль (28)

Микро РНК	постэкваториальная МХ				преэкваториальная МХ			
	AUC	Чувствительность	Специфичность	p	AUC	Чувствительность	Специфичность	p
223	0,932	93	99	p<0,05	0,948	93	100	p<0,05
27b	0,859	79	84	p<0,05	0,964	86	100	p<0,05
126	0,784	64	89	p<0,05	0,817	61	100	p<0,05
155	0,720	57	100	p<0,05	0,810	79	88	p<0,05
146a	0,689	75	60	<u>p=0,232</u>	0,794	75	88	p<0,05

А рисунок 26 иллюстрирует полученные результаты.

постэкваториальная МХ

преэкваториальная МХ

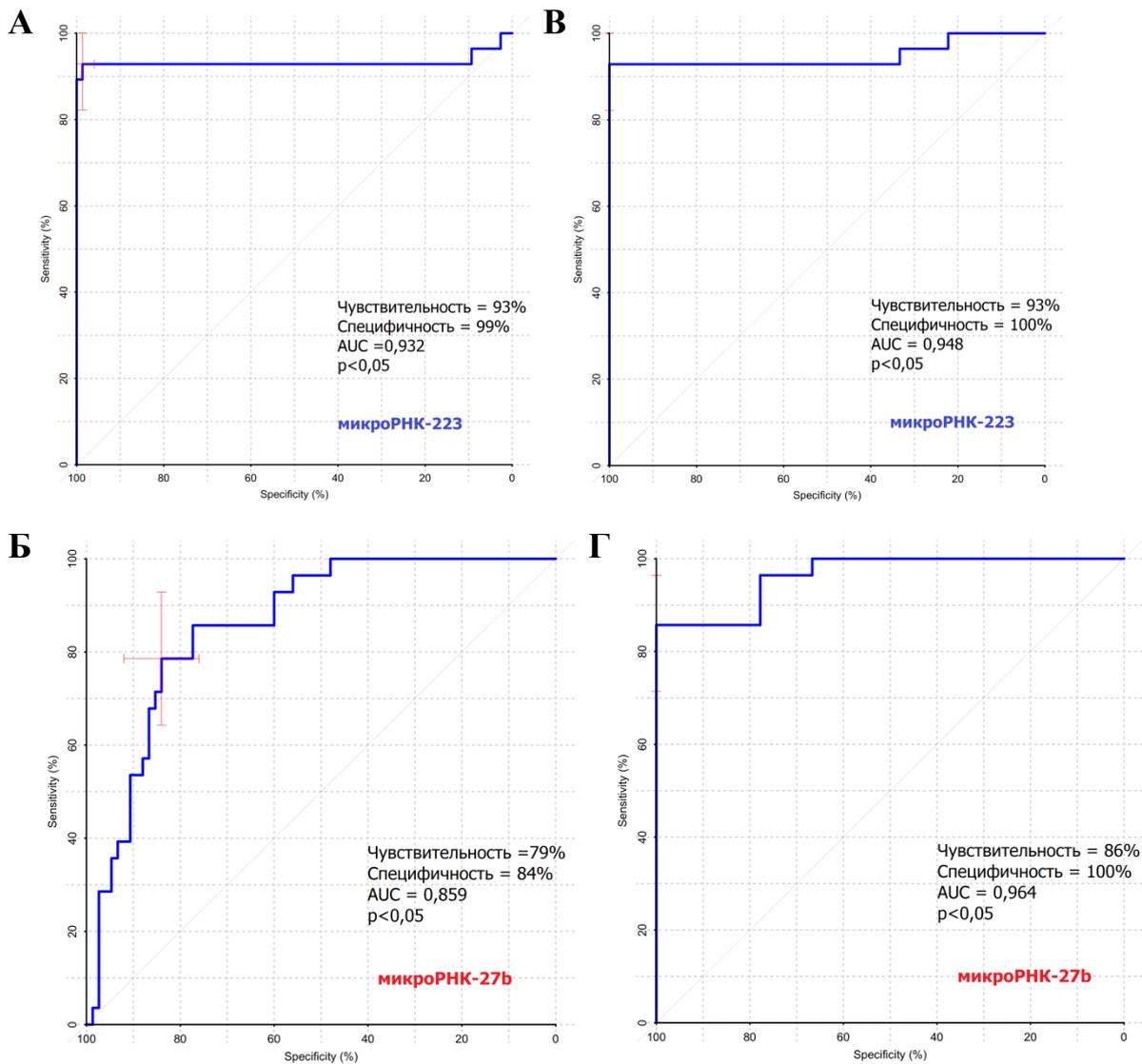


Рисунок 26. ROC-кривые диагностической значимости микроРНК с учетом локализации МХ: постэкваториально **А.** микроРНК-223; **Б.** микроРНК-27b; преэкваториально **В.** микроРНК-223; **Г.** микроРНК-27b.

Представленный ROC-анализ подтверждает превалирование увеличения экспрессии микроРНК-223 и микроРНК-27b в плазме крови больных МХ преэкваториальной локализации, что подтверждает неблагоприятный витальный прогноз (высокий риск гематогенного метастазирования).

3.2.4. Изменения уровня микроРНК в плазме крови больных меланомой хориоидеи с учетом морфологической характеристики опухоли.

Энуклеация выполнена 55 больным с большими МХ. Известно, что меланома хориоидеи представлена 2 основными клеточными группами опухолей: веретеноклеточным (63%) и эпителиодноклеточным (редкий тип – 5%). В группе смешанных могут превалировать как эпителиодные клетки, так и веретенообразные клетки [113, 116]. По данным отечественной литературы в России доминируют опухоли, имеющие смешанный клеточный состав с преобладанием веретеновидных клеток [16], что имело место и в нашей группе больных. Патоморфологически диагностирована веретеноклеточная меланома (45 глаз), меланома смешанного типа с преобладанием веретенообразных клеток (6 глаз) и эпителиодноклеточная меланома (4 глаза). Клеточный тип строения меланомы представлен на рисунке 27.

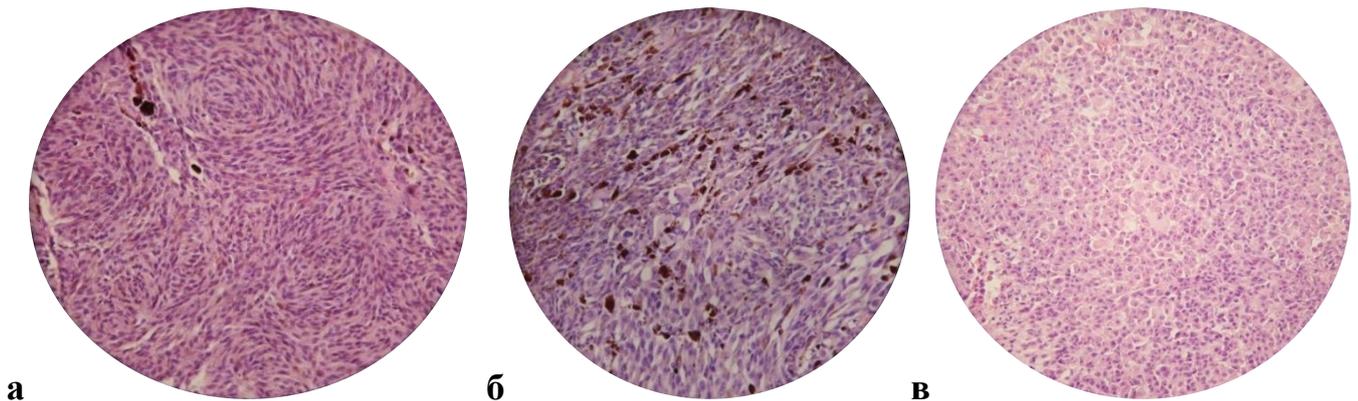


Рисунок 27. Микропрепарат – хориоидальная меланома, окраска гематоксилин-эозин, увеличение x 400: **а.** -веретеноклеточная меланома; **б.** -смешанно-клеточная меланома; **г.** - эпителиодноклеточная меланома.

Поскольку во всех 6 глазах со смешанной МХ преобладал веретеноклеточный тип опухоли, мы объединили их с группой веретеноклеточной меланомы (51 глаз). И все расчеты по уровню и характеристике экспрессии всех микроРНК в плазме крови проводили по двум группам: группа больных с веретеноклеточными меланомами и группа больных эпителиодноклеточной меланомой. В таблице 22 представлена количественная характеристика уровня экспрессии микроРНК в процентах.

Уровень экспрессии микроРНК в плазме крови 55 больных
меланомой хориоидеисучетом клеточного строения меланомы

МикроРНК	Контроль <i>n=28</i>	Веретеночклеточная <i>n=51</i>	Сдвиг- %	Эпителиоидноклеточная <i>n=4</i>	Сдвиг- %
223	0,04998± 0,0345	0,284±0,03	↑5,68 >468% P<0,00 1	0,342±0,191	↑6,84 >584% P=0,002
27b	0,000098 ± 0,000016	0,000447±0,00003	↑4,56 >356% P<0,00 1	0,000536±0,000154	↑5,47 >447% P<0,001
126	0,148± 0,033	0,346±0,03	↑2,34 >134% P<0,00 1	0,3794±0,1931	↑2,56 >156% P=0,094
146	0,013± 0,005	0,025±0,004	↑1,92 >92% P=0,00 1	0,030±0,020	↑2,31 >131% P=0,033
155	0,039± 0,007	0,067±0,002	↑1,72 >72% P<0,00 1	0,070±0,003	↑1,79 >79% P=0,047

Рисунок 28 графически иллюстрирует характер экспрессии всех микроРНК.

