

*На правах рукописи*

**Цыбикова Наталья Дашазэгбэевна**

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

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

**3.1.5. Офтальмология**

**Москва - 2023**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

**Оппоненты:**

**Саакян Светлана Ваговна** – д.м.н., член-корреспондент РАН, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации, начальник отдела офтальмоонкологии и радиологии

**Гришина Елена Евгеньевна** – д.м.н., профессор, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского», главный научный сотрудник онкологического отделения хирургических методов лечения, врач офтальмологического отделения, профессор кафедры офтальмологии и оптометрии.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова»

Защита состоится: «04» апреля 2023 года в 10.00 часов на заседании диссертационного совета на базе ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России по адресу: 125995, г. Москва, ул. Баррикадная, д.2/1, стр. 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России по адресу: 125445, г. Москва, ул. Беломорская, д.19 и на сайте <http://www.rmapo.ru/>

Автореферат разослан " \_\_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2023 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Карпова Елена Петровна

### **Актуальность темы диссертации**

Увеальная меланома (УМ) – первичная злокачественная опухоль сосудистой оболочки глаза меланоцитарного происхождения. По локализации УМ представлена: меланомой радужки, меланомой цилиарного тела и меланомой хориоидеи (МХ) (Шепкалова В.М., Хорасанян-Тадэ А.А., Дислер О.Н., 1965; Zimmerman L.E., Mc Lean I.W., Foster W.D., 1978; Mc Laughlin C.C., 2005; Shields C.L., Furuta M., 2009). Частота локализации опухоли в хориоидее достигает 90% (Shields C.L., Furuta M., 2009; Бровкина А.Ф., Панова И. Е., Саакян С. В., 2014, Гришина Е.Е., Лернер М.Ю., Гемджян Э.Г., 2017), и только у 10% больных опухоль локализуется в радужке и/или цилиарном теле. УМ метастазирует гематогенно, преимущественно в печень (93%), легкие (29%) (Diener-West M., Reynolds S.M., Agugliaro D.J., 2005; Singh A.D., Turell M.E., Topham A.K., 2011). 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 и более факторов свидетельствуют в пользу наличия метастазов (Shields C.L., Furuta M., 2009; Бровкина А.Ф., Стоюхина А.С., Чесалин И.П. 2016). Более благоприятный витальный прогноз характерен для начальных меланом проминенцией до 3 мм., диаметром до 10 мм (Shields C.L., Furuta M., 2009; Бровкина А.Ф., Мусаткина И.В., Стоюхина А.С., 2016).

Метастазы выявляют с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ), компьютерной томографии (КТ) или ПЭТ/КТ - позитронно-эмиссионной томографии в комбинации с компьютерной томографией. Для выявления метастазов в печени показано преимущество МРТ в сравнении с другими цифровыми методами исследования (Servois V., Mariani P., 2010; Orcurto V., Denysc A., 2012; Романова К.А. 2015), однако существующие методы исследования не являются абсолютными. Остается актуальным вопрос раннего уточнения истинного характера патологического процесса и раннего выявления возможного метастазирования.

В начале 1990-х годов D.E. Horsman с соавт., отметили, что роль генетики в развитии первичных внутриглазных

злокачественных опухолей важна. Речь идет о единичном случае большой УМ с обнаруженной генетической аномалией – моносомией с потерей целой копии 3 хромосомы (Horsman D.E., Sroka H., 1990). Позднее это положение доказано у 30 больных МХ из 54 обследованных. Отмечено, что во всех случаях меланома имела большие размеры и локализовалась в цилиарном теле и хориоидее (Prescher G., Bornfeld N., 1996). Таким образом, моносомию по 3 хромосоме в тот период было возможно определить только при больших УМ. По мере увеличения количества исследований удалось установить, что моносомия 3 хромосомы встречается и при таких опухолях, как глиобластома, базальноклеточный рак кожи, и др. Следовательно, моносомию по 3 хромосоме можно расценивать как свидетельство предрасположенности к развитию злокачественных опухолей. Дальнейшее изучение позволило обнаружить ядерный белок ВАР1 (BRCA1-ассоциированный белок-1), кодируемый геном-супрессором опухоли, расположенным на 3 хромосоме. В исследованиях доказано его участие в процессах регуляции клеточного цикла и репарации ДНК. Установлено, что ВАР1 предрасполагает к развитию не только УМ, но и других злокачественных опухолей (мезотелиома, меланома кожи, базальноклеточный рак кожи, рак почки и др). Таким образом, и наличие ВАР1 в большей степени свидетельствует о предрасположенности индивидуума к развитию злокачественной опухоли (синдром предрасположенности к опухоли ВАР1) (Carbone M., Yang H., 2013).

