



Оригинальная статья

Выживаемость больных увеальной меланомой в отдаленные сроки после энуклеации в зависимости от молекулярно-генетических aberrаций

Нероев В.В.¹ • Саакян С.В.¹ • Амирян А.Г.¹ • Цыганков А.Ю.¹ • Бурденный А.М.² • Логинов В.И.² • Хлгатян М.Р.¹

Нероев Владимир Владимирович – д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, директор¹

Саакян Светлана Владимировна – д-р мед. наук, профессор, начальник отдела офтальмоонкологии и радиологии¹

Амирян Ануш Гамлетовна – канд. мед. наук, вед. науч. сотр. отдела офтальмоонкологии и радиологии¹
✉ 105062, г. Москва, ул. Садовая-Черногрозская, 14/19, Российская Федерация. Тел.: +7 (495) 608 41 44. E-mail: amiryan@yandex.ru

Цыганков Александр Юрьевич – канд. мед. наук, мл. науч. сотр. отдела офтальмоонкологии и радиологии¹

Бурденный Алексей Михайлович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики²

Логинов Виталий Игоревич – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики²

Хлгатян Мариам Рубеновна – врач-офтальмолог, аспирант отдела офтальмоонкологии и радиологии¹

Актуальность. В последние годы при прогнозировании течения увеальной меланомы (УМ) большое значение приобретают молекулярно-генетические прогностические факторы. В клинической практике молекулярно-генетические методы используют для выявления пациентов с высоким риском развития метастазов. **Цель** – определить выживаемость больных УМ после энуклеации в зависимости от молекулярно-генетических aberrаций. **Материал и методы.** Обследованы и пролечены 30 больных УМ в возрасте от 23 до 83 лет. Во всех случаях проведена энуклеация. Удаленные глаза подверглись морфологическому, молекулярно-генетическому и цитогенетическому анализу (потеря гетерозиготности на хромосомах 1, 3 и 8, метилирование гена *RASSF1A*, мутации в генах *GNAQ/11*, полиморфизм гена *ABCB1*). Медиана наблюдения составила 61 месяц. **Результаты.** Кумулятивная трехлетняя доля выживших больных УМ была $77,8 \pm 8\%$, а пятилетняя – $63 \pm 9\%$. Средние значения времени выживания составили $52,8 \pm 3,9$ месяца. Больные с моносомией хромосомы 3 демонстрировали значимо более низкие показатели пятилетней выживаемости, чем больные с частичной моносомией и без потери гетерозиготности в хромосоме 3 (лог-ранк тест, $\chi^2 = 14,111$, $p = 0,001$). Потеря гетерозиготности на хромосомах 1 и 8, метилирование гена *RASSF1A*, мутации в генах *GNAQ/11* и полиморфизм гена *ABCB1* не были ассоциированы

с худшим витальным прогнозом. **Заключение.** Молекулярно-генетические aberrации играют важную роль в прогнозировании течения опухолевого процесса и определении риска гематогенного метастазирования у больных УМ. Доказана значимая роль выявления моносомии хромосомы 3. В связи с относительно малой выборкой (30 пациентов), а также наличием временного фактора (анализ пятилетней выживаемости) роль других молекулярно-генетических изменений не подтверждена, что требует оценки не только генетических, но и клинико-эхографических и морфологических прогностических факторов.

Ключевые слова: увеальная меланома, генетика, выживаемость, молекулярно-генетические изменения, моносомия хромосомы 3, делеция хромосомы 1, делеция хромосомы 8, метилирование гена *RASSF1A*, мутации генов *GNAQ/GNA11*, полиморфизм гена *ABCB1*

Для цитирования: Нероев ВВ, Саакян СВ, Амирян АГ, Цыганков АЮ, Бурденный АМ, Логинов ВИ, Хлгатян МР. Выживаемость больных увеальной меланомой в отдаленные сроки после энуклеации в зависимости от молекулярно-генетических aberrаций. Альманах клинической медицины. 2018;46(4):338–46. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-4-338-346.

Поступила 07.05.2018;
принята к публикации 18.06.2018

¹ ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Минздрава России; 105062, г. Москва, ул. Садовая-Черногрозская, 14/19, Российская Федерация

² ФГБУН «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8, Российская Федерация



В последние годы при прогнозировании течения увеальной меланомы (УМ) большое значение приобретают молекулярно-генетические прогностические факторы. Необходимо учитывать, что УМ – не моногенное, а мультифакторное заболевание со сложным молекулярным строением. В клинической практике молекулярно-генетические методы используют для выявления пациентов с высоким риском развития метастазов [1, 2]. Несмотря на возможность достижения хорошего локального контроля опухоли в краткосрочном и среднесрочном, а в ряде случаев и в долгосрочном периоде наблюдения, частота метастазирования остается около 50% через 5 лет независимо от проведенного лечения [3]. Эффективное лечение метастатической УМ также весьма ограничено [4].

Выявление микрометастазов на ранних стадиях и определение правильной тактики ведения пациентов – одна из важнейших задач офтальмоонкологии. Для прогнозирования течения заболевания были определены некоторые клинические, гистологические и генетические факторы, важнейшими из которых принято считать полную потерю одной копии (моносомию) 3-й хромосомы и специфический набор генов опухоли [5, 6]. При этом данные критерии необходимы не только для более точной диагностики и прогнозирования течения заболевания, но и для отбора пациентов для адьювантной терапии и контроля за циркулированием опухолевых клеток. Следует отметить, что специфические опухолевые маркеры, такие как *GNAQ/GNA11* или *BAP1*, могут служить мишенями для селективной терапии, затрагивающей специфические сигнальные пути развития опухоли [7].

Цель исследования – определить выживаемость больных УМ после энуклеации в зависимости от молекулярно-генетических aberrаций.

Материал и методы

В рамках проспективного исследования с марта по декабрь 2012 г. обследованы и пролечены 30 больных УМ в возрасте от 23 до 83 лет (средний возраст $51,3 \pm 12$ лет), в том числе 18 (60%) женщин и 12 (40%) мужчин. Диагноз УМ устанавливали на основании клинико-инструментальных методов и подтверждали при патоморфологическом исследовании. Всем больным проводили комплексное офтальмологическое обследование, включавшее визометрию, тонометрию, компьютерную периметрию, биомикроскопию, офтальмоскопию, эхографию с регистрацией показателей кровотока в опухоли, по показаниям оптическую

когерентную томографию, флюоресцентную ангиографию, компьютерную томографию органов брюшной полости и рентгенографию органов грудной клетки для исключения отдаленных метастазов. По данным ультразвукового сканирования проминенция УМ варьировала от 2,6 до 13,8 мм (в среднем – $8,6 \pm 2,9$ мм), диаметр основания был от 8,2 до 21,9 мм (в среднем – $15 \pm 3,4$ мм). Во всех случаях проведена энуклеация пораженного глаза с морфологическим и молекулярно-генетическим исследованием, что стало основным критерием соответствия и включения в исследование. Критерием исключения было отсутствие данных динамического наблюдения за больными.