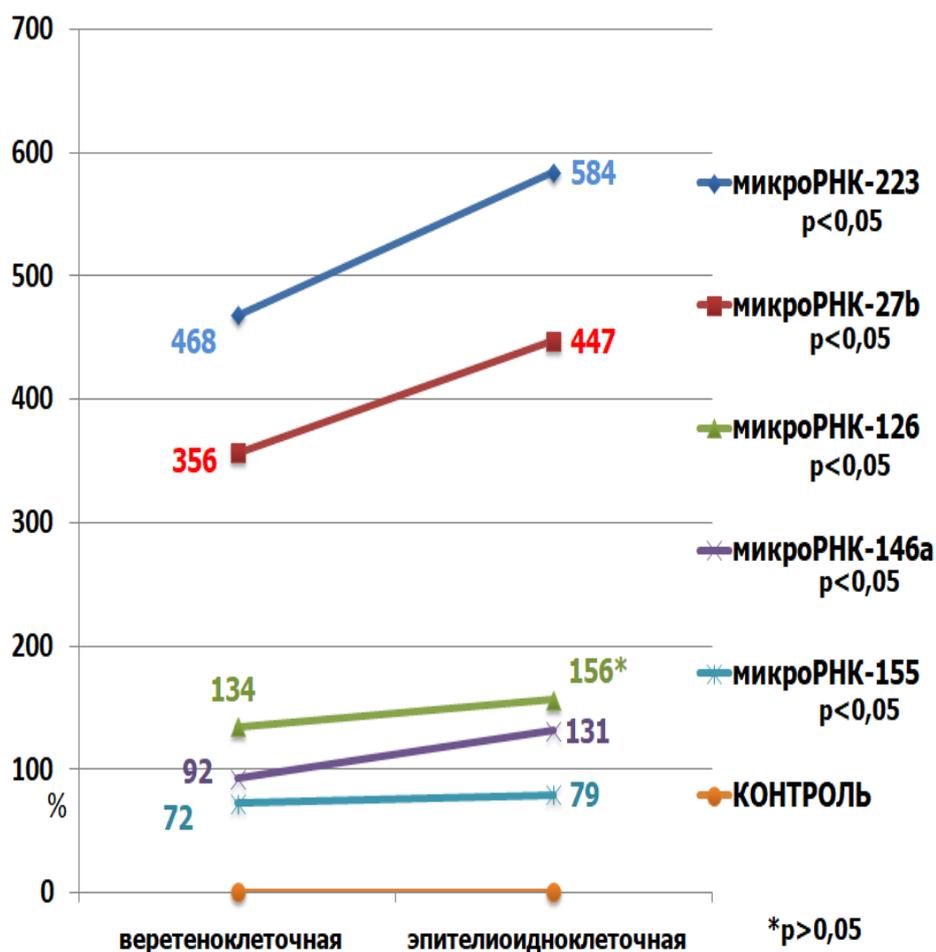


Рисунок 28. График уровня экспрессии микроРНК в плазме крови больных меланомой хориоидеи с учетом морфологической характеристики опухоли. Статистически достоверно, * ($p > 0,05$) недостоверные результаты.

Представленный график (рис.28) четко демонстрирует увеличение экспрессии всех используемых микроРНК (146а, 155, 126, 27b, 223) в обеих группах и несколько большее увеличение экспрессии у больных эпителиоидно-клеточной МХ. Процент этот варьирует от 7% до 116%, но оказалось, что уровень экспрессии микроРНК-223 при эпителиоидноклеточных меланоммах превышает таковой у больных веретеноклеточной меланомой в 1,2 раза, аналогичный показатель получен при исследовании микроРНК-126, микроРНК-27b - в 1,3 раза, а микроРНК-146 и микроРНК-155 соответственно в 1,5 и 1,1 раза. В обеих группах результаты статистически достоверны (исключение микроРНК-126). Диагностическая значимость полученных данных различий в уровнях экспрессии

микроРНК с учетом клеточного состава меланомы подтверждена ROC-анализом (таблица 23 и рисунок 29)

Таблица 23

ROC-анализ микроРНК: группа веретенноклеточных МХ-51 и
эпителиоидноклеточных МХ-51

Микро РНК	веретенноклеточная МХ				эпителиоидноклеточная МХ			
	AUC	Чувствительность	Специфичность	p	AUC	Чувствительность	Специфичность	p
223	0,936	93	98	p<0,05	0,946	93	100	p<0,05
27b	0,959	86	96	p<0,05	0,991	96	100	p<0,05
126	0,821	68	86	p<0,05	0,768	61	100	p<0,05
155	0,758	61	88	p<0,05	0,813	79	100	p<0,05
146a	0,726	75	67	p<0,05	0,652	89	50	p<0,05

веретенноклеточная МХ

эпителиоидноклеточная МХ

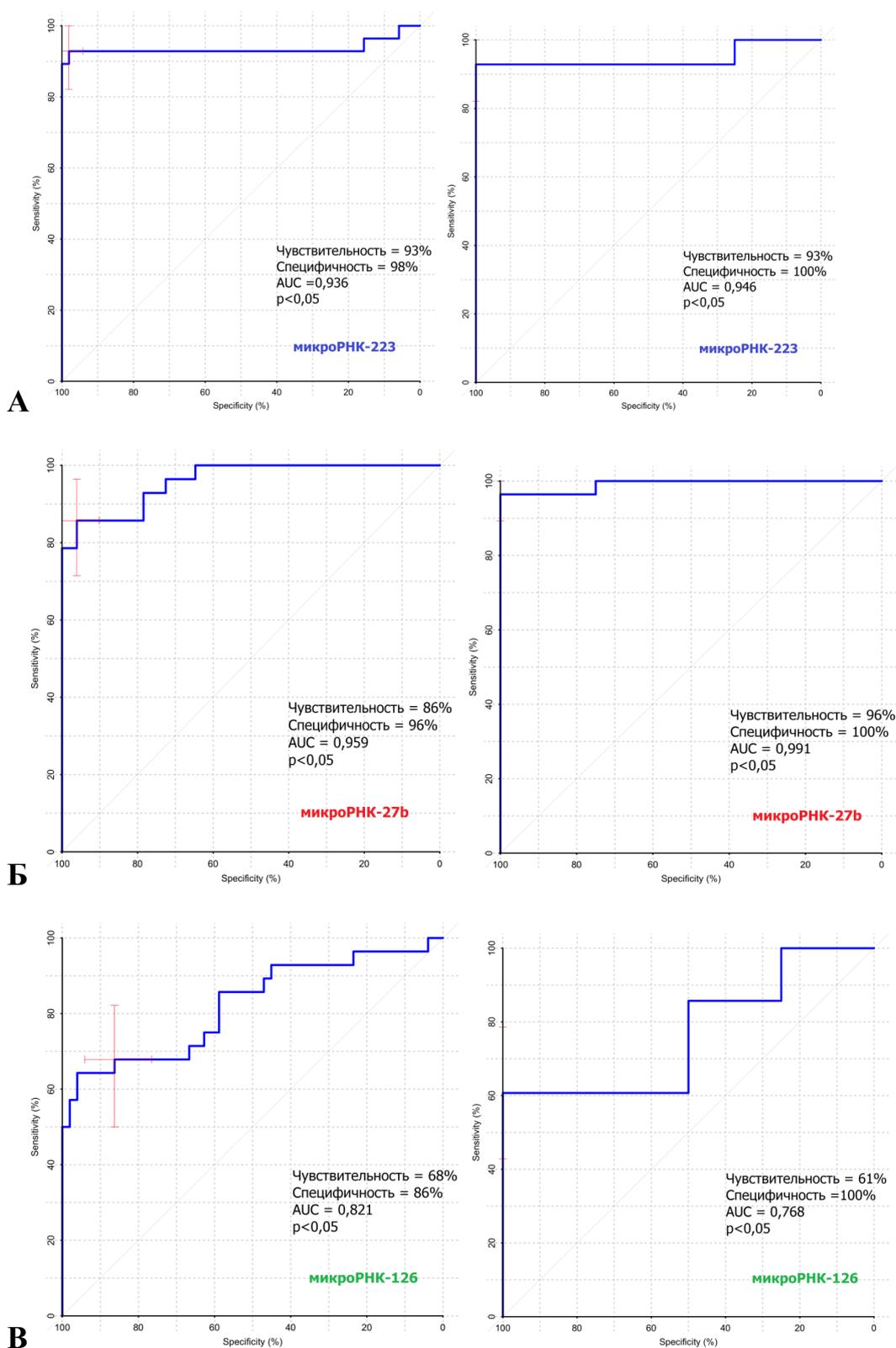


Рисунок 29. ROC-кривые диагностической значимости микроРНК с учетом морфологического типа меланомы: **А.** микроРНК-223, **Б.** микроРНК-27b, **В.** микроРНК-126.