В начале 2000-х годов появились сведения об онкогенных мутациях в генах, связанных с субъединицами G-белка- $\alpha$  GNAQ или GNA11 в МХ. Частота таких изменений составляла приблизительно 80-90%. Доказано, что мутации в GNAQ и GNA11 активируют внутриклеточные сигнальные пути, отвечающие за размножение и рост опухолевых клеток (Onken M.D., Worley L.A., 2008). Что касается МХ, то мутация GNA11 может стимулировать рост меланоцитов. Как правило, ее обнаруживают при меланоме цилиохориоидальной локализации и наличии экстрабульбарного роста (Van Raamsdonk C.D., Griewank K.G., 2010). Генетические нарушения: моносомия 3 (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 (Цыганков А.Ю., Саакян С.В., Амирян А.Г., 2014, Саакян С.В., Цыганков А.Ю., Амирян А.Г., Склярова Н.В., Залетаев Д.В., 2016, Саакян С.В., Амирян А.Г., Цыганков А.Ю., Хлгатын М.Р., 2022). В работах рассмотрены: ассоциация моносомии 3 с морфологическим строением УМ; связь делеции короткого плеча хромосомы 1 с наличием экстрабульбарного роста опухоли. Доказана связь между моносомией хромосомы 3 и сниженной выживаемостью пациентов, а делеция короткого плеча хромосомы 1 с наличием экстрабульбарного роста опухоли. Наличие генетических изменений подтверждает злокачественный характер опухоли, оставляя за пределами сведения о возможном метастазировании. Исследования в области генетики УМ продолжаются (Саакян С.В., Цыганков А.Ю., Амирян А.Г., Склярова Н.В., Залетаев Д.В., 2016, Саакян С.В., Амирян А.Г., Цыганков А.Ю., Хлгатын М.Р., 2022).

Начиная с 2000-го года появились сообщения о роли микроРНК в развитии злокачественных опухолей и появлении метастазов. С 2008 года - первые сведения о роли микроРНК у больных УМ (Worley L.A., Long M.D., 2008).

### **Степень разработанности проблемы исследования**

В 1993 году открыта микроРНК при исследовании гена *lin-14* задействованного на этапах личиночного развития нематоды *Caenorhabditis elegans* (Lee R.C., Feinbaum R.L., 1993; Wightman B., Ha I., 1993). И только в начале 21 века появляются первые сообщения о роли микроРНК в развитии патологии человека (Mourelatos Z., Dostie J., Paushkin S., 2002; Calin G.A., Dumitru C.D., 2002). МикроРНК - класс малых некодирующих РНК, которые расценивают как окончательный носитель передачи генетической информации (Farazi T.A., Horlings H.M., 2011; Iorio M.V., Croce S.M., 2012; Ebrahimi F., Gopalan V., Smith R.A., 2014). Показано, что они играют роль в онкогенезе, участвуя в регуляции генов на всем пути их жизненного цикла (транскрипционном, посттранскрипционном и трансляционном уровнях). Отмечено, что микроРНК могут действовать не только как онкогены (стимулируют рост опухоли), но и как опухолевые супрессоры (подавляют ее рост) (Chan J.A., Krichevsky A.M., 2005; Wu M.F., Yang J., 2014; Fei B., Ji F., 2016). С учетом локализации микроРНК выделено два их вида: внутриклеточная (непосредственно в самой клетке) и внеклеточная (циркулирующая в плазме крови) (Xiao D., Ohlendorf J., 2012).

Функции микроРНК переменны и могут меняться в зависимости от окружающей среды (Graves P., Zeng Y. 2012). Имеются сведения о роли микроРНК в развитии таких опухолей, как рак молочной железы, рак толстого кишечника, рак яичника (Tavazoie S.F., Alarcon C., 2008; Yu C.C., Chen Y.W., 2011; Vogt M., Munding J., 2011). Однако, не все микроРНК изучены: к настоящему времени зарегистрировано в miRbase 2654 микроРНК, выделенных у человека (miRbase, выпуск 22) (Kozomara A., 2019).

Первые публикации о роли микроРНК при увеальной меланоме появились в 2008 году (Worley L.A., Long M.D., 2008). Авторы исследовали уровень микроРНК в тканях первичной меланомы при наличии метастазов в печень (Chen X., Wang J., Shen H., 2011; Li Z., 2014). Иными словами, подтверждали наличие микроРНК как в основном узле опухоли, так и в метастатическом узле. Авторы сделали вывод о роли микроРНК в онкогенезе УМ и ее метастазировании. В 2012 году появились первые работы, освещающие особенности микроРНК в плазме крови у больных увеальной меланомой (Achberger S., Aldrich W., Tubbs R., 2012). К настоящему времени (по состоянию на декабрь 2022 г) в литературе имеются публикации 8 работ. Доказана роль 12 микроРНК, обнаруживаемых в плазме крови при увеальной меланоме. К наиболее показательным и достоверно измененным относят: 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, в то время как в онкогенезе злокачественных опухолей другого генеза изучено более 1600 микроРНК. Отсутствуют сведения о возможной корреляции уровня экспрессии микроРНК с размерами и локализацией опухоли. МХ морфологически представлена тремя формами: веретенообразной, эпителиоидноклеточной и смешаноклеточной формами, но чаще всего встречается последняя. Все три формы характеризуются разной степенью злокачественности, что оказывает влияние на витальный прогноз. Сведения о «поведении» микроРНК с учетом этих характеристик в литературе отсутствуют.

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 клеточными формами (меланома радужки чаще представлена веретенообразными клетками, меланома цилиарного тела – чаще имеет эпителиоидноклеточное строение, а в МХ преобладают 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 МХ.

Таким образом, остается открытым вопрос можно ли использовать уровень экспрессии микроРНК в плазме крови, как критерий злокачественности внутриглазной опухоли. Учитывая, что обнаружение в плазме крови определенных микроРНК свидетельствуют о наличии злокачественной опухоли, а плазма крови - это более доступный материал для исследования по сравнению с тканью опухоли. Развитие данного направления представляется наиболее перспективным для реализации в клинике.

Работ посвященных корреляционной изменчивости микроРНК с учетом возраста, размеров, локализации и морфологической структуры опухоли (клеточного характера) практически нет, а в отечественной литературе публикации, посвященные изучению микроРНК у больных увеальной меланомой отсутствуют.