Все клинико-морфологические исследования проведены на базе ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России, молекулярно-генетические – на базе лаборатории молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (заведующий лабораторией – д-р биол. наук, профессор В.В. Носиков). От всех больных получено добровольное информированное согласие на медицинские процедуры и включение данных в последующий анализ.

По данным патогистологического исследования веретенноклеточный тип меланомы установлен у 16 (53,3%) больных, смешанноклеточный тип – у 9 (30%) и эпителиоидноклеточный – у 5 (16,7%).

Для выявления мутации в генах *GNAQ/GNA11* и полиморфизма гена *ABCBI/MDR1* применяли метод определения полиморфизма длины рестриктазных фрагментов (ПДРФ-анализ). Использованы нуклеотидные последовательности праймеров, описанные нами ранее [8, 9]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 60 мМ Трис-НСl, рН 8,9, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 25 мМ КCl, 0,1% Тритон X-100; 0,25 мМ каждого dNTP; 1–10 нг ДНК; 25 пмоль каждого праймера; 2,0 ед. Таq-полимеразы («СибЭнзим», Россия); MgCl₂ в концентрации 2,0 мМ. Амплификацию проводили по следующей программе: 95 °С, 1 мин 30 с; 35 циклов 92 °С, 15 с; 60 °С, 20 с; 72 °С, 15 с; 72 °С, 1 мин 30 с, на амплификаторе Терцик (Россия). Далее амплифицированный фрагмент ДНК подвергали обработке соответствующей рестриктазой. Проверка полноты расщепления ДНК рестриктазами осуществлялась путем расщепления 1 мкг фага лямбда за 1 час. Для продукта амплификации использовали трехкратное

количество фермента. При наличии мутантного *TT* генотипа амплифицируемый в ходе ПЦР фрагмент гена *ABCB1* размером 206 п.н. гидролизует-ся рестриктазой *PstI* на два фрагмента – 143 п.н. и 63 п.н. В гетерозиготном генотипе гена *ABCB1* – *CT* присутствуют все 3 фрагмента. Результаты ПДРФ анализировали электрофоретически в 10% полиакриламидном геле с добавлением бромистого этидия (0,5 мкг/мл) и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете.

Для анализа аллельных делеций были использованы микросателлитные маркеры и праймеры, описанные ранее [5]. Панель включала ди-, три- и тетрамерные высокополиморфные локусы, выбранные из базы данных CHLC (Cooperative Human Linkage Center) и GDB (Genome Data Base). Перед проведением анализа ДНК была выровнена. Различие в концентрациях образцов внутри пары составляло не более 5%. ПЦР проводили аналогично описанному выше. Продукты ПЦР разделяли электрофоретически в вертикальном блоке 10–12% полиакриламидного геля в 1×TBE буфере при напряженности электрического поля 15 В/см. В качестве маркеров использовали ДНК плазмиды pUC19, расщепленную рестриктазой *MspI*, а также маркер с шагом 100 п.н. (100 bp DNA ladder). Полиакриламидные гели окрашивали в растворе, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Картины электрофоретического разделения геномной ДНК наблюдали и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. Потерю гетерозиготности выявляли при анализе разделенных в полиакриламидном геле продуктов ПЦР, проведенного на препаратах ДНК, выделенных из опухолевого материала и контрольной (нормальной) ткани. При анализе потери гетерозиготности сравнивали интенсивность аллелей высокого и низкого молекулярного веса в соответствующих парах опухоль / норма. Случаи с уменьшением интенсивности одного из аллелей на 50% и более рассматривали как потерю гетерозиготности.

Анализ статуса метилирования промоторных районов гена *RASSF1A* проводили методом метилчувствительного рестрикционного анализа, основанного на способности метилчувствительных эндонуклеаз рестрикции оставлять негидролизованной участки ДНК, содержащие 5-метилцитозин вместо цитозина. ДНК последовательно инкубировали с *HpaII* (CCGG) и *HhaI* (GCGC), метилчувствительными рестриктазами и *MspI* (CCGG), метилнечувствительной рестриктазой, и полученные фрагменты использовали в качестве матрицы для ПЦР. Расщепление ДНК при 37 °С рестриктазами *HhaI*, *HpaII* и *MspI* проводили

в буфере *Y* (“*MBI Fermentas*”). В качестве контроля сохранности ДНК (*K2*) использовали продукт ПЦР фрагмента экзона 1 гена *RARβ2* (229 п.н.), так как этот фрагмент не содержит участков узнавания указанных рестриктаз. Полноту расщепления образцов ДНК ферментами проверяли с помощью амплификации фрагмента гена β -3А-адаптина (445 п.н.) (*K1*), который содержит неметилированные участки узнавания рестриктаз *HpaII*, *HhaI* (как в норме, так и в опухоли). Праймеры и условия ПЦР описаны нами ранее [10]. ПЦР проводили аналогично описанному выше. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле.

Динамическое наблюдение пациентов проводили на базе ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России, а также у офтальмолога и онколога по месту жительства пациентов. Продолжительность исследования составила 5 лет – с января 2013 по январь 2018 года. Контрольные осмотры пациентов проводили каждые 6 месяцев: очный осмотр пациентов для исключения рецидива опухоли в орбите после энуклеации (биомикроскопия, эхография и компьютерная томография полости удаленного глаза), а также контроль состояния органов-мишеней для исключения генерализации процесса (эхография или компьютерная томография органов брюшной полости, рентгенография органов грудной клетки). При неявке больного на назначенный осмотр проводили запрос данных о состоянии здоровья и/или причине смерти по месту жительства. Основной исход исследования – ассоциация выживаемости пациентов с изучаемыми молекулярно-генетическими изменениями, что оценивали методами анализа медицинской документации по месту жительства пациентов или данных собственного динамического наблюдения.

Настоящее исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России (протокол № 8 от 24.02.2012).

Медиана наблюдения составила 61 (95% доверительный интервал (ДИ) 23,5–67) месяц. За данный период наблюдения 10 человек (1/3) погибли от метастатической болезни.