Представленная таблица и кривые демонстрируют наиболее активные диагностические маркеры: при веретеночклеточной МХ: микроРНК-223 (AUC=0,936; чувствительность -93%, специфичность-98%), микроРНК-27b (AUC=0,956; чувствительность -86%, специфичность-96%), при эпителиоидноклеточной МХ: микроРНК-223 (AUC=0,946; чувствительность -93%, специфичность-100%), микроРНК-27b (AUC=0,991; чувствительность -96%, специфичность-100%). Таким образом, ROC-анализ подтвердил высокую чувствительность и специфичность для микроРНК-223 и микроРНК-27b в большей степени для больных эпителиоидноклеточным вариантом меланомы.

Однако приведенные выше результаты исследования, показавшие повышение уровня экспрессии микроРНК по мере увеличения размеров опухоли позволяют высказать мнение о большем влиянии ее размеров на агрессивное течение опухоли. В литературе существует мнение, что эпителиоидный тип наиболее неблагоприятный в плане метастазирования. Больных с подтвержденным эпителиоидноклеточным типом меланомы в нашем исследовании всего 4 человека. Хотя полученные результаты статистически достоверны, все же количественная разница эпителиоидноклеточных и веретеночклеточных значительная.

И тем не менее, остается важным вывод – меланома чрезвычайно злокачественная опухоль, агрессивность онкогенеза которой иллюстрирует увеличение уровня микроРНК, как и при любой другой злокачественной опухоли [114].

Заключение

Частота меланомы хориоидеи – одной из самых злокачественных опухолей человека составляет 10 - 12 человек на 1 миллион взрослого населения [2, 3]. Существуют сложности дифференциальной диагностики начальной меланомы хориоидеи (толщиной до 3 мм) с другими заболеваниями ретинохориоидальной зоны. Имеющиеся методы исследования, такие как: биомикр офтальмоскопия, ультразвуковое исследование и оптическая когерентная томография не всегда позволяют уточнить или исключить диагноз меланомы. В практике офтальмолога известно правило динамического наблюдения за такими больными каждые 3 месяца, и это при том, что растет меланома хориоидеи со скоростью примерно 1мм в год [114]. Метастазирует гематогенным путем, таргетный орган -печень (92-93%) [47, 116].

Мировая практика свидетельствует о наличии клинических факторов риска (старший возраст пациента, большие размеры и прэквадориальная локализация опухоли). Из морфологических характеристик наиболее злокачественной является эпителиоидноклеточная меланома, доля которой составляет всего 5%. Сложилось мнение, что наличие двух любых факторов и более можно расценивать как свидетельство наличия скрытых гематогенных метастазов [114].

Визуализирующие методы исследования (МРТ, КТ, ПЭТ) позволяют выявлять локальный метастаз в печени минимальным диаметром до 5 мм [12, 30, 100, 111].

С целью ранней диагностики возможных ранних метастазов в литературе рассматривались возможности поиска опухолевых клеток в периферической крови [25, 33, 118], характер изменения печеночных ферментов [49, 55], генетические изменения, такие как повреждение 3 хромосомы, изменения уровня GNAQ или GNA11 [14, 18, 99, 129].

Начиная с 2008 года, начали изучать уровень микроРНК, как в ткани самой увеальной меланомы, так и в ее метастатических узлах [135]. В 2012 году в зарубежной литературе появилась первая работа о возможности определения

характера экспрессии микроРНК в плазме крови. На сентябрь 2022 года опубликовано 9 работ, изучен характер изменения более 100 микроРНК. Доказана позитивная роль 12 микроРНК в уточненной диагностике увеальной меланомы (микроРНК-16; микроРНК-20а; микроРНК-92b; микроРНК-106а; микроРНК-125b; микроРНК-126; микроРНК-146а; микроРНК-155; микроРНК-181а; микроРНК-199а; микроРНК-199а-5p и микроРНК-223). Все исследования проводили у больных большими МХ (проминенция более 5 мм), у которых после удаления глаза развились метастазы в печень в сроки от 6 до 24 месяцев. Одним из недостатков имеющихся публикаций можно отметить слишком широкое использование термина УМ. Отсутствие деления меланомы по топографическому признаку (радужка, цилиарное тело и, собственно, хориоидея) не оправдано, т.к. опухоли этих локализаций представлены разным клеточным составом (меланома радужки - чаще состоит из веретенообразных клеток, меланома цилиарного тела - чаще имеет эпителиоидноклеточное строение, а в МХ превалирует веретенклеточные и смешанные формы). Количество наблюдений УМ в опубликованных работах невелико (минимальное количество пациентов - 6, максимальное - 21), выделить больных МХ с учетом особенностей локализации и размеров опухоли не представляется возможным. А этот вопрос является принципиальным, т.к. основной причиной гематогенного метастазирования и смерти являются именно большие МХ.

Ознакомившись с литературой, мы поставили перед собой задачу проверить уровень 5 микроРНК, 4 из которых (микроРНК-146а, микроРНК-155, микроРНК-223, микроРНК-126) были апробированы за рубежом. МикроРНК-27b как диагностический маркер МХ, использована нами впервые. Условиями проведения исследования были локальный узел опухоли с определением его точных размеров, инструментально (КТ или МРТ) доказанным отсутствием метастазов в печени и других органах (T₁₋₃N₀M₀). В процессе исследования доказано увеличение уровня экспрессии в плазме крови больных МХ всех перечисленных микроРНК, однако наиболее информативными (увеличение экспрессии до 300-372%) оказались

микроРНК-27b и микроРНК-223. МикроРНК-155, микроРНК-146a и микроРНК-126 увеличивали свою экспрессию от 62 до 115%.

Поскольку в литературе отсутствуют сведения о влиянии размеров опухоли на уровень экспрессии микроРНК, нами проведено исследование уровня микроРНК в группах меланомы с учетом ее размеров: начальная МХ (толщина от 0,77 до 3 мм), средняя МХ (более 3 мм до 5 мм) и большая МХ (более 5 мм до 17 мм). Доказано последовательное увеличение уровня экспрессии всех микроРНК по мере увеличения проминенции меланомы. Но, наиболее показательными (увеличение более 100%) при больших МХ оказались микроРНК-126, микроРНК-27b и микроРНК-223 (соответственно процент увеличения 136, 362, 476). Таким образом, доказана роль размеров опухоли на уровень экспрессии исследованных микроРНК.

Анализ уровня экспрессии всех отобранных нами микроРНК с учетом локализации меланомы подтвердил увеличение уровня экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-126 у больных с преэкваatorialно расположенной меланомой (все показатели статистически достоверны).

Что касается характера влияния морфологических типов меланомы (веретеноклеточной, эпителиоидноклеточной) на уровень экспрессии исследуемых микроРНК, то полученные данные свидетельствуют в пользу злокачественности обоих морфологических типов меланомы, но большее увеличение - в группе эпителиоидноклеточных МХ.

Полученные результаты позволяют утверждать, что микроРНК-223 и микроРНК-27b имеют большую ценность в подтверждении злокачественности первичной меланомы хориоидеи в стадии NoMo, а увеличение их экспрессии в процессе увеличения проминенции опухоли может свидетельствовать о возможности скрытого гематогенного метастазирования, что может явиться основанием для разработки новых методов лечения ранней метастатической болезни.

Выводы

1. Доказано, что в плане уточненной диагностики меланомы хориоидеи (NoMo) наиболее информативны микроРНК-223 (AUC=0,934; чувствительность-93%, специфичность-99%) и микроРНК-27b (AUC=0,870; чувствительность-86%, специфичность-80%) $p<0,05$.
2. Установлено, что рост меланомы хориоидеи (NoMo) сопровождается увеличением активности микроРНК-223 и микроРНК-27b по мере увеличения размеров опухоли (соответственно при начальных МХ 12% и 90%, при больших 476% и 362%) $p<0,05$.
3. Доказано наибольшее увеличение экспрессии в плазме крови больных с преэкваatorialно расположенной меланомой хориоидеи микроРНК-223 (AUC=0,948; чувствительность-93%, специфичность-100%) и микроРНК-27b (AUC=0,964; чувствительность-86%, специфичность-100%) $p<0,05$. Полученные результаты могут служить критерием неблагоприятного витального прогноза.
4. Эпителиодный тип меланомы хориоидеи сопровождается бóльшим увеличением экспрессии микроРНК-223 (на 116%) и микроРНК-27b (на 91%) по сравнению с веретенчаточным типом $p<0,05$.

Практические рекомендации

1. Для уточненной диагностики начальной МХ в сложных дифференциально-диагностических ситуациях можно рекомендовать анализ дисрегуляции микроРНК-27b, микроРНК-223
2. Для дифференциальной диагностики начальных МХ, начиная с проминенции 1 мм., целесообразнее использовать исследование уровня микроРНК-27b в плазме крови больных.
3. При наблюдении за больными в процессе формирования диагноза повышение уровня экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b может

служить косвенным признаком скрытого метастазирования опухолевого процесса.