В связи с изложенным сформулирована цель и задачи настоящего исследования.

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

#### **Задачи исследования**

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 больных.

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.

### **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 преэкваториальной 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 веретеночлеточным типом сопровождается большей дисрегуляцией микроРНК-223 и микроРНК-27b в плазме крови больных, что подтверждает мнение о более злокачественном течении этого типа меланомы на эпигенетическом уровне.

### **Научная новизна работы**

✓ Впервые в России проведен анализ уровня экспрессии микроРНК-223, микроРНК-126, микроРНК-146a 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 работы**

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 характер лечения.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности полученных результатов обеспечивается научной постановкой цели и задач исследования, достаточной выборкой (112 пациентов), применением современных высокоинформативных методов обследования и лечения пациентов (оптическая когерентная томография, компьютерная периметрия, микропериметрия, эхобиометрия), а также статистической обработкой результатов исследования.

Проведение диссертационного исследования одобрено Комитетом по этике научных исследований РМАНПО (протокол от 20.02.2019)

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

Материалы диссертации доложены на конференциях молодых ученых РМАНПО, на международных конференциях с публикациями тезисов с результатами исследования.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

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

Основные результаты исследования включены в учебные планы циклов профессиональной переподготовки и повышения

квалификации врачей-офтальмологов по направлению «Офтальмология», раздел офтальмоонкология.

### **Публикации**

По теме диссертации 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.

**Личный вклад автора-** проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, определена степень разработанности проблемы и на основании полученных данных сформулированы цель и задачи исследования. Лично выполнено обследование и наблюдение за пациентами (до и после лечения), в том числе принимала непосредственное участие при УЗИ-исследовании больных и выполнении ПЦР на базе Научно-исследовательского института молекулярной и персонализированной медицины РМАНПО. Самостоятельно проведен анализ полученных данных и их статистическая обработка.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационное исследование «Меланома хориоидеи и микроРНК как биомаркер ее прогрессирования» соответствует направлению исследования п. № 2 «Усовершенствование известных и разработка новых методов диагностики органа зрения и его придаточного аппарата» паспорта специальности 3.1.5. Офтальмология (медицинские науки).

### **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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

В исследовании приняли участие 84 больных МХ, средний возраст  $63,4 \pm 1,2$  (35-86 лет). Толщина МХ варьировала в пределах 0,77-17,19 мм (среднее  $7,21 \pm 0,43$ ). До лечения всем пациентам проведено стандартное офтальмологическое обследование по общепринятой схеме с обязательным ультразвуковым сканированием, эхобиометрией опухолевого узла, оптической когерентной томографией, цифровым фотографированием глазного дна. С целью исключения метастазов всем больным проведено обследование органов грудной клетки и брюшной полости (компьютерная томография и магнитно-резонансная томография). Контрольную группу составили 28 волонтеров, средний возраст  $62,9 \pm 1,42$  (45 – 78 лет), не имеющих опухолевых или хронических аутоиммунных заболеваний.

С учетом проминенции опухоли больные разделены на три группы (таблица 1).

Таблица 1. Группы больных с учетом проминенции опухоли.

Группа	Проминенция МХ (мм)	Количество больных	
Начальные МХ	<b><math>2,09 \pm 0,15</math></b> 0,77- 2,8	16	Всего n=29 $3,10 \pm 0,24$ (0,77 - 4,99 мм)
Средние МХ	<b><math>4,35 \pm 0,19</math></b> 3,11 - 4,99	13	
Большие МХ	<b><math>9,38 \pm 0,41</math></b> 5,03 - 17,19	55	

Пациенты первых двух групп (n=29), имевших толщину опухоли до 5 мм, получили лучевое лечение – брахитерапию. Больным, имевшим МХ толщину более 5 мм, при условии N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> проведена энуклеация. Тип опухоли установлен при патогистологическом исследовании. Больные с большими опухолями разделены на три подгруппы, т.к. толщина опухоли имела большие колебания от 5,03 мм до 17,19 мм (таблица 2).

Таблица 2. Распределение в группе больших опухолей

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

Таким образом, все больные (84 человека) распределены по подгруппам.

### Лабораторные методы исследования

Образцы периферической крови пациентов объемом 4 мл собирали в одноразовые пробирки с антикоагулянтом этилендиаминуксусной кислотой (ЭДТА), затем центрифугировали в течение 10 минут при 2000 оборотов в минуту. По окончании центрифугирования плазму объемом 2 мл отделяли от клеточного осадка и переносили в стерильные пробирки. Выделение суммарной РНК, включая микроРНК, проводили с использованием реагента Qiazol и набора miRNeasy MiniKit (Qiagen, Хильден, Германия). Концентрацию и чистоту полученной РНК оценивали на спектрофотометре для микрообъемов Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Нью-Йорк, США). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MiScript II RTKit (Qiagen) в соответствии с рекомендованным протоколом. ПЦР в реальном времени ставилась на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Геркулес, США) Экспрессия микроРНК (x) была нормализована относительно экзогенного контроля cel-miR-39-3p и выражалась в относительных единицах, равных  $x=2^{-\Delta Ct}$ , где  $\Delta Ct$  – рабочие значения изменения цикла получения продукта относительно внутреннего контроля экспрессии микроРНК cel-miR-39-3p.