Для обработки все полученные данные были преобразованы в электронные таблицы в форматах Excel и SPSS (Statistical Package for the Social Science). Статистический анализ проводили в пакетах программы Microsoft Windows 7, IBM SPSS Statistics 23.0. Размер выборки предварительно не рассчитывался. Рассчитывались средние значения, стандартные (средние квадратичные) отклонения, медианы, 25 и 75-й процентиля, максимальные и минимальные



значения; для определения вероятности развития события в процессе наблюдения применяли метод Каплана – Мейера; с помощью лог-ранк теста (χ^2 , логарифмический ранговый тест) определяли различия развития события в двух и более исследуемых группах больных.

Результаты

Анализ выживаемости показал, что кумулятивная трехлетняя доля выживших больных УМ составила $77,8 \pm 8\%$, а пятилетняя – $63 \pm 9\%$. При этом средние значения времени выживания были $52,8 \pm 3,9$ (95% ДИ 50,5–65,9) месяца.

Анализ выживаемости больных в зависимости от статуса хромосомы 3 дал следующие результаты: больные с моносомией хромосомы 3 демонстрировали значимо более низкие показатели пятилетней выживаемости, чем больные с частичной моносомией и без потери гетерозиготности в хромосоме 3 (лог-ранк тест, $\chi^2 = 14,111$, $p = 0,001$) (рис. 1). Всего полную моносомию хромосомы 3 определяли у 12 пациентов.

Потеря гетерозиготности в хромосоме 1p выявлена у 9 больных УМ, 4 из которых погибли от отдаленных метастазов. У остальных 6 погибших больных изменений статуса хромосомы 1p не выявлено. Кумулятивная доля выживших больных без потери гетерозиготности хромосомы 1p через 5 лет динамического наблюдения составила $66,7 \pm 11\%$, у больных с потерей гетерозиготности в хромосоме 1p – $50 \pm 18\%$. При этом средние значения времени выживания у больных без потери гетерозиготности хромосомы 1p и с таковой были $60,1 \pm 3,13$ (95% ДИ 54–66,2) и $44,8 \pm 8,8$ (95% ДИ 27,4–62,1) месяца соответственно. Анализ результатов выживаемости больных УМ с потерей гетерозиготности хромосомы 8p и без таковой показал, что кумулятивная доля выживших при пятилетнем наблюдении у больных без потери гетерозиготности хромосомы 8p составила $63,6 \pm 0,1\%$, а у больных с потерей гетерозиготности – $50,5 \pm 0,25\%$. При анализе средних значений времени выживания оказалось: у больных без потери гетерозиготности хромосомы 8p этот показатель равнялся $56,1 \pm 4,2$ (95% ДИ 47,9–64,3) месяца, тогда как у больных с потерей гетерозиготности – $53,3 \pm 8,8$ (95% ДИ 36–70,5) месяца. Рис. 2 демонстрирует графики выживаемости больных с учетом наличия или отсутствия потери гетерозиготности хромосомы 1p (рис. 2А) и хромосомы 8p (рис. 2Б).

Метилирование промоторных районов гена *RASSF1A* в УМ удалось выявить у 8 (26,7%) из 30 больных, при этом частота его зависела от

клинико-патоморфологических особенностей УМ. В частности, выявлена большая ассоциация частоты метилирования гена *RASSF1A* у больных с веретенноклеточным типом УМ ($p < 0,05$). Из 10 погибших от метастазов метилирование гена *RASSF1A* имело только у 3 больных. Накопленная доля выживших при пятилетнем наблюдении у больных с наличием метилирования гена *RASSF1A* составила $62,5 \pm 17\%$, а у больных с отсутствием метилирования гена *RASSF1A* – $63,2 \pm 11\%$ ($p > 0,05$). Как видно на рис. 3, график выживаемости демонстрирует схожие кривые выживаемости в сравниваемых группах больных.

При проведении ПДРФ-анализа мутации в генах *GNAQ* и *GNAI1* выявлены в большинстве исследуемых препаратов (27 больных, 90%). Из 12 больных УМ с наличием мутации в гене *GNAQ* (*Arg183*) от метастатической болезни погибли 4 человека, из 18 больных без мутаций в гене *GNAQ* (*Arg183*) – 6 человек. Кумулятивная доля выживших при пятилетнем периоде наблюдения у больных без мутации гена *GNAQ* (*Arg183*) составила $64,7 \pm 12\%$, тогда как у больных с мутацией данного гена этот показатель оказался ниже и был $55,6 \pm 17\%$. Схожие результаты получены и у больных с мутацией в 5-м экзоне (*Gln209*) гена *GNAQ*. В группе больных с отсутствием мутации гена *GNAQ* (*Gln209*) 8 человек погибли от метастатической болезни, в группе больных с выявленной мутацией в данном экзоне погибли двое. При этом кумулятивная доля выживших при отсутствии мутации в гене *GNAQ* (*Gln209*) была $63,6 \pm 10\%$, в то время как у больных с мутацией в означенном экзоне этот показатель составил $50 \pm 25\%$. При отсутствии мутации в гене *GNAQ*

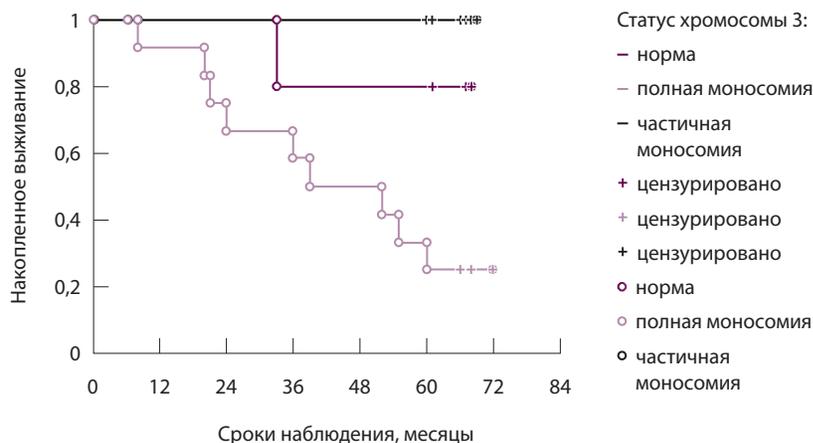


Рис. 1. Выживаемость больных увеальной меланомой в зависимости от фактора потери гетерозиготности в хромосоме 3 (метод оценок Каплана – Мейера)