4. Исследование уровня микроРНК-223 и микроРНК-27b в качестве биомаркера злокачественности опухоли целесообразно проводить на уровне специализированных центров, где устанавливается окончательный диагноз МХ, проводят лечебные мероприятия и диспансерное наблюдение за больными

Список литературы

1. Бровкина А.Ф., Склярова Н.В., Юровская Н.Н. Флюоресцентная ангиография в диагностике беспигментных меланом хориоидеи // Вестник офтальмологии. – 2004. -Т. 120, № 6. – С. 8-11.
2. Бровкина А. Ф., Панова И. Е., Саакян С. В. Офтальмоонкология: новое за последние два десятилетия // Вестник офтальмологии.– 2014. - Т. 130, № 6. – С. 13-19.
3. Бровкина А.Ф. В кн.: Руководство по клинической офтальмологии/Под редакцией академика РАН, профессора А.Ф. Бровкиной и профессора Ю.С. Астахова. – М.: МИА, 2014. – С. 725-762.
4. Бровкина А.Ф., Стоюхина А.С., Чесалин И.П. Метрическая классификация меланом хориоидеи и ее роль в выборе лечения // Вестник офтальмологии.– 2016. - Т. 132, № 2. – С. 4-7.
5. Бровкина А.Ф. Локальное лечение меланом хориоидеи: возможности и ограничения //Вестник офтальмологии. – 2018. - Т. 134, № 4. – С. 52-60.
6. Гришина Е.Е., Богатырев А.М., Лоскутов И.А. Офтальмогипертензия, ассоциированная с увеальной меланомой. Причины диагностических ошибок // Национальный журнал глаукома. – 2021. - Т. 20, № 4. – С. 45-49.
7. Гришина Е.Е., Лернер М.Ю., Гемджян Э.Г. Анализ выживаемости больных увеальной меланомой при органосохранном и ликвидационном лечении // Альманах клинической медицины.– 2018. - Т. 46, № 1. – С. 68-75. DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-1-68-75
8. Гришина Е.Е., Лернер М.Ю., Гемджян Э.Г. Эпидемиология увеальной меланомы в г. Москве // Альманах клинической медицины. – 2017. - Т. 45, №4. – С. 321-325. DOI:10.18786/2072-0505-2017-45-4-321-325
9. Киселев Ф.Л. МикроРНК и рак // Молекулярная биология. – 2014. –Т. 48, № 2. – С. 232–242.

10. Мякошина Е.Б. Комплексная диагностика начальной меланомы хориоидеи // Российский электронный журнал лучевой диагностики. –2016. – Т. 6, № 4. – С. 19-28.
11. Нероев В.В., Саакян С.В., Амирян А.Г., Цыганков А.Ю., Бурденный А.М., Логинов В.И., Хлгатын М.Р. Выживаемость больных увеальной меланомой в отдаленные сроки после энуклеации в зависимости от молекулярно-генетических aberrаций // Альманах клинической медицины. – 2018. – Т. 46, №4. – С. 338-346. DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-4-338-346
12. Романова К.А. Анализ современных возможностей МРТ-диагностики очаговых образований в печени // Российский онкологический журнал. – 2015. – Т. 20, № 1. – С. 47–54.
13. Саакян С.В., Амирян А.Г., Цыганков А.Ю., Хлгатын М.Р. Выживаемость больных увеальной меланомой в отдаленные сроки наблюдения в сопоставлении с клинико-гемодинамическими и морфологическими характеристиками опухоли // Российский офтальмологический журнал. – 2022. – Т.15, № 2. – С. 85–91. DOI:10.21516/2072-0076-2022-15-2-85-91
14. Саакян С.В., Цыганков А.Ю., Амирян А.Г., Складорова Н.В., Залетаев Д.В. Выживаемость при увеальной меланоме: роль молекулярно-генетических факторов // Вестник офтальмологии. –2016. –Т.132,№1. – С. 3-9.
15. Саакян С.В., Ширина Т.В. Анализ метастазирования и выживаемости больных увеальной меланомой // Опухоли головы и шеи. –2012. – № 2. – С. 53-56.
16. Стоюхина А.С., Гришина Е.Е., Давыдов Д.В. Результаты энуклеации как метода лечения больших увеальных меланом // Офтальмологические ведомости.–2010. – Т. 3,№ 1. – С. 16-21.
17. Федянин М.Ю., Игнатова Е.О., Тюляндин С.А. Роль микро-РНК при солидных опухолях // Злокачественные опухоли. –2013. –Т. 5,№ 1. – С. 3-14.

- 18.ЦыганковА.Ю., Саакян С.В., Амирян А.Г. Роль молекулярно-генетических факторов в выживаемости пациентов с увеальной меланомой цилиохориоидальной локализации // Медицинский вестник Башкортостана.– 2014. –Т. 9,№2. – С. 147-150.
- 19.Шепкалова В.М., Хорасанян-Тадэ А.А., Дислер О.Н. Внутриглазные опухоли // Атлас. М.: Медицина, 1965г. – С. 232.
- 20.AchbergerS., Aldrich W., TubbsR., CrabbJ.W., SinghA.D., TriozziP.L. Circulating immune cell and microRNA in patients with uveal melanoma developing metastatic disease // Mol. Immunol. –2014. – Vol. 58, №2. –P. 182-186. DOI:10.1016/j.molimm.2013.11.018.
- 21.AJCC Ophthalmic Oncology Task Force. International Validation of the American Joint Committee on Cancer’s 7th Edition Classification of Uveal Melanoma // JAMA Ophthalmol. –2015. – Vol. 133, №4. –P. 376-383. DOI: 10.1001 /jamaophthalmol. 2014.5395.
- 22.Ambros V., Bartel B., Bartel D.P., Burge C.B., Carrington J.C., Chen X., Dreyfuss G., Eddy S.R., Griffiths-Jones S., Marshall M., Matzke M., Ruvkun G., Tuschl T. A uniform system for microRNA annotation // RNA.–2003. – Vol. 9, №3. –P. 277-279. DOI: 10.1261/rna.2183803.
23. AmbrosV. Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans* //Curr. Opin. Genet. Dev. –2000. – Vol. 10, №4. –P. 428-433. DOI: 10.1016/s0959-437x(00)00108-8.
- 24.Aronow M.E., Topham A.K., Singh A.D. Uveal Melanoma: 5-Year Update on Incidence, Treatment, and Survival (SEER 1973-2013) //Ocul.Oncol.Pathol.– 2018. – Vol. 4, №3. –P. 145-151.DOI: 10.1159/00048064.
- 25.Ashworth T.R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death // Aus. Med. J.–1869. – Vol. 14 –P. 146-149.
26. Aughton K., Kalirai H., Coupland S.E. MicroRNAs and Uveal Melanoma: Understanding the Diverse Role of These Small Molecular Regulators // Int. J. Mol. Sci.–2020. – Vol. 21, №16. –P. 5648(1-16).DOI: 10.3390/ijms21165648

27. BandeRodríguez M.F., Fernandez Marta B., Lago Baameiro N., Santiago-Varela M., Silva-Rodríguez P., Blanco-Teijeiro M.J., PardoPerez M., Piñeiro Ces A. Blood Biomarkers of Uveal Melanoma: Current Perspectives // *Clin. Ophthalmol.*–2020. – Vol. 14 –P. 157-169.DOI: 10.2147/OPHTH.S199064.
28. Bao J., Yu Y., Chen J., He Y., Chen X., Ren Z., Xue C., Liu L., Hu Q., Li J., Cui G., Sun R. MiR-126 negatively regulates PLK-4 to impact the development of hepatocellular carcinoma via ATR/CHEK1 pathway // *Cell. Death. Dis.*–2018. – Vol. 9, №10. –P. 1045(1-15). DOI: 10.1038/s41419-018-1020-0.
29. Beasley A.B., Chen F.K., Isaacs T.W., Gray E.S. Future perspectives of uveal melanoma blood based biomarkers // *Br. J. Cancer.*–2022. – Vol. 1 –P. 1-18. DOI: 10.1038/s41416-022-01723-8.
30. Bellerive C., Ouellet E., Kamaya A., Singh A.D. Liver Imaging Techniques: Recognition of Uveal Melanoma Metastases // *Ocul. Oncol. Pathol.* –2018. – Vol. 4, №4. –P. 254-260.DOI: 10.1159/000485424.
31. Boldin I., Langmann G., Richtig E., Schwantzer G., Ardjomand N., Wegscheider B., El-Shabrawi Y. Five year results of prognostic value of tyrosinase in peripheral blood of uveal melanoma patients // *Melanoma Res.*–2005. – Vol. 15, №6. –P. 503-507.DOI:10.1097/00008390-200512000-00004.
32. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C.M. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*–2002. – Vol. 99, №24. –P. 15524 –15529. DOI:10.1073/pnas.242606799
33. Callejo S.A., Anteckka E., Blanco P.L., Edelstein C., Burnier M.N. Jr. Identification of circulating malignant cells and its correlation with prognostic factors and treatment in uveal melanoma // *A Prospective Longitudinal Study. Eye.*–2007. – Vol. 21, №6. –P. 752-759. DOI: 10.1038/sj.eye.6702322.