### Статистический анализ полученных результатов

Статистический анализ результатов оценивали с помощью стандартных методов статистической обработки, используя программное обеспечение Microsoft Office Excel и пакет прикладных программ «Statistica» v.13.0, StatSoftInc (США). Критический уровень значимости принимали равным 5%, отвергая нулевую гипотезу при  $p<0,05$ . Уровень экспрессии каждой микроРНК рассчитывали в процентах по отношению к контролю для каждой микроРНК. 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.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Обследование 84 больных МХ в стадии  $M_0N_0$  с использованием в качестве биомаркера в плазме крови микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-126, микроРНК-155 и микроРНК-146а показало увеличение уровня их экспрессии по сравнению с контрольной группой (таблица 3).

Таблица 3. Сравнение уровня экспрессии микроРНК в плазме крови 84 больных меланомой хориоидеи и 28 волонтеров

МикроРНК	Контроль $n=28$ (а)	пациенты $n=84$ (в)	Коэффициент (к) $k = v/a,$ %	p
223	$0,04998 \pm 0,0345$	$0,236 \pm 0,023$	$\uparrow 4,72$ <b>&gt;372%</b>	$p < 0,001$
27b	$0,000098 \pm 0,000016$	$0,000396 \pm$ $0,000035$	$\uparrow 4,04$ <b>&gt;304%</b>	$p < 0,001$
126	$0,148 \pm 0,033$	$0,318 \pm$ $0,021$	$\uparrow 2,15$ <b>&gt;115%</b>	$p < 0,001$
155	$0,039 \pm 0,007$	$0,063 \pm 0,002$	$\uparrow 1,62$ <b>&gt;62%</b>	$p < 0,001$
146a	$0,013 \pm 0,005$	$0,022 \pm 0,003$	$\uparrow 1,69$ <b>&gt;69%</b>	$p = 0,002$

Однако показатели уровня экспрессии микроРНК оказались не равнозначными. Наибольшая экспрессия характерна для микроРНК-223 и микроРНК-27b (372% и 304% соответственно). Промежуточное положение занимает микроРНК-126, экспрессия которой повышена на 115%. Незначительное повышение экспрессии (на 62% и 69%) характерно для микроРНК-155 и микроРНК-146а

Меньший уровень экспрессии (62%) отмечен по микроРНК-155, хотя ее и относят к наиболее активной при всех типах опухолей, как в ткани опухоли, так и в биологических жидкостях (Iorio M.V., Croce

С.М., 2017). По данным литературы активизацию микроРНК-155 в плазме крови наблюдали у больных как с локальным узлом УМ без метастазов, так и на фоне ее гематогенного метастазирования (Worley L.A., Long M.D., 2008). Доказано участие микроРНК-155 в клеточном и гуморальном иммунитете, но авторы осторожны в своих высказываниях, поскольку ее роль до конца не ясна (Tsitsiou E., Lindsay M.A., 2009). 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 (Yanaihara N., Caplen N. 2006; Wang H., Men C.P., 2015; El-Khazragy N., Noshi M.A., 2019). Повышение экспрессии микроРНК-146а, микроРНК-155 и микроРНК-223 в плазме крови у пациентов с УМ на момент постановки диагноза по сравнению с контролем обнаруживали и другие авторы (Achberger S., Aldrich W., Tubbs R., 2014). Что касается микроРНК-126 и микроРНК-27b, то о них пока известно немного. 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 (Meister J., Schmidt M.H.H., 2010). Есть сведения о роли микроРНК-126 в онкогенезе сквамозно-клеточного рака языка и гепатоцеллюлярного рака (Бао J., Yu Y., 2018). Более чем в 3 раза оказались увеличенными экспрессии микроРНК-27b (304%) и микроРНК-223 (372%). Таким образом, все исследованные микроРНК ответили повышенной экспрессией на фоне одиночного узла МХ. R. Zhang с соавторами оценивают микроРНК-223, как новый важный биомаркер по скринингу рака в периферической крови и тканях, но оставляют не выясненным вопрос - микроРНК-223-3р (из семейства микроРНК-223) в онкогенезе подавляется или активируется? (Zhang R., Zhang L.J., 2018). МикроРНК-27b также принимает участие в развитии и росте сквамозно-клеточного рака языка и рака яичника. Роль этих микроРНК в онкогенезе конкретно УМ не изучена. А между тем, именно эти биомаркеры показали наибольшую экспрессию при МХ у больных нашей группы. Таким образом, доказано увеличение экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-126, микроРНК-146 и микроРНК-155 в плазме крови больных на фоне одиночного узла МХ в стадии M<sub>0</sub>N<sub>0</sub>. При

проведении ROC-анализа доказано наибольшая перспективность исследования микроРНК-223 (AUC=0,934; чувствительность-93%, специфичность-99%) и микроРНК-27b (AUC=0,870; чувствительность-86%, специфичность-80%).

На 2-ом этапе исследования предстояло выяснить - влияют ли размеры МХ на экспрессию вышеперечисленных микроРНК. По степени проминенции меланомы, с учетом метрической классификации, больных разделили на традиционные 3 группы: начальные МХ - толщина до 3 мм (16 глаз); средние >3 до 5 мм (3,11 - 4,99 мм) (13 глаз) и большие толщина > 5 мм (55 глаз). Уровень экспрессии микроРНК с учетом проминенции МХ представлен на рисунке 1.