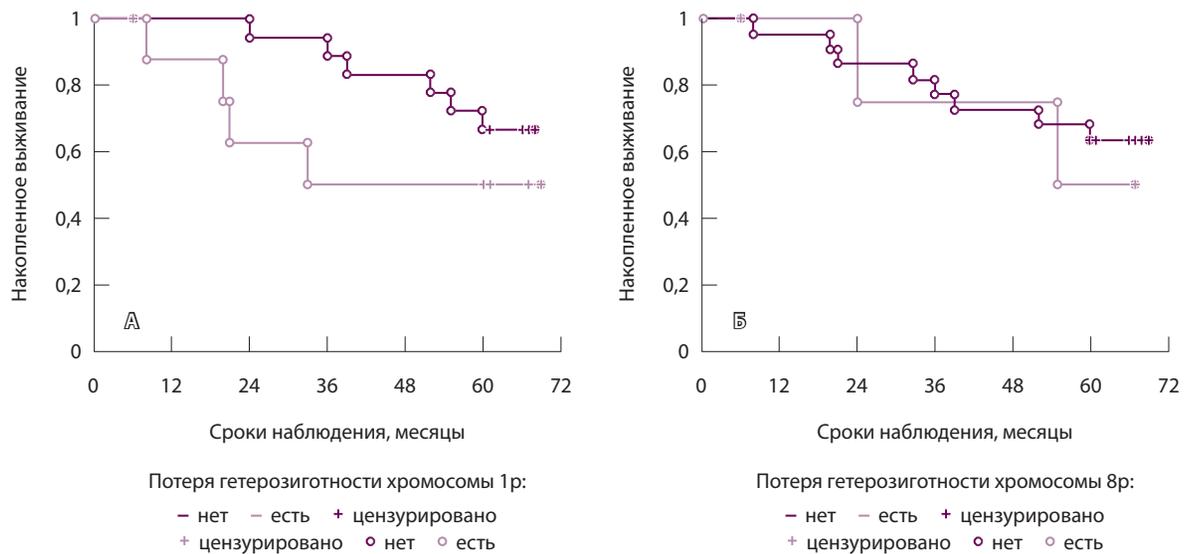


Рис. 2. Выживаемость больных увеальной меланомой в зависимости от фактора потери гетерозиготности в хромосоме 1p (А) (метод оценок Каплана – Мейера, лог-ранк тест, $\chi^2 = 1,546$, $p > 0,05$) и в хромосоме 8p (Б) (метод оценок Каплана – Мейера, лог-ранк тест, $\chi^2 = 0,174$, $p > 0,05$)

(*Gln209*) получены следующие средние значения для времени выживания: $54,6 \pm 4,4$ (95% ДИ 46–63,2) месяца, у больных с наличием мутации – $62,2 \pm 3,3$ (95% ДИ 55,5–68,5) месяца. Анализ выживаемости не выявил значимых сторонних различий в кривых выживаемости у больных с мутациями гена *GNAQ* (рис. 4).

Мутации гена *GNA11* (*Gln209*) установлены у половины (15 из 30) исследованных больных УМ. В группе больных без мутаций гена *GNA11* (*Gln209*) от отдаленных метастазов погибли 7 из 15 человек, в группе больных с мутацией данного гена – 3 из 15. Накопленная доля выживших у больных в группе без мутации гена *GNA11*

(*Gln209*) составила $46,2 \pm 13,8\%$, а в группе больных с мутацией данного гена – $76,9 \pm 11,7\%$. При этом средние значения для времени выживания были $53,2 \pm 4,8$ (95% ДИ 43,7–62,6) против $58,1 \pm 5,7$ (95% ДИ 46,8–69,3) месяца.

Накопленные доли выживших при пятилетнем наблюдении у больных с генотипом *CC* и *CT* полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* оказались практически одинаковы: $62,5 \pm 12$ и $60 \pm 15\%$ соответственно. При этом медиана выживаемости больных УМ с генотипом *CC* составила $56,6 \pm 4,2$ (95% ДИ 48,4–64,8) месяца, а с генотипом *CT* – $53,3 \pm 7,1$ (95% ДИ 39,7–67,5) месяца. Таким образом, не выявлено статистически значимых различий в пятилетней выживаемости больных в зависимости от генотипа *CC* и *CT*.

Обсуждение

В клетках УМ определяют хромосомные изменения, обладающие значимой прогностической ценностью у данной группы пациентов [1]. Показано, что полная потеря хромосомы 3 (моносомия хромосомы 3) ассоциирована со снижением пятилетней выживаемости от примерно 100% до менее 50% из-за метастазов в печень [11, 12].

Кроме того, удвоение длинного плеча хромосомы 8 (полисомия 8q) и потеря короткого плеча хромосомы 1 (моносомия 1p) достоверно коррелируют со снижением выживаемости. В одном из исследований моносомия 3 и полисомия 8q приводили к сопоставимому уменьшению выживаемости пациентов [2]. При их сочетании отмечено

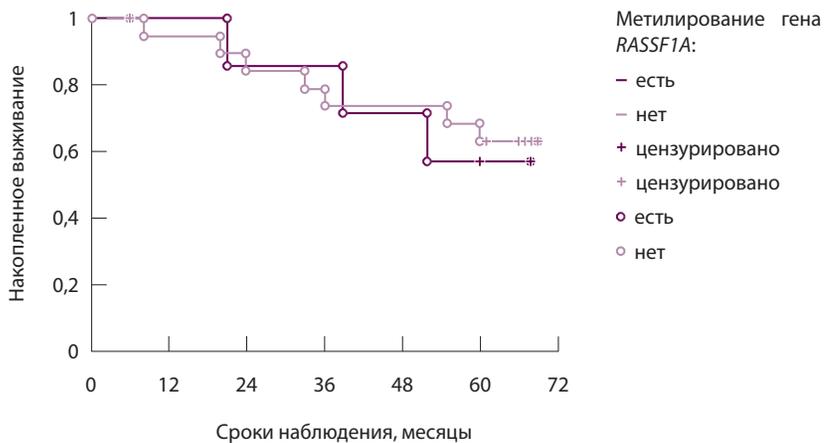


Рис. 3. Выживаемость больных увеальной меланомой в зависимости от наличия и отсутствия метилирования промоторного района гена *RASSF1A* (метод оценок Каплана – Мейера, лог-ранк тест, $\chi^2 = 0,052$, $p > 0,05$)



снижение пятилетней выживаемости до 30%. Вместе с тем и моносомия 3, и полисомия 8q связаны с другими прогностическими признаками, в частности, с большими размерами опухоли, вовлечением цилиарного тела, наличием эпителиоидных клеток, большим числом митозов и PAS-позитивными замкнутыми контурами [12, 13].