34. Carbone M., Yang H., Pass H.I., Krausz T., Testa J.R., Gaudino G. BAP1 and cancer // *Nat. Rev. Cancer.* –2013. – Vol. 13, №3. –P. 153-159. DOI: 10.1038/nrc3459.
35. Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells // *Cancer Res.*–2005. – Vol. 65, №14. –P. 6029-6033. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0137.
36. Chattopadhyay C., Kim D.W., Gombos D.S., Oba J., Qin Y., Williams M.D., Esmaeli B., Grimm E.A., Wargo J.A., Woodman S.E., Patel S.P. Uveal melanoma: From diagnosis to treatment and the science in between // *Cancer.* –2016. – Vol. 122, №15. –P. 2299-2312. DOI: 10.1002/cncr.29727.
37. Chen C.Z., Li L., Lodish H.F., Bartel D.P. MicroRNA smodulate hematopoietic lineage differentiation // *Science.* –2004. – Vol. 303, №5654. – P.83-86. DOI:10.1126/science.1091903
38. Chen C.Z. MicroRNA as oncogenes and tumor suppressors // *N. Engl. J. Med.*–2005. – Vol. 353, №17. –P. 1768-1771. DOI: 10.1056/NEJMp058190.
39. Chen X., Wang J., Shen H., Lu J., Li C., Hu D.N., Dong X.D., Yan D., Tu L. Epigenetics, microRNAs, and carcinogenesis: functional role of microRNA-137 in uveal melanoma // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* –2011. – Vol. 52, №3. –P. 1193-1199. DOI: 10.1167/iovs.10-5272.
40. Chen X., Cui Y., Xie X., Xing Y., Yuan Z., Wei Y. Functional role of miR-27b in the development of gastric cancer // *Mol. Med. Rep.*– 2018. – Vol. 17, №4. – P. 5081-5087. DOI:10.3892/mmr.2018.8538.
41. Cochran A.J., Holland G.N., Wen D.R., Herschman H.R., Lee W.R., Foos R.Y., Straatsma B.R. Detection of cytoplasmicS-100 protein in primary and metastatic intraocular melanomas // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*– 1983. – Vol. 24, №8. – P. 1153-1155.
42. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Assessment of metastatic disease status at death in 435 patients with large choroidal melanoma in the Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS): COMS report no. 15 // *Arch.*

- Ophthalmol. – 2001. – Vol. 199. – P. 670-676. DOI:10.1001/archophth.119.5.670.
43. Costinean S., Zanesi N., Pekarsky Y., Tili E., Volinia S., Heerema N., Croce C.M. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice // Proc. Natl. Acad. Sci USA.– 2006. – Vol. 103, №18. – P. 7024-7029. DOI:10.1073/pnas.0602266103
 44. Damato B.E. Tumour fluorescence and tumour-associated fluorescence of choroidal melanomas // Eye.– 1992. – Vol. 6, №6. – P. 587-593. DOI: 10.1038/eye.1992.127.
 45. Damato B. Detection of uveal melanoma by optometrists in the United Kingdom // OphthalmicPhysiol. Opt.– 2001. – Vol. 21, №4. – P. 268-271. DOI: 10.1046/j.1475-1313.2001.00595.x.
 46. Damato E.M., Damato B.E. Detection and time to treatment of uveal melanoma in the United Kingdom: an evaluation of 2,384 patients // Ophthalmology.– 2012. – Vol. 119, №8. – P. 1582-1589. DOI:10.1016/j.opthta.2012.01.048
 47. Diener-West M., Reynolds S.M., Agugliaro D.J., Caldwell R., Cumming K., Earle J.D., Hawkins B.S., Hayman J.A., Jaiyesimi I., Jampol L.M., Kirkwood J.M., Koh W.J., Robertson D.M., Shaw J.M., Straatsma B.R., Thoma J. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report No. 26 // Arch. Ophthalmol.– 2005. – Vol. 123, №12. – P. 1639– 1643. DOI: 10.1001/archophth.123.12.1639.
 48. Dogrusöz M., Jager M.J., Damato B. Uveal Melanoma Treatment and Prognostication // Asia-Pac. J. Ophthalmol. (Phila).– 2017. – Vol. 6, №2. – P. 186–196. DOI: 10.22608/APO.201734.
 49. Donoso L.A., Berd D., Augsburger J.J., Mastrangelo M.J., Shields J.A. Metastatic uveal melanoma. Pretherapy serum liver enzyme and liver scan

- abnormalities // Arch.Ophthalmol.–1985. – Vol. 103, №6. – P. 796– 798.
DOI: 10.1001/archophth.1985.01050060056024.
50. Due H., Schönherz A.A., Ryø L., Primo M.N., Jespersen D.S., Thomsen E.A., Roug A.S., Xiao M., Tan X., Pang Y., Young K.H., Bøgsted M., Mikkelsen J.G., Dybkær K. MicroRNA-155 controls vincristine sensitivity and predicts superior clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma // Blood. Adv.–2019. – Vol.3, №7. – P. 1185-1196.
DOI:10.1182/bloodadvances.2018029660.
51. Du T., WangD., WanX., XuJ., XiaoQ., LiuB. RegulatoryeffectofmicroRNA-223-3ponbreastcancerprocessesvia theHippo/Yapsignaling pathway // Oncol. Lett. – 2021. – Vol. 22, №1. – P. 516(1-9). DOI: 10.3892/ol.2021.12777.
52. Dweep H., Sticht C., Pandey P.,Gretz N. miRWalk-database: prediction of possible miRNA binding sites by «walking» the genes of three genomes // J. Biomed. Inform.–2011. – Vol. 44, №5. –P. 839-847.
DOI:10.1016/j.jbi.2011.05.002.
53. Ebrahimi F., Gopalan V., Smith R.A., Lam A.K. miR-126 in human cancers: clinical roles and current perspectives // Exp. Mol. Pathol. –2014. – Vol. 96, №1. –P. 98-107. DOI: 10.1016/j.yexmp.2013.12.004.
54. Ebrahimi S.O., Reisi S., ParchamiBarjui S. Increased risk of polycystic ovary syndrome (PCOS) associated with CC genotype of miR-146a gene variation // Gynecol. Endocrinol.–2018. – Vol. 34, №9. –P. 793-797.
DOI:10.1080/09513590.2018.1460341.
55. Einhorn L.H., Burgess M.A., Gottlieb J.A. Metastatic patterns of choroidal melanoma // Cancer.–1974. – Vol. 34, №4. –P. 1001-1004.DOI:10.1002/1097-0142(197410)34:4<1001::aid- cncr2820340406>3.0.co;2-z.
56. Eskelin S., Kivela T: Uveal melanoma: Implications of tumor doubling time // Ophthalmology.–2001. – Vol. 108. –P. 830-831.

57. Eskelin S., Pyrhonen S., Summanen P., Hahka-Kemppinen M., Kivela T. Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea. Tumor progression before and after treatment // *Ophthalmology*. – 2000. – Vol. 107. – P. 1443-1449.
58. Esplugas R., Arenas M., Serra N., Bellés M., Bonet M., Gascón M., Vallvé J.C., Linares V. Effect of radiotherapy on the expression of cardiovascular disease-related miRNA-146a, -155, -221 and -222 in blood of women with breast cancer // *PLoS One*. – 2019. – Vol. 14, №5. – P. e0217443 (1-17). DOI: 10.1371/journal.pone.0217443.
59. Falzone L., Romano G.L., Salemi R., Bucolo C., Tomasello B., Lupo G., Anfuso C.D., Spandidos D.A., Libra M., Candido S. Prognostic significance of deregulated microRNAs in uveal melanomas // *Mol Med Rep*. – 2019. – Vol. 19, №4. – P. 2599-2610. DOI: 10.3892/mmr.2019.9949.
60. Farazi T.A., Horlings H.M., Ten Hoeve J.J., Mihailovic A., Halfwerk H., Morozov P., Brown M., Hafner M., Reyat F., van Kouwenhove M., Kreike B., Sie D., Hovestadt V., Wessels L.F., van de Vijver M.J., Tuschl T. MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing // *Cancer Res*. – 2011. – Vol. 71, №13. – P. 4443-53. DOI: 10.1158/0008-5472.can-11-0608.
61. Favero A., Segatto I., Perin T., Belletti B. The many facets of miR-223 in cancer: Oncosuppressor, oncogenic driver, therapeutic target, and biomarker of response // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. – 2021. – Vol. 12, №6. – P. e1659 (1-21). DOI: 10.1002/wrna.1659.
62. Fazi F., Rosa A., Fatica A., Gelmetti V., DeMarchis M.L., Nervi C., Bozzoni I. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP alpha regulates human granulopoiesis // *Cell*. – 2005. – Vol. 123, №5. – P. 819-831. DOI: 10.1016/j.cell.2005.09.023.
63. Fei B., Ji F., Chen X., Liu Z., Li S., Mo Z., Fang X. Expression and clinical significance of Beclin-1 in gastric cancer tissues of various clinical stages //