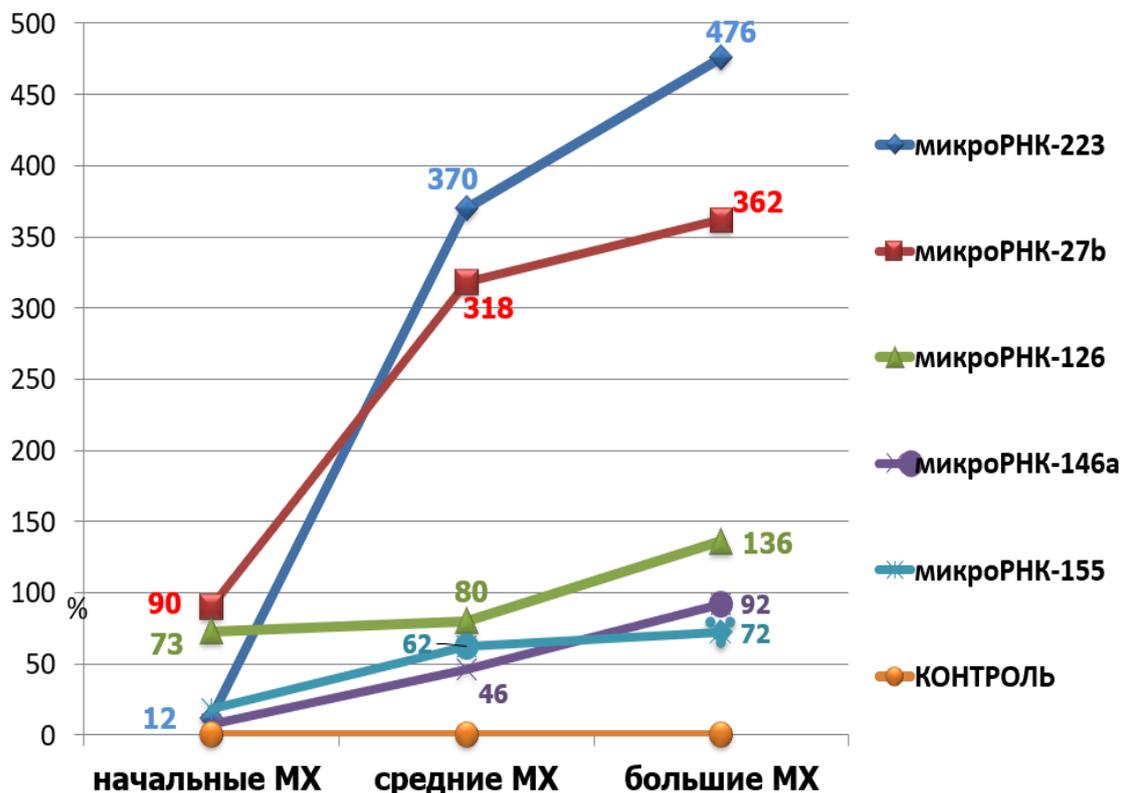


Рисунок 1. Графики распределения уровня экспрессии микроРНК (%) в зависимости от размеров меланомы хориоидеи (сравнение - контрольная группа 100%). Результаты статистически достоверны ( $p < 0,05$ ).

Большую зависимость увеличения экспрессии от начальных до больших МХ показали микроРНК-223, микроРНК-27b и микроРНК-126. Но разделив большие МХ на более мелкие группы (таблица № 4), получили достоверное подтверждение увеличения активности всех микроРНК по мере роста меланомы.

Таблица 4. Уровень экспрессии микроРНК в плазме крови 84 больных меланомой хориоидеи в зависимости от размеров опухоли

микроРНК	Контроль	Начальные МХ h=2,09±0,1 5мм (0,77 - 2,8)	Средние МХ h=4,35±0,1 9мм (3,11 - 4,99)	Большие МХ		
				h> 5 до 7 мм	h>7 до 10 мм	h>10 мм
				h=6,02±0,17 (5,03 –6,92)	h=8,5±0,25 (7,07 - 10)	h=12,5±0,4 (10,41 – 17,19)
223	0,04998± 0,0345	0,056± 0,003	0,235± 0,027	0,243±0,053	0,262± 0,059	0,341± 0,049
		↑1,12 >12% p<0,001	↑4,7 >370% p<0,001	↑4,86 >386% p<0,001	↑5,24 >424% p<0,001	↑6,82 >582% p<0,001
27b	0,000098 ±0,00001 6	0,000186±0 ,000358	0,000410± 0,000418	0,000428± 0,0000445	0,000442± 0,0000412	0,00048± 0,0000579
		↑1,90 >90% p=0,007	↑4,18 >318% p=0,017	↑4,37 >337% p<0,001	↑4,51 >351% p<0,001	↑4,90 >390% p<0,001
126	0,148± 0,033	0,256±0,04	0,266±0,05	0,270±0,01	0,339± 0,041	0,413± 0,058
		↑1,73 >73% p=0,010	↑1,79 >80% p=0,019	↑1,82 >82% p<0,001	↑2,29 >129% p<0,001	↑2,79 >179% p<0,001
155	0,039± 0,007	0,045± 0,003	0,063± 0,004	0,065±0,004	0,067± 0,003	0,069± 0,003
		↑1,18 >18% <b>p=0,180</b>	↑1,62 >62% p=0,019	↑1,67 >67% p=0,013	↑1,72 >72% p=0,003	↑1,77 >77% p=0,001
146a	0,013± 0,005	0,014± 0,005	0,019± 0,003	0,021± 0,005	0,024± 0,008	0,029± 0,005
		↑1,08 >8% <b>p=0,421</b>	↑1,46 >46% p=0,005	↑1,62 >62% p=0,017	↑1,85 >85% p=0,015	↑2,23 >123% p<0,001
Количество пациентов	28	16	13	16	17	22

\* - статистически недостоверные результаты p=0,421, p=0,180 (соответственно). Различия статистически достоверные.