Аналогичные результаты описаны другими авторами. По данным М. Dogrusöz и соавт. [14], при опухолях I стадии, согласно классификации AJCC (American Joint Committee on Cancer), смертность от метастатической болезни зарегистрирована только у пациентов с моносомией хромосомы 3 и удвоением хромосомы 8q ($p < 0,001$). Среди пациентов с УМ II и III стадий худший витальный прогноз был при сочетании моносомии хромосомы 3 и удвоения хромосомы 8q, в то время как клинические результаты лечения при наличии хотя бы одной из указанных аберраций были более благоприятными ($p < 0,001$). Для пациентов без моносомии хромосомы 3 и удвоения хромосомы 8q отмечен лучший витальный прогноз вне зависимости от стадии заболевания. В случае моносомии хромосомы 3, удвоения хромосомы 8q или их сочетания анализ витального прогноза с учетом стадии опухоли по классификации AJCC имеет большую предиктивную значимость. Согласно данным мультивариабельного регрессионного анализа, определение стадии заболевания по AJCC и статуса хромосомы 3 и 8q имеет независимую прогностическую ценность в отношении витального статуса у больных УМ [14]. В исследовании С.Л. Shields и соавт. [15] риск метастазирования при УМ ассоциирован с индивидуальным цитогенетическим профилем, при этом пятилетняя выживаемость варьирует от 96% при наличии дисомии хромосом 3, 6 и 8 до 61% среди пациентов с полной моносомией хромосомы 3, дисомией хромосомы 6 и удвоением хромосомы 8q.

В настоящей работе мы изучали статус хромосом 1, 3 и 8 в группе пациентов с УМ. Нам не удалось подтвердить роль делеций хромосом 1 и 8 в витальном статусе больных УМ. Статистически значимые различия получены только для моносомии хромосомы 3.

Помимо хромосомных аберраций в ряде работ определена роль метилирования промоторного района гена-супрессора опухолевого роста *RASSF1A*, локализованного на 3-й хромосоме, при УМ [10, 16]. Так, С.В. Саакян и соавт. на 30 образцах УМ показали значение данной аберрации как благоприятного прогностического фактора,

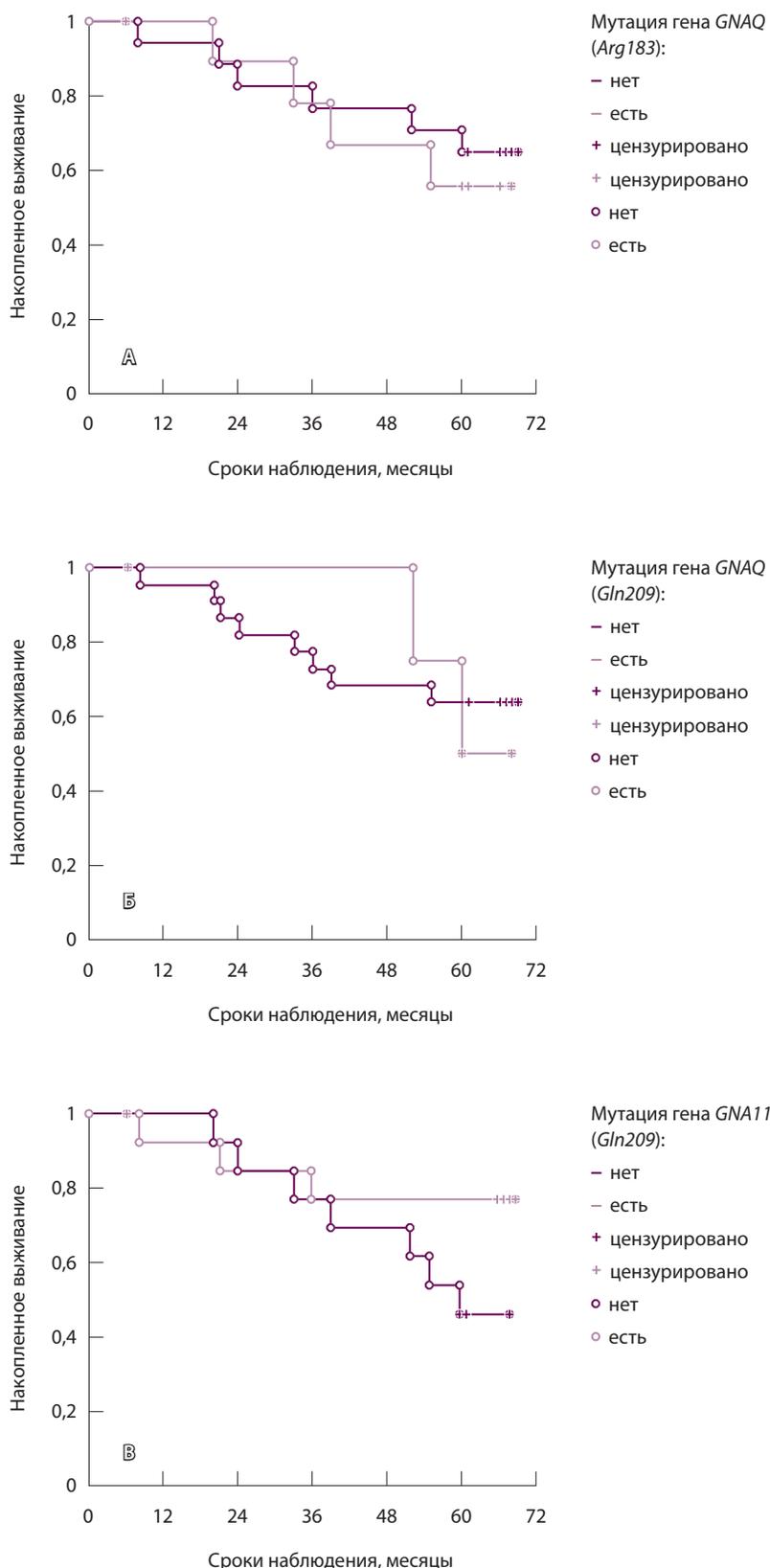


Рис. 4. Выживаемость больных увеальной меланомой в зависимости от наличия мутаций в генах *GNAQ* (А, Б) и *GNA11* (В) (метод оценок Каплана – Мейера, лог-ранк тест, $p > 0,05$)