- Oncol. Lett.–2016. – Vol. 11, №3. –P. 2271-2277.
DOI:10.3892/ol.2016.4183.
64. Flynt A.S., Lai E.C. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity // *Nature Reviews Genetics*. –2008. – Vol. 9, №11. –P. 831-842. DOI: 10.1038/nrg2455.
 65. Gong J., Zhang J.P., Li B., Zeng C., You K., Chen M.X., Yuan Y., Zhuang S.M. MicroRNA-125b promotes apoptosis by regulating the expression of Mcl-1, Bcl-1 and IL-6R // *Oncogene*.–2013. – Vol. 32, №25. –P. 3071-3079. DOI: 10.1038/onc.2012.318.
 66. Gonzalez-Villasana V., Rashed M.H., Gonzalez-Cantú Y., Bayraktar R., Menchaca-Arredondo J.L., Vazquez-Guillen J.M., Rodriguez-Padilla C., Lopez-Berestein G., Resendez-Perez D. Presence of Circulating miR-145, miR-155and miR-382 in Exosomes Isolated from Serum of Breast Cancer Patients and Healthy Donors // *Dis. Markers*.–2019. –P. 6852917(1-9). DOI: 10.1155/2019/6852917.
 67. Graves P., Zeng Y. Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view // *Genomics Proteomics Bioinformatics*. –2012. – Vol. 10, №5. –P. 239-245. DOI: 10.1016/j.gpb.2012.06.004.
 68. Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S., Bateman A., Enright A.J. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature // *NucleicAcids Res*.–2006. – Vol. 34. –P. 140–144. DOI:10.1093/nar/gkj112
 69. Guo H.B., Stoffel-WagnerB., Bierwirth T., Mezger J., Klingmuller D. Clinical significance of serum S100 in metastatic malignant melanoma // *Eur. J. Cancer*.– 1995. – Vol. 31A, № 11.– P. 1898-1902. DOI:10.1016/0959-8049(95)00087-y.
 70. Helgadottir H., Höiom V. The genetics of uveal melanoma: current insights // *Appl. Clin. Genet*.–2016. – Vol. 9. –P. 147-155.DOI:10.2147/TACG.S69210
 71. Horsman D.E., Sroka H., Rootman J., White V.A. Monosomy 3 andisochromosome 8q in a uveal melanoma // *CancerGenet. Cytogenet*.–1990. – Vol. 45, № 2.– P.249-253.DOI:10.1016/0165-4608(90)90090-w.

72. Hou Q., Han S., Yang L., Chen S., Chen J., Ma N., Wang C., Tang J., Chen X., Chen F., Dong X.D.E., Tu L. The Interplay of MicroRNA-34a, LGR4, EMT-Associated Factors, and MMP2 in Regulating Uveal Melanoma Cells // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2019. – Vol. 60, № 13.– P.4503-4510. DOI:10.1167/iovs.18-26477.
73. Iorio M.V., Croce C.M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review // *EMBO Mol. Med.* – 2012. – Vol. 4, №3.– P. 143-159. DOI:10.1002/emmm.201100209.
74. Iorio M.V., Croce C.M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review // *EMBO Mol. Med.* – 2017. – Vol. 9, №6. – P.852-858. DOI:10.15252/emmm.201707779.
75. Ke G., Liang L., Yang J.M., Huang X., Han D., Huang S., Zhao Y., Zha R., He X., Wu X. Mir 181a confers resistance of cervical cancer to radiation therapy through targeting the pro-apoptotic PRKCD gene // *Oncogene.* – 2013. – Vol. 32, №25. – P.3019–3027. DOI:10.1038/onc.2012.323.
76. Kent O.A., Mendell J.T. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes // *Oncogene.* – 2006. – Vol. 25, №46. – P.6188-6196. DOI:10.1038/sj.onc.1209913.
77. Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function // *Nucleic. Acids. Res.* – 2019. – Vol. 47, №1. – P.155-162. DOI:10.1093/nar/gky1141.
78. Krishna Y., Acha-Sagredo A., Sabat-Pospiech D., Kipling N., Clarke K., Figueiredo C.R., Kalirai H., Coupland S.E. Transcriptome Profiling Reveals New Insights into the Immune Microenvironment and Upregulation of Novel Biomarkers in Metastatic Uveal Melanoma // *Cancers.* – 2020. – Vol. 12. – P. 2832 (1-20). DOI:10.3390/cancers12102832.

79. Kujala E., Makitie T., Kivela T. Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma // *Invest. Ophthalmol. Vis.Sci.*– 2003. – Vol. 44. – P.4651–4659. DOI:10.1167/iovs.03-0538.
80. Kutter C., Svoboda P. Meeting report: miRNA, siRNA, piRNA. Knowns of the unknown // *RNA Biology.*– 2008. – Vol. 5, №4. – P.181-188. DOI:10.4161/rna.7227.
81. Larsen A-C., Holst L., Kaczkowski B., Andersen M.T., ManfeV., Siersma V.D., Kolko M., Kiilgaard J.F., Winther O., Prause J.U., Gniadecki R., Heegaard S. MicroRNA expression analysis and Multiplex ligation-dependent probeamplification in metastaticandnon-metastatic uveal melanoma // *Acta. Ophthalmol.*– 2014. – Vol. 92, №4. – P.541-549. DOI:10.1111/aos.12322
82. Latchana N., Vincenzo M.J., Regan K., Abrams Z., Zhang X., Lacob N.K., Gru A.A., Fadda P., Markowitz J., Howard J.H., Carson W.E. Alterations in patient plasma microRNA expression profiles following resection of metastatic melanoma // *J. Surg. Oncol.* – 2018. – Vol. 118, №3. – P.501-509. DOI:10.1002/jso.25163.
83. Lee R., Feinbaum R., Ambros V. The C. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 // *Cell.* – 1993. - Vol. 75, № 5. – P. 843–854. DOI:10.1016/0092-8674(93)90529-y.
84. Lee R., Feinbaum R., Ambros V. A short history of a short RNA // *Cell.* -2004. - Vol. 116, № 2 Suppl.–P. 89-92. DOI:10.1016/s0092-8674(04)00035-2.
85. Leong J.W., Sullivan R.P., Fehniger T.A. Natural killer cell regulation by microRNAs in health and disease // *J. Biomed. Biotechnol.* - 2012. –Vol. 2012. – P. 632329 (1-12). DOI:10.1155/2012/632329
86. Li J., Guo Y., Liang X., Sun M., Wang G., De W., Wu W. MicroRNA-223 functions as an oncogene in human gastric cancer by targeting FBXW7/hCdc4 // *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*–2012. – Vol. 138, № 5. – P. 763-774. DOI:10.1007/s00432-012-1154-x
87. Li T., Wu Q., Liu D., Wang X. miR-27b Suppresses Tongue Squamous Cell Carcinoma Epithelial-Mesenchymal Transition by Targeting ITGA5 // *Onco.*

- Targets. Ther. – 2020. – Vol. 17, № 13. – P. 11855-11867. DOI:10.2147/OTT.S281211.
- 88.Liu C.H., Jing X.N., Liu X.L., Qin S.Y., Liu M.W., Hou C.H. Tumor-suppressor miRNA-27b-5p regulates the growth and metastatic behaviors of ovarian carcinoma cells by targeting CXCL1 // J. Ovarian. Res.– 2020. – Vol. 13, №1. – P. 92(1-10).DOI:10.1186/s13048-020-00697-6.
- 89.Liu J., Ma L., LiC., ZhangZ., YangG., ZhangW. Tumor-targeting TRAIL expression mediated by miRNA response elements suppressed growth of uveal melanoma cells // Mol. Oncol. – 2013. – Vol. 7, № 6. – P. 1043-1055. DOI:10.1016/j.molonc.2013.08.003;
- 90.Liu Q., Zhang M., Jiang X., Zhang Z., Dai L., Min S., Wu X., He Q., Liu J., Zhang Y., Zhang Z., Yang R. miR-223 suppresses differentiation of tumor induced CD11b⁺ Gr1⁺ myeloidderived suppressor cells from bone marrow cells // Int. J. Cancer. – 2011. –Vol. 129, № 11. –P. 2662-2673. DOI: 10.1002/ijc.25921
- 91.Li Y., Huang Q., ShiX., JinX., ShenL., XuX., WeiW. MicroRNA 145 may play an important role in uveal melanoma cell growth by potentially targeting insulin receptor substrate-1 // Chin. Med. J. (Engl). – 2014. – Vol. 127, № 8. – P. 1410-1416. PMID: 24762580.
- 92.Ma Y.B., Song D.W., NieR.H., MuG.Y. MicroRNA-32 functions as a tumor suppressor and directly targets EZH2 in uveal melanoma // Genet. Mol. Res. – 2016. – Vol. 15, № 2. – P. 1-9.DOI:10.4238/gmr.15027935
- 93.McLaughlin C.C., Wu X.C., Jemal A., Martin H.J., Roche L.M., Chen V.W. Incidence of noncutaneous melanomas in the U.S. // Cancer.– 2005. –Vol. 103, № 5. –P. 1000–1007. DOI:10.1002/cncr.20866.
- 94.McLean I.W., Foster W.D., Zimmerman L.E., GamelJ.W. Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology //Am. J. Ophthalmol. – 1983. –Vol. 96, № 4. –P. 502-509. DOI:10.1016/s0002-9394(14)77914-0.