Несмотря на меньшую степень увеличения экспрессии микроРНК-146а и микроРНК-155 при начальных МХ по сравнению с контрольной группой, в группе больших опухолей имеется четкая закономерность роста экспрессии данных микроРНК по мере увеличения толщины опухоли, и при МХ с проминенцией более 10 мм экспрессия микро-РНК146а увеличивается в 15,4 раза, а микроРНК-155 в 4,3 раза по сравнению с группой начальных МХ. Показательным оказался значительный рост экспрессии в группе начальных МХ по микроРНК-126 и микроРНК-27b (на 73% и 90% соответственно) по сравнению с контрольной группой. Но при больших МХ (толщиной от 10 мм и более) рост экспрессии микроРНК-126 и микроРНК-27b нарастал, и разница в уровне экспрессии по сравнению с начальными МХ составляла 2,5 и 4,3 раза (соответственно). Бóльший уровень роста экспрессии показала микроРНК-223: увеличение роста экспрессии между группами начальных и средних меланом составило 30,8 раза, а разница уровней экспрессии микроРНК начальных и самых больших меланом (от 10 мм и более по толщине) составила 48,5 раза. В целом по всей группе исследованных микроРНК (146а, 155, 223, 126 и 27b) получено достоверное увеличение уровня их экспрессии, не только обусловленное присутствием МХ, но и коррелировало с ее толщиной. ROC-анализ подтвердил эффективность анализа зависимости уровня экспрессии микроРНК от толщины опухоли. При начальных МХ: микроРНК-223 (AUC=0,929; чувствительность - 93%, специфичность-100%), при средних МХ микроРНК-223 (AUC=0,931; чувствительность -93%, специфичность-100%); при больших МХ микроРНК-223 (AUC=0,936; чувствительность -93%, специфичность-98%), при больших МХ микроРНК-27b(AUC=0,962; чувствительность -86%, специфичность-96%).

Клиницистам известно влияние локализации МХ на витальный прогноз. Более агрессивно ведет себя меланома преэкваториальной локализации и особенно при распространении на цилиарное тело (Miguel D., de Frutos-Baraja J.M., 2018). В связи с этим все 84 больных были разделены на две группы с учетом локализации опухоли: преэкваториальная локализация МХ (9 человек) и постэкваториальная (75 человек). Характер изменения экспрессии исследованных микроРНК представлен в таблице 5.

Таблица 5. Характер и уровень экспрессии микроРНК в плазме крови 84 больных меланомой хориоидеи с учетом локализации опухоли

Микро РНК	Контроль <i>n</i> =28 (а)	Постэкваториально <i>n</i> =75 (в)	Коэффициент (к) $k = \frac{b}{a}$ , %	Преэкви- ториально <i>n</i> =9 (с)	Коэффициент (к) $k = \frac{c}{a}$ , %	Различия между группами
223	0,04998± 0,0345	0,218339±0,021	> <b>336</b> p<0,01	0,380153± 0,1076	> <b>660</b> p<0,01	> <b>324</b>
27b	0,000098± 0,000016	0,000377± 0,000038	> <b>284</b> p<0,01	0,000549± 0,0000967	> <b>460</b> p<0,01	> <b>176</b>
126	0,148± 0,033	0,300498± 0,019	> <b>103</b> p<0,01	0,467± 0,117	> <b>216</b> p=0,0007	> <b>113</b>
146	0,013± 0,005	0,021± 0,003	> <b>61</b> p=0,166	0,032±0,00 94	> <b>146</b> p=0,07	> <b>85</b>
155	0,039± 0,007	0,062± 0,002	> <b>59</b> p<0,01	0,0721±0,0 04	> <b>84%</b> p=0,012	> <b>25</b>

При преэквиаториальной локализации МХ наиболее активными оказались микроРНК-223, микроРНК-27b. Изменения уровня экспрессии микроРНК-146а недостоверные. ROC-анализ подтвердил эффективность анализа изменения уровня экспрессии микроРНК в зависимости от локализации опухоли. При постэкваториальных МХ: микроРНК-223 (AUC=0,932; чувствительность -93%, специфичность-99%), микроРНК-27b (AUC=0,859; чувствительность -79%, специфичность-84%), при преэквиаториальных МХ: микроРНК-223 (AUC=0,948; чувствительность -93%, специфичность-100%), микроРНК-27b (AUC=0,964; чувствительность -86%, специфичность-100%). Таким образом, превалирование увеличения экспрессии микроРНК в плазме крови при локализации МХ в преэквиаториальной области подтверждает неблагоприятное ее влияние на течение опухолевого процесса и, следовательно, худший витальный прогноз.

Больным с большими МХ (55 человек) выполнена энуклеация. В 45 случаях выявлена веретеночлеточная меланома, в 6 – смешанного клеточного состава с преобладанием веретенообразных клеток. Эти больные составили первую группу для исследования

уровня экспрессии микроРНК. Во вторую группу вошли 4 больных с эпителиодноклеточной МХ (рисунок 2).