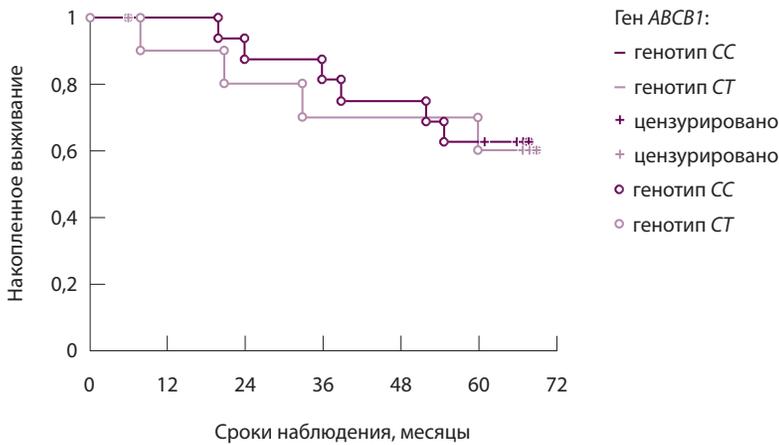


Рис. 5. Выживаемость больных увеальной меланомой в зависимости от генотипа *CT* и *CC* полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1* (метод оценок Каплана – Мейера, лог-ранк тест, $\chi^2 = 0,043$, $p > 0,05$)

ассоциированного с лучшим клиническим течением заболевания [10]. Однако анализ долгосрочной (5 лет и более) выживаемости не выявил статистически значимых различий между пациентами с метилированием гена *RASSF1A* и без такового.

Мутации в генах *GNAQ* или *GNA11*, кодирующих альфа-субъединицу G-белков, обнаружены в 86–89% первичных увеальных меланом [17, 18]. Частота мутаций в генах *GNAQ/GNA11* в УМ, локализованных в хориоиде, цилиарном теле или имеющих иридоцилиохориоидальную локализацию, составляет 90% [8]. Изменения в генах *GNAQ/GNA11* описаны как миссенс-мутации (единичные аминокислотные замены) в кодоне 183 (экзон 4) и 209 (экзон 5) соответственно. Выявление мутаций в генах *GNAQ/GNA11* в доброкачественных невусах хориоидеи, включая меланоцитомы [19], и большинстве УМ независимо от витального прогноза свидетельствует о возможной триггерной роли данной аберрации в развитии УМ [20].

Определение данных мутаций, характерных именно для первичных УМ, позволяет дифференцировать метастазы УМ от других первичных опухолей. Вместе с тем в большинстве работ не установлено взаимосвязи выявленных мутаций

с витальным прогнозом [19, 20]. В нашем исследовании мы также не выявили ассоциации мутаций в генах *GNAQ/GNA11* с витальным прогнозом.

За последние годы описан целый ряд дополнительных генетических изменений, связанных с развитием и прогрессированием УМ. В частности, определено место генотипов *CC* и *CT* полиморфного маркера *C3435T* гена *ABCB1/MDR1*, кодирующего транспортный белок, гликопротеин P, играющий ключевую роль в выведении целого ряда лекарственных веществ (в том числе препараты, применяемые при лечении УМ). В работе *in vivo* выявлена высокая частота встречаемости предрасполагающих аллелей и генотипов полиморфного маркера *ABCB1/MDR1* у больных УМ и показана ассоциация генотипа *CC* с высотой опухоли, беспигментными формами УМ, состоянием сосудов и неблагоприятными гистологическими типами опухоли [9]. В настоящей работе нам не удалось подтвердить взаимосвязь генотипа *CC* указанного гена с худшим витальным прогнозом. Полагаем: отсутствие ассоциации обусловлено как небольшой выборкой пациентов (30 человек), что представляется недостаточным для оценки роли полиморфизма гена *ABCB1/MDR1*, так и ролью временного фактора. В нашем исследовании мы оценивали пятилетнюю выживаемость у 30 пациентов, и, возможно, с увеличением выборки и сроков наблюдения данные о роли полиморфизма гена *ABCB1/MDR1* будут иными.

Заключение

Молекулярно-генетические аберрации имеют большое значение при прогнозировании течения опухолевого процесса и определении риска гематогенного метастазирования у больных УМ. Доказана значимость выявления моносомии хромосомы 3. В связи с относительно малой выборкой (30 пациентов), а также наличием временного фактора (анализ пятилетней выживаемости) роль других молекулярно-генетических изменений не подтверждена, что требует оценки не только генетических, но и клиничко-эхографических и морфологических прогностических факторов. ©

Конфликт интересов

Авторы статьи заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Литература

- Coupland SE, Lake SL, Zeschnigk M, Damato BE. Molecular pathology of uveal melanoma. *Eye (Lond)*. 2013;27(2):230–42. doi: 10.1038/eye.2012.255.
- Caines R, Eleuteri A, Kalirai H, Fisher AC, Heimann H, Damato BE, Coupland SE, Taktak AF. Cluster analysis of multiplex ligation-dependent probe amplification data in choroidal melanoma. *Mol Vis*. 2015;21:1–11.
- Damato BE, Heimann H, Kalirai H, Coupland SE. Age, survival predictors, and metastatic death in patients with choroidal melanoma: tentative evidence of a therapeutic effect on survival. *JAMA Ophthalmol*. 2014;132(5):605–13. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2014.77.
- Woodman SE. Metastatic uveal melanoma: biology and emerging treatments. *Cancer J*. 2012;18(2):148–52. doi: 10.1097/PPO.0b013e31824bd256.