95. Meister J., Schmidt M.H.H. miR-126 and miR-126*: new players in cancer // *Scientific World Journal*.—2010. —Vol. 10. P. 2090-2100. DOI:10.1100/tsw.2010.198
96. Miguel D., de Frutos-Baraja J.M., López-Lara F., Saornil M.A., García-Álvarez C., Alonso P., Diezhandino P. Radiobiological doses, tumor, and treatment features influence on outcomes after episcleral brachytherapy. A 20-year retrospective analysis from a single-institution: part II//*J. Contemp. Brachytherapy*. — 2018. — Vol. 10, № 4. — P. 347–359. DOI:10.5114/jcb.2018.77955.
97. Milan-Rois P., Quan A., Slack F.J., Somoza A. The Role of LncRNAs in Uveal Melanoma // *Cancers*. — 2021. —Vol. 13, № 16. —P. 4041 (1-19). DOI:10.3390/cancers13164041.
98. Mourelatos Z., Dostie J., Paushkin S., Sharma A., Charroux B., Abel L., Rappsilber J., Mann M., Dreyfuss G. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs // *Genes Dev*. -2002. — Vol. 16, № 6. —P. 720-728. DOI:10.1101/gad.974702
99. Nezu N., Goto H., Umazume K., Ueda S., Shibata M. Clinical analysis of uveal melanoma // *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*.—2017. —Vol. 121, № 5. —P. 413–418. PMID: 30074750.
100. Onken M.D., Worley L.A., Long M.D., Duan S., Council M.L., Bowcock A.M., Harbour J.W. Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. — 2008. — Vol. 49, № 12. — P. 5230-5234. DOI:10.1167/iovs.08-2145.
101. Orcurto V., Denys A., Voelter V., Schalenbourg A., Schnyder P., Zografos L., Leyvraz S., Delaloye A.B., Prior J.O. (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography and magnetic resonance imaging in patients with liver metastases from uveal melanoma: results from a pilot study // *Melanoma Res*. - 2012. — Vol. 22, № 1. — P. 63-69. DOI:10.1097/CMR.0b013e32834d3dcb.

102. Pardo M., García A., Thomas B., Piñeiro A., Akoulitchev A., Dwek R.A., Zitzmann N. Proteome analysis of a human uveal melanoma primary cell culture by 2-DE and MS// *Proteomics*. – 2005. –Vol. 5, № 18. –P. 4980-4993. DOI:10.1002/pmic.200500030.
103. Park S.J., Oh C.M., Kim B.W., Woo S.J., Cho H., Park K.H. Nationwide Incidence of Ocular Melanoma in South Korea by Using the National Cancer Registry Database (1999-2011) // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2015. – Vol. 56, № 8. – P. 4719–4724. DOI:10.1167/iovs.15-16532
104. Peng J., Liu H., Liu C. MiR-155 Promotes Uveal Melanoma Cell Proliferation and Invasion by Regulating NDFIP1 Expression // *Technol. Cancer. Res. Treat.* – 2017. – Vol. 16, № 6. – P. 1160-1167. DOI:10.1177/1533034617737923
105. Pourrajab F., VakiliZarch A., Hekmatimoghaddam S., Zare-Khormizi M.R. MicroRNAs; easy and potent targets in optimizing therapeutic methods in reparative angiogenesis // *J. Cell. Mol. Med.*– 2015. – Vol. 19, № 12. –P. 2702-2714. DOI:10.1111/jcmm.12669
106. Prescher G., Bornfeld N., Hirche H., Horsthemke B., Jöckel K.H., Becher R. Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma // *Lancet*. – 1996. – Vol. 347, № 9010. –P. 1222-1225. DOI:10.1016/s0140-6736(96)90736-9.
107. Ragusa M., Barbagallo C., Statello L., Caltabiano R., Russo A., Puzzo L., Avitabile T., Longo A., Toro M.D., Barbagallo D., Valadi H., Pietro C.D., Purrello M., Reibaldi M. miRNA profiling in vitreous humor, vitreal exosomes and serum from uveal melanoma patients: Pathological and diagnostic implications // *Cancer. Biol. Ther.*– 2015. – Vol. 16, № 9. – P. 1387—1396. DOI:10.1080/15384047.2015.1046021
108. Russo A., Caltabiano R., Longo A., Avitabile T., Franco L.M., Bonfiglio V., Puzzo L., Reibaldi M. Increased Levels of miRNA-146a in Serum and Histologic Samples of Patients with Uveal Melanoma // *Front. Pharm.*- 2016. – Vol. 7. – P. 424 (1-6). DOI:10.3389/fphar.2016.00424

109. Sasaki K., Yoshimoto T., Nakao T., Minagawa K., Takahashi Y., Watanabe Y., Tanabe C. A nevoid basal cell carcinoma syndrome with chromosomal aberration// *No ToHattatsu*.–2000. –Vol. 32, № 1. –P. 49-55. PMID: 10655752.
110. Schetter A.J., Harris C.C. Plasma microRNAs: a potential biomarker for colorectal cancer? // *Gut*. – 2009. –Vol. 58, № 10. –P. 1318-1319. DOI:10.1136/gut.2009.176875.
111. Schmittel A., Bechrakis N.E., Martus P., Mutlu D., Scheibenbogen C., Bornfeld N., Foerster M.H., Thiel E., Keilholz U. Independent prognostic factors for distant metastases and survival in patients with primary uveal melanoma // *Eur. J. Cancer*.–2004. –Vol. 40, № 16. –P. 2389-2395. DOI:10.1016/j.ejca.2004.06.028
112. Servois V., Mariani P., Malhaire C., Petras S., Piperno-Neumann S., Plancher C., Levy-Gabriel C., Lumbroso-le Rouic L., Desjardins L., Salmon R.J. Preoperative staging of liver metastases from uveal melanoma by magnetic resonance imaging (MRI) and fluorodeoxyglucose-positron emission tomography (FDG-PET) // *Eur. J. Surg. Oncol.* – 2010. – Vol. 36, № 2. – P. 189-194. DOI:10.1016/j.ejso.2009.08.010.
113. Shen J., Ambrosone C.B., DiCioccio R.A., Odunsi K., Lele S.B., Zhao H. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis // *Carcinogenesis*.–2008. –Vol. 29, № 10. –P. 1963-1966. DOI:10.1093/carcin/bgn172.
114. Shields C.L., Furuta M., Thangappan A., Nagori S., Mashayekhi A., LallyD.R., Kelly C.C., Rudich D.S., Nagori A.V., Wakade O.A., Mehta S., Dellacava E.F., Kaplan B., Shields J.A. Metastasis of uveal melanoma millimeter-by-millimeter in 8033 consecutive eyes // *Arch. Ophthalmol.* – 2009. – Vol. 127, № 8. P.989–998. DOI:10.1001/archophthalmol.2009.208.
115. Shields C.L., Kaliki S., Furuta M., Fulco E., Alarcon C., Shields J.A. American Joint Committee on Cancer classification of posterior uveal melanoma (tumor size category) predicts prognosis in 7731 patients

- //Ophthalmology. – 2013. –Vol. 120, № 10. P. 2066–2071. DOI:10.1016/j.ophttha.2013.03.012.
116. Shields C.L., Kaliki S., Shah S.U., Luo W., Furuta M., Shields J.A. Iris melanoma features and prognosis in 317 children and adults // J. A. A. P. O. S.– 2012. – Vol. 16, № 1. –P. 10–16. DOI:10.1016/j.jaapos.2011.10.012.
117. Singh A.D., Turell M.E., Topham A.K. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival // Ophthalmology.– 2011. – Vol. 118, № 9. P.1881–1885. DOI:10.1016/j.ophttha.2011.01.040
118. Slaby O., Svoboda M., Fabian P., Smerdova T., Knoflickova D., Bednarikova M., Nenutil R., Vyzula R. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer // Oncology.– 2007.–Vol. 72, № 5-6.–P. 397-402. DOI:10.1159/000113489.
119. Smith B., Selby P., Southgate J., Pittman K., Bradley C., Blair G.E. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction // Lancet. -1991. –Vol. 338, № 8777. –P. 1227–1229. DOI:10.1016/0140-6736(91)92100-g.
120. Streppel M.M., Pai S., Campbell N.R., Hu C., Yabuuchi S., Canto M.I., Wang J.S., Montgomery E.A., Maitra A. MicroRNA-2243 is suppressed in the multistep progression of Barrett's esophagus and modulates sensitivity to chemotherapy by targeting PARP1 // Clin. Cancer. Res. – 2013. – Vol. 19, № 15. – P. 4067–4078. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-13-0601.
121. Strimbu K., Tavel J.A. What are biomarkers? // Curr. Opin. HIV/AIDS. – 2010. – Vol. 5, № 6. – P. 463–466. DOI:10.1097/COH.0b013e32833ed177.
122. Sun L., Wang Q., Gao X., Shi D., Mi S., Han Q. MicroRNA-454 functions as an oncogene by regulating PTEN in uveal melanoma // FEBS Lett.– 2015. – Vol. 589, № 19PtB. –P. 2791–2796. DOI:10.1016/j.febslet.2015.08.007
123. Sun Q., Cong R., Yan H., Gu H., Zeng Y., Liu N., Chen J., Wang B. Genistein inhibits growth of human uveal melanoma cells and affects microRNA-27a and target gene expression // Oncol. Rep. – 2009. – Vol. 22, № 3. – P. 563-567. DOI:10.3892/or_00000472.