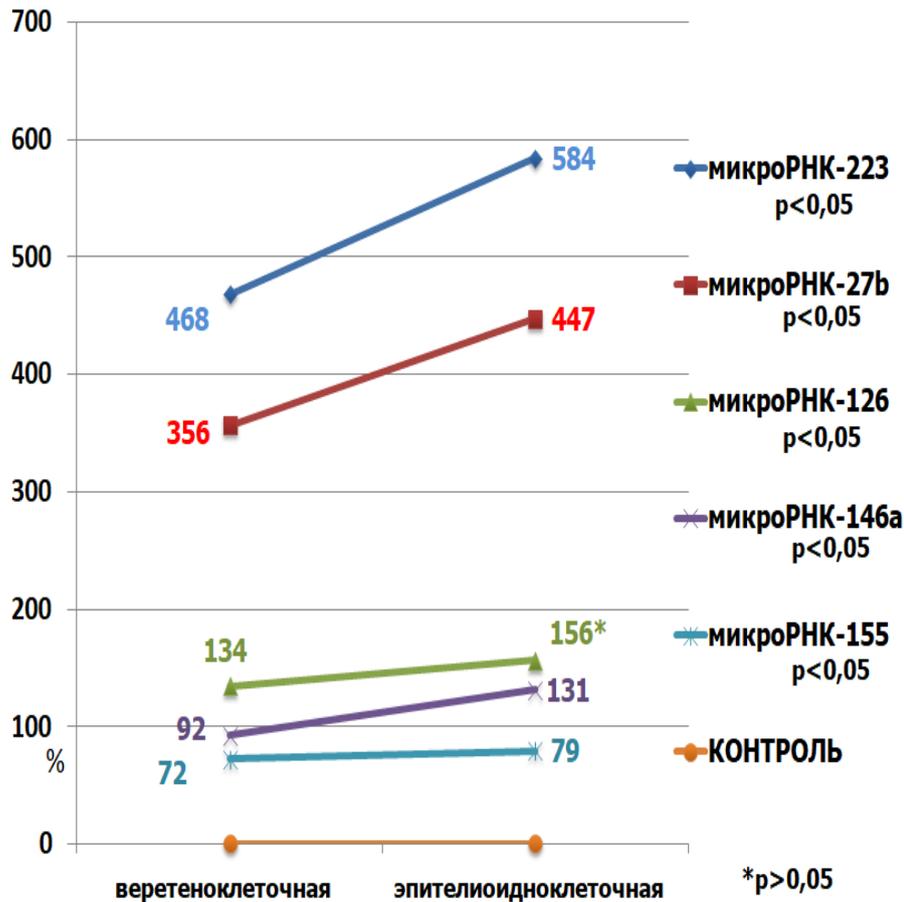


Рисунок 2. График уровня экспрессии микроРНК в плазме крови больных меланомой хориоидеи с учетом морфологического типа опухоли. Статистически достоверно, \* ( $p > 0,05$ ) недостоверные результаты.

Представленный график (рис. 2) четко демонстрирует увеличение экспрессии всех используемых микроРНК (146а, 155, 126, 27b, 223) в обеих группах и несколько бóльшее увеличение экспрессии у больных эпителиодноклеточной МХ. Процент этот варьирует от 7% до 116%, но оказалось, что уровень экспрессии микроРНК-223 при эпителиодноклеточных меланоммах превышает таковой у больных веретеноклеточной меланоммой 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: веретенноклеточная 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.

Резюмируя вышеизложенное, следует отметить, что подтвержденное увеличение уровня микроРНК-223 и микроРНК-27b в плазме крови больных МХ по нескольким параметрам опухоли (размеры, локализация и клеточная принадлежность) свидетельствует об активном участии этих микроРНК в онкогенезе МХ.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Частота меланомы хориоидеи – одной из самых злокачественных опухолей человека составляет 10 - 12 человек на 1 миллион взрослого населения (В кн. Руководство по клинической офтальмологии/Под ред. профессора А.Ф. Бровкиной, профессора Ю.С. Астахова). Существуют сложности дифференциальной диагностики начальной меланомы хориоидеи (толщиной до 3 мм) с другими заболеваниями ретинохориоидальной зоны. Имеющиеся методы исследования, такие как: биомикроофтальмоскопия, ультразвуковое исследование и оптическая когерентная томография не всегда позволяют уточнить или исключить диагноз меланомы. Метастазирует гематогенным путем, таргетный орган -печень (92-93%) (Diener-West M., 2001; Singh A.D., 2011, Dogrusöz M., 2017).

Мировая практика свидетельствует о наличии клинических факторов риска (старший возраст пациента, большие размеры опухоли, экваториальная локализация ее). 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 (Shields C.L., Kaliki S., Furuta M., 2013).

Визуализирующие методы исследования (МРТ, КТ, ПЭТ) позволяют выявлять локальный метастаз в печени с минимальным диаметром до 5 мм (Servois V., Mariani P., 2010; Orcurto V., Denysc A., 2012; Романова К.А. 2015; Bellerive C., Ouellet E., 2018).

С целью ранней диагностики возможных ранних метастазов в литературе рассматривались возможности поиска опухолевых клеток в периферической крови (Ashworth T.R., 1869; Smith B., Selby P., 1991; Callejo S.A., Antecka E., 2007), характер изменения печеночных ферментов (Einhorn L.H., Burgess M.A., 1974; Donoso L.A., Berd D., 1985), генетические изменения, такие как повреждение 3 хромосомы, изменения уровня GNAQ или GNA11 (Onken M.D., Worley L.A., 2008, Van Raamsdonk C.D., Griewank K.G., 2010, Цыганков А.Ю. Саакян С.В., Амирян А.Г., 2014, Саакян С.В., Цыганков А.Ю., Амирян А.Г., Склярова Н.В., Залетаев Д.В., 2016).