5. Саакян СВ, Цыганков АЮ, Амирян АГ, Логинов ВИ, Бурденный АМ. Потеря гетерозиготности на хромосомах 1, 3, 8 при увеальной меланоме. Молекулярная медицина. 2018;16(2):37–40. doi: 10.29296/24999490-2018-02-05.
6. Isager P, Ehlers N, Overgaard J. Prognostic factors for survival after enucleation for choroidal and ciliary body melanomas. *Acta Ophthalmol Scand.* 2004;82(5):517–25. doi: 10.1111/j.1600-0420.2004.00330.x.
7. Triozzi PL, Eng C, Singh AD. Targeted therapy for uveal melanoma. *Cancer Treat Rev.* 2008;34(3):247–58. doi: 10.1016/j.ctrv.2007.12.002.
8. Саакян СВ, Амирян АГ, Цыганков АЮ, Логинов ВИ, Бурденный АМ. Мутации в онкогенах GNAQ и GNA11 у больных увеальной меланомой. Молекулярная медицина. 2014;(2):34–7.
9. Саакян СВ, Амирян АГ, Цыганков АЮ, Логинов ВИ, Бурденный АМ. Ассоциация гена ABCB1 с риском развития увеальной меланомы. *Архив патологии.* 2014;76(2):3–7.
10. Саакян СВ, Цыганков АЮ, Амирян АГ, Логинов ВИ, Бурденный АМ. Анализ статуса метилирования CPG-островков генов-супрессоров опухолевого роста RASSF1A и SEMA3B при увеальной меланоме. Молекулярная медицина. 2018;16(1):51–4. doi: 10.29296/24999490-2018-01-09.
11. Coupland SE, Kalirai H, Ho V, Thornton S, Damato BE, Heimann H. Concordant chromosome 3 results in paired choroidal melanoma biopsies and subsequent tumour resection specimens. *Br J Ophthalmol.* 2015;99(10):1444–50. doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-307057.
12. Damato B, Eleuteri A, Taktak AF, Coupland SE. Estimating prognosis for survival after treatment of choroidal melanoma. *Prog Retin Eye Res.* 2011;30(5):285–95. doi: 10.1016/j.preteyeres.2011.05.003.
13. Bronkhorst IH, Maat W, Jordanova ES, Kroes WG, Schalijs-Delfos NE, Luyten GP, Jager MJ. Effect of heterogeneous distribution of monosomy 3 on prognosis in uveal melanoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(8):1042–7. doi: 10.5858/2010-0477-OAR1.
14. Dogrusöz M, Bagger M, van Duinen SG, Kroes WG, Ruivenkamp CA, Böhringer S, Andersen KK, Luyten GP, Kiilgaard JF, Jager MJ. The prognostic value of AJCC staging in uveal melanoma is enhanced by adding chromosome 3 and 8q status. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(2):833–42. doi: 10.1167/iov.16-20212.
15. Shields CL, Say EAT, Hasanreisoglu M, Saktanatsate J, Lawson BM, Landy JE, Badami AU, Sivalingam MD, Hauschild AJ, House RJ, Daitch ZE, Mashayekhi A, Shields JA, Ganguly A. Personalized prognosis of uveal melanoma based on cytogenetic profile in 1059 patients over an 8-year period: The 2017 Harry S. Gradle lecture. *Ophthalmology.* 2017;124(10):1523–31. doi: 10.1016/j.optha.2017.04.003.
16. Maat W, van der Velden PA, Out-Luiting C, Plug M, Dirks-Mulder A, Jager MJ, Gruis NA. Epigenetic inactivation of RASSF1A in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(2):486–90. doi: 10.1167/iov.06-0781.
17. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, Obenaus AC, Wackernagel W, Green G, Bouvier N, Sozen MM, Baimukanova G, Roy R, Heguy A, Dolgalev I, Khanin R, Busam K, Speicher MR, O'Brien J, Bastian BC. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(23):2191–9. doi: 10.1056/NEJMoa1000584.
18. Decatur CL, Ong E, Garg N, Anbunathan H, Bowcock AM, Field MG, Harbour JW. Driver mutations in uveal melanoma: associations with gene expression profile and patient outcomes. *JAMA Ophthalmol.* 2016;134(7):728–33. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2016.0903.
19. Mudhar HS, Doherty R, Salawu A, Sisley K, Rennie IG. Immunohistochemical and molecular pathology of ocular uveal melanocytoma: evidence for somatic GNAQ mutations. *Br J Ophthalmol.* 2013;97(7):924–8. doi: 10.1136/bjophthalmol-2013-303291.
20. Vader MJC, Madigan MC, Versluis M, Suleiman HM, Gezgin G, Gruis NA, Out-Luiting JJ, Bergman W, Verdijk RM, Jager MJ, van der Velden PA. GNAQ and GNA11 mutations and downstream YAP activation in choroidal nevi. *Br J Cancer.* 2017;117(6):884–7. doi: 10.1038/bjc.2017.259.
1. Coupland SE, Lake SL, Zeschnigk M, Damato BE. Molecular pathology of uveal melanoma. *Eye (Lond).* 2013;27(2):230–42. doi: 10.1038/eye.2012.255.
2. Caines R, Eleuteri A, Kalirai H, Fisher AC, Heimann H, Damato BE, Coupland SE, Taktak AF. Cluster analysis of multiplex ligation-dependent probe amplification data in choroidal melanoma. *Mol Vis.* 2015;21:1–11.
3. Damato BE, Heimann H, Kalirai H, Coupland SE. Age, survival predictors, and metastatic death in patients with choroidal melanoma: tentative evidence of a therapeutic effect on survival. *JAMA Ophthalmol.* 2014;132(5):605–13. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2014.77.
4. Woodman SE. Metastatic uveal melanoma: biology and emerging treatments. *Cancer J.* 2012;18(2):148–52. doi: 10.1097/PPO.0b013e31824bd256.
5. Saakyan SV, Tsygankov Alu, Amiryani AG, Loginov VI, Burdennyi AM. Loss of heterozygosity on chromosomes 1, 3 and 8 in uveal melanoma patients. *Molecular Medicine.* 2018;16(2):37–40. Russian. doi: 10.29296/24999490-2018-02-05.
6. Isager P, Ehlers N, Overgaard J. Prognostic factors for survival after enucleation for choroidal and ciliary body melanomas. *Acta Ophthalmol Scand.* 2004;82(5):517–25. doi: 10.1111/j.1600-0420.2004.00330.x.
7. Triozzi PL, Eng C, Singh AD. Targeted therapy for uveal melanoma. *Cancer Treat Rev.* 2008;34(3):247–58. doi: 10.1016/j.ctrv.2007.12.002.
8. Saakyan SV, Amiryani AG, Tsygankov Alu, Loginov VI, Burdennyi AM. Mutations in oncogenes GNAQ and GNA11 in uveal melanoma patients. *Molecular Medicine.* 2014;(2):34–7. Russian.
9. Saakyan SV, Amiryani AG, Tsygankov Alu, Loginov VI, Burdennyi AM. Association of the ABCB1 gene with risk for uveal melanoma. *Архив патологии.* 2014;76(2):3–7. Russian.
10. Saakyan SV, Tsygankov Alu, Amiryani AG, Loginov VI, Burdennyi AM. The analysis of RASSF1A and SEMA3B tumor suppressor genes CPG-islands methylation status in uveal melanoma patients. *Molecular Medicine.* 2018;16(1):51–4. Russian. doi: 10.29296/24999490-2018-01-09.
11. Coupland SE, Kalirai H, Ho V, Thornton S, Damato BE, Heimann H. Concordant chromosome 3 results in paired choroidal melanoma biopsies and subsequent tumour resection specimens. *Br J Ophthalmol.* 2015;99(10):1444–50. doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-307057.
12. Damato B, Eleuteri A, Taktak AF, Coupland SE. Estimating prognosis for survival after treatment of choroidal melanoma. *Prog Retin Eye Res.* 2011;30(5):285–95. doi: 10.1016/j.preteyeres.2011.05.003.
13. Bronkhorst IH, Maat W, Jordanova ES, Kroes WG, Schalijs-Delfos NE, Luyten GP, Jager MJ. Effect of heterogeneous distribution of monosomy 3 on prognosis in uveal melanoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(8):1042–7. doi: 10.5858/2010-0477-OAR1.
14. Dogrusöz M, Bagger M, van Duinen SG, Kroes WG, Ruivenkamp CA, Böhringer S, Andersen KK, Luyten GP, Kiilgaard JF, Jager MJ. The prognostic value of AJCC staging in uveal melanoma is enhanced by adding chromosome 3 and 8q status. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(2):833–42. doi: 10.1167/iov.16-20212.
15. Shields CL, Say EAT, Hasanreisoglu M, Saktanatsate J, Lawson BM, Landy JE, Badami AU, Sivalingam MD, Hauschild AJ, House RJ, Daitch ZE, Mashayekhi A, Shields JA, Ganguly A. Personalized prognosis of uveal melanoma based on cytogenetic profile in 1059 patients over an