124. Sun Y., Zhang X., Cong Z., Teng S. Identification of 5 microRNA biomarkers associated with the prognosis of uveal melanoma // *Medicine (Baltimore)*. – 2022. – Vol.101, № 35. –P. e30366 (1-8). DOI:10.1097/MD.00000000000030366.
125. Tavazoie S.F., Alarcon C., Oskarsson T., Padua D., Wang Q., Bos P.D., Gerald W.L., Massague J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis // *Nature*. - 2008. – Vol. 451, № 7175. –P. 147–152. DOI:10.1038/nature06487
126. Taylor D. D., Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer // *Gynecol. Oncol.* -2008. – Vol. 110, № 1. – P. 13-21. DOI:10.1016/j.ygyno.2008.04.033.
127. Tosar J.P., Witwer K., Cayota A. Revisiting Extracellular RNA Release, Processing, and Function // *Trends. Biochem. Sci.* – 2021. – Vol. 46. – P. 438–445. DOI:10.1016/j.tibs.2020.12.008
128. Triozzi P.L., Achberger S., Aldrich W., Singh A.D., Grane R., Borden E.C. The association of blood angioregulatory microRNA levels with circulating endothelial cells and angiogenic proteins in patients receiving dacarbazine and interferon // *J. Transl. Med.* – 2012. – Vol. 10. – P. 241(1-7). DOI:10.1186/1479-5876-10-241
129. Van Raamsdonk C.D., Griewank K.G., Crosby M.B., Garrido M.C., Vemula S., Wiesner T., Obenaus A.C., Wackernagel W., Green G., Bouvier N., Sozen M.M., Baimukanova G., Roy R., Heguy A., Dolgalev I., Khanin R., Busam K., Speicher M.R., O'Brien J., Bastian B.C. Mutations in GNA11 in uveal melanoma// *N. Engl. J. Med.*– 2010. – Vol. 363, № 23. –P. 2191-2199. DOI:10.1056/NEJMoa1000584.
130. Venkatesan N., Kanwar J, Deepa P.R., Khetan V., Crowley T.M., Raguraman R., Sugneswari G., Rishi P., Natarajan V., Biswas J., Krishnakumar S. Clinico-Pathological Association of Delineated miRNAs in Uveal Melanoma with Monosomy 3/Disomy 3 Chromosomal Aberrations // *PLoS*.

- One.–2016. –Vol. 11, № 1. –P. e0146128(1-14).
DOI:10.1371/journal.pone.0146128
131. Virgili G., Gatta G., Ciccolallo L., Capocaccia R., Biggeri A., Crocetti E., Lutz J.M., Paci E. EURO CARE Working Group. Incidence of uveal melanoma in Europe // *Ophthalmology*. – 2007. – Vol. 114, № 12. – P. 2309-2315. DOI:10.1016/j.optha.2007.01.032.
132. Vogt M., Munding J., Gruner M., Liffers S.T., Verdoodt B., Hauk J., Steinstraesser L., Tannapfel A., Hermeking H. Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas // *Virchows. Arch.* – 2011. Vol. 458, № 3. – P. 313–322. DOI:10.1007/s00428-010-1030-5.
133. Wei Y.T., Guo D.W., Hou X.Z., Jiang D.Q. miRNA-223 suppresses FOXO1 and functions as a potential tumor marker in breast cancer // *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*.–2017. – Vol. 63, № 5. – P. 113-118. DOI:10.14715/cmb/2017.63.5.21.
134. Wightman B., Ha I., Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans* // *Cell*. – 1993. –Vol. 75, № 5. –P. 855-862. DOI:10.1016/0092-8674(93)90530-4.
135. Worley L.A., Long M.D., Onken M.D., Harbour J.W. Micro-RNAs associated with metastasis in uveal melanoma identified by multiplexed microarray profiling // *Melanoma Research*.–2008. –Vol. 18, № 3. –P. 184–190. DOI:10.1097/CMR.0b013e3282feeac6.
136. Wozniak M., Czyz M. The Functional Role of Long Non-Coding RNAs in Melanoma // *Cancers*. – 2021. –Vol. 13, № 19. P. 4848 (1-30). DOI:10.3390/cancers13194848.
137. Wroblewska J.P., Lach M.S., Ustaszewski A., Kulcenty K., Ibbs M., Jagiello I., Suchorska W.M., Marszalek A. The Potential Role of Selected miRNA in

- Uveal Melanoma Primary Tumors as Early Biomarkers of Disease Progression // *Genes*. – 2020. – Vol. 11, № 3. –P. 271 (1-15). DOI:10.3390/genes11030271
138. Wu L., Li H., Jia C.Y., Cheng W., Yu M., Peng M., Zhu Y., Zhao Q., Dong Y.W., Shao K., Wu A., Wu X.Z. MicroRNA-223 regulates FOXO1 expression and cell proliferation // *FEBS Lett.*–2013. –Vol. 587, № 4. P. - 387(1-5). DOI:10.1016/j.febslet.2012.02.050
139. Wu M.F., Yang J., Xiang T., Shi Y.Y., Liu L.J. miR-21 targets Faslig and-mediated apoptosis in breast cancer cell in e MCF-7 // *J. Huazhong. Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* – 2014. – Vol. 34, № 2. – P. 190–194. DOI:10.1007/s11596-014-1257-5.
140. Xiao C., Srinivasan L., Calado D.P., Patterson H.C., Zhang B., Wang J., Henderson J.M., Kutok J.L., Rajewsky K. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes // *Nat. Immunol.* – 2008. – Vol. 9, № 4. – P. 405-414. DOI:10.1038/ni1575
141. Xiao D., Ohlendorf J., Chen Y., Taylor D.D., Rai S.N., Waigel S., Zacharias W., Hao H., and McMasters K.M. Identifying mRNA, microRNA and protein profiles of melanoma exosomes // *PLoS. One.*– 2012. – Vol. 7, № 10. –P. e46874(1-15). DOI:10.1371/journal.pone.0046874.
142. Yan D., Zhou X., Chen X., Hu D.N., Dong X.D., Wang J., Lu F., Tu L., Qu J. MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2009. – Vol. 50, № 4. – P. 1559–1565. DOI:10.1167/iovs.08-2681
143. Yang C., Wang R., Hardy P. Potential of miRNA-Based Nanotherapeutics for Uveal Melanoma // *Cancers*. – 2021. –Vol. 13, № 20. –P. 5192 (1-18). DOI:10.3390/cancers13205192
144. Yang C., Wang Y., Hardy P. Emerging roles of microRNAs and their implications in uveal melanoma // *Cell. Mol. Life. Sci.CMLS.* - 2021. – Vol. 78, № 2. – P. 545–559. DOI:10.1007/s00018-020-03612-w.

145. Yang C., Wei W. The miRNA expression profile of the uveal melanoma // *Sci. China Life Sci.* – 2011. – Vol. 54, № 4. – P. 351–358. DOI:10.1007/s11427-011-4149-y
146. Yu C.C., Chen Y.W., Chiou G.Y., Tsai L.L., Huang P.I., Chang C.Y. MicroRNA let-7a represses chemoresistance and tumorigenicity in head and neck cancer via stem-like properties ablation // *Oral. Oncol.*-2011. – Vol. 47, № 3. – P. 202–210. DOI:10.1016/j.oraloncology.2010.12.001.
147. Yu G., Yin Z., He H., Zheng Z., Chai Y., Xuan L., Lin R., Wang Q., Li J., Xu D. Low serum miR-223 expression predicts poor outcome in patients with acute myeloid leukemia // *J. Clin. Lab. Anal.* – 2020. – Vol. 34, № 3. – P. e23096(1-7). DOI:10.1002/jcla.23096.
148. Zhang L., He X., Li F., Pan H., Huang X., Wen X., Zhang H., Li B., Ge S., Xu X., Jia R., Fan X. The miR-181 family promotes cell cycle by targeting CTDSPL, a phosphatase-like tumor suppressor in uveal melanoma // *J. Exp. Clin. Cancer. Res.*-2018.- Vol.37,№ 1. –P. 15(1-13).DOI:10.1186/s13046-018-0679-5
149. Zhou K., Wei Y., Li X., Yang X. MiR-223-3p targets FOXO3a to inhibit radiosensitivity in prostate cancer by activating glycolysis // *Life Sci.*- 2021. – Vol. 282. – P. 119798(1-10). DOI:10.1016/j.lfs.2021.119798
150. Zimmerman L.E., McLean I.W., Foster W.D. Does enucleation of the eye containing a malignant melanoma prevent or accelerate the dissemination of tumour cells// *Br. J. Ophthalmol.*-1978. – Vol. 62, № 6. –P. 420-425. DOI:10.1136/bjo.62.6.420.