Начиная с 2008 года большую роль в развитии и прогрессировании увеальной меланомы отводят микроРНК, выделенных из ткани опухоли и ее гематогенных метастазов (Worley L.A., Long M.D., 2008). С 2012 года изучают активность микроРНК в плазме крови больных метастатической увеальной меланомой

В процессе проведенного исследования изучена офтальмоскопическая картина 84 больных меланомой хориоидеи при размерах опухолевого узла по толщине от 0,77 мм до 17,19 мм и исследован уровень микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-126, микроРНК-146a и микроРНК-155 в плазме крови. Из перечисленных выше микроРНК положительную оценку по данным литературы получили микроРНК-146a, микроРНК-155 и микроРНК-223, повышенный уровень экспрессии которых по мнению авторов свидетельствовал о метастазировании процесса. МикроРНК-27b использован нами впервые в оценке опухолевого процесса у больных меланомой хориоидеи. В целом у всех 84 больных меланомой хориоидеи в стадии N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> отмечено повышение уровня экспрессии микроРНК в плазме крови больных. При этом самый высокий уровень экспрессии в плазме крови больных меланомой имели микроРНК-223, микроРНК-27b, промежуточное положение - микроРНК-126. Наименьший уровень экспрессии наблюдали при исследовании микроРНК-155 и микроРНК-146a.

Статистически доказано увеличение экспрессии микроРНК-223, микроРНК-126 и микроРНК-27b в плазме крови у больных с начальными МХ (n=16) на 12%, 73% и 90% соответственно по

сравнению с контролем. Увеличения размеров меланомы от начальных до больших сопровождается увеличением экспрессии микроРНК в целом от 2 (1,9) до 40 (39,7) раз.

Анализ уровня повышения экспрессии вышеперечисленных микроРНК с учетом локализации меланомы свидетельствует о наиболее активной реакции микроРНК-223, микроРНК-27b, при расположении опухолевого узла преэкваториально. Превалирование увеличения экспрессии микроРНК в плазме крови при локализации МХ в преэкваториальной области подтверждает неблагоприятное ее влияние на течение опухолевого процесса и, следовательно, витальный прогноз.

Изучены особенности экспрессии микроРНК-146a, микроРНК-155, микроРНК-223, микроРНК-27b и микроРНК-126 с учетом морфологического строения меланомы хориоидеи у 55 больных до энуклеации. Патоморфологически выявлена веретенноклеточная меланома (45 глаз), меланома смешанного типа с преобладанием веретенообразных клеток (6 глаз) и эпителиоидноклеточная меланома (4 глаза). С учетом превалирования в группе смешанноклеточных меланом, по данным патоморфологического исследования, веретеновидных клеток, все опухоли разделены на 2 группы: веретенноклеточные и эпителиоидноклеточные. Больше увеличение экспрессии микроРНК (146a, 155, 126, 27b, 223) имела место в группе эпителиоидноклеточной меланомы (от 7 до 116%,  $p < 0,05$ ).

Заключая в целом, можно утверждать, что подтверждена перспективность исследования уровня экспрессии циркулирующих в плазме крови микроРНК-223 и микроРНК-27bc целью уточненной диагностики меланом хориоидеи. Впервые показана целесообразность исследования уровня экспрессии микроРНК-27b в плазме крови в уточненной диагностике меланомы хориоидеи. Подтверждено достоверное увеличение уровня экспрессии микроРНК-27b, микроРНК-126 и микроРНК-223 в плазме крови больных МХ на ранних стадиях развития одиночного узла опухоли (минимальная проминенция 0,77 мм). Есть основание утверждать, что статистически доказанное увеличение экспрессии микроРНК в плазме крови больных МХ на фоне увеличения размеров опухоли является опосредованным признаком скрытого метастазирования.

## 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 преэкваториально 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 веретенноклеточным 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 работ, опубликованных по теме диссертации**

По теме диссертации 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. Цыбикова Н.Д. МикроРНК в офтальмологии/ Бровкина А.Ф., Яровая Г.А., Цыбикова Н.Д.//Офтальмология. 2021;18(2):188–197, ИФ - 0,665**

**2. Цыбикова Н.Д. МикроРНК-146а-предиктор развития метастазов меланомы хориоидеи/Бровкина А.Ф., Цыбикова Н.Д.//Точка зрения. Восток-Запад. 2021;1:13-16.**

**3. Цыбикова Н.Д. МикроРНК в уточнённой диагностике меланомы хориоидеи/ Бровкина А.Ф., Цыбикова Н.Д.// Acta biomedica scientifica. 2021; 6(6-1): 65-73, ИФ – 0,326**

**4. Цыбикова Н.Д. МикроРНК — биомаркер агрессивности меланомы хориоидеи/ Бровкина А.Ф., Цыбикова Н.Д.// Российский офтальмологический журнал. 2022; 15 (1): 7-12, ИФ - 0,633**

**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/НН.2021.9.2 (Suppl.):1–176**

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

УМ	увеальная меланома
МХ	меланома хориоидеи
РНК	рибонуклеиновая кислота
мРНК	матричная РНК
ПЦР	полимеразная цепная реакция
C <sub>q</sub>	значение порогового цикла ПЦР реакции
dC <sub>q</sub>	значение разницы пороговых циклов ПЦР реакций
НЭ	нейроэпителий
ОКТ	оптическая когерентная томография
ОНЭ	отслойка нейроэпителия
ПЭ	пигментный эпителий
УЗИ	ультразвуковое исследование
ФАГ	флюоресцентная ангиография