- 8-year period: The 2017 Harry S. Gradle lecture. *Ophthalmology*. 2017;124(10):1523–31. doi: 10.1016/j.ophtha.2017.04.003.
16. Maat W, van der Velden PA, Out-Luiting C, Plug M, Dirks-Mulder A, Jager MJ, Gruijs NA. Epigenetic inactivation of RASSF1A in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(2):486–90. doi: 10.1167/iovs.06-0781.
17. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, Obenaus AC, Wackernagel W, Green G, Bouvier N, Sozen MM, Baimukanova G, Roy R, Heguy A, Dolgalev I, Khanin R, Busam K, Speicher MR, O'Brien J, Bastian BC. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(23):2191–9. doi: 10.1056/NEJMoa1000584.
18. Decatur CL, Ong E, Garg N, Anbunathan H, Bowcock AM, Field MG, Harbour JW. Driver mutations in uveal melanoma: associations with gene expression profile and patient outcomes. *JAMA Ophthalmol*. 2016;134(7):728–33. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2016.0903.
19. Mudhar HS, Doherty R, Salawu A, Sisley K, Rennie IG. Immunohistochemical and molecular pathology of ocular uveal melanocytoma: evidence for somatic GNAQ mutations. *Br J Ophthalmol*. 2013;97(7):924–8. doi: 10.1136/bjophthalmol-2013-303291.
20. Vader MJC, Madigan MC, Versluis M, Suleiman HM, Gezgin G, Gruijs NA, Out-Luiting JJ, Bergman W, Verdijk RM, Jager MJ, van der Velden PA. GNAQ and GNA11 mutations and downstream YAP activation in choroidal nevi. *Br J Cancer*. 2017;117(6):884–7. doi: 10.1038/bjc.2017.259.

Long-term survival of uveal melanoma patients after enucleation, depending on molecular genetic aberrations

V.V. Neroev¹ • S.V. Saakyan¹ • A.G. Amiryanyan¹ • A.Yu. Tsygankov¹ • A.M. Burdenny² • V.I. Loginov² • M.R. Khlgatyan¹

Rationale: In the recent years molecular genetic prognostic factors are becoming very important for predicting the course of uveal melanoma (UM). In clinical practice, molecular genetic methods are used to identify patients with a high risk of metastases. **Aim:** To determine the survival of UM patients after enucleation, depending on molecular genetic aberrations. **Materials and methods:** Thirty (30) patients with UM aged from 23 to 83 years were examined and treated. In all cases, enucleation was performed. The removed eyes underwent morphological and molecular genetic and cytogenetic analysis (loss of heterozygosity on chromosomes 1, 3 and 8, methylation of the *RASSF1A* gene, mutations in *GNAQ/11* genes, polymorphism of the *ABC1* gene). The median follow-up was 61 months. **Results:** The cumulative 3-year survival of the UM patients was 77.8±8.0%, and the 5-year survival 63.0±9.0%. The mean survival time was 52.8±3.9 months. The patients with chromosome 3 monosomy showed significantly lower 5-year survival rates than the patients with partial monosomy and without loss of heterozygosity in chromosome 3 (log-rank test, $\chi^2=14.111$, $p=0.001$). The loss of heterozygosity on chromosomes 1 and 8, the methylation of the *RASSF1A* gene, the mutations in *GNAQ/11* genes, and the polymorphism of the *ABC1* gene were not associated with poorer

vital prognosis. **Conclusion:** Molecular genetic aberrations play an important role in predicting the course of the tumor process and determining the risk of hematogenous metastasizing in UM patients. The significant role of chromosome 3 monosomy has been proved. Due to the relatively small cohort (30 patients) and the time factor (analysis of 5-year survival), the role of other molecular genetic changes has not been confirmed, which requires an assessment of not only genetic, but also clinical, echographic and morphological prognostic factors.

Key words: uveal melanoma, genetics, survival, molecular genetic changes, monosomy of chromosome 3, deletion of chromosome 1, deletion of chromosome 8, *RASSF1A* gene methylation, *GNAQ/GNA11* gene mutations, *ABC1* gene polymorphism

For citation: Neroev VV, Saakyan SV, Amiryanyan AG, Tsygankov AY, Burdenny AM, Loginov VI, Khlgatyan MR. Long-term survival of uveal melanoma patients after enucleation, depending on molecular genetic aberrations. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018;46(4):338–46. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-4-338-346.

Received 7 May 2018; accepted 18 June 2018

Vladimir V. Neroev – MD, PhD, Professor, Member-Correspondent of Russian Academy of Sciences, Director¹

Svetlana V. Saakyan – MD, PhD, Professor, Head of Department of Ophthalmic Oncology and Radiology¹

Anush G. Amiryanyan – MD, PhD, Leading Research Fellow, Department of Ophthalmic Oncology and Radiology¹
✉ 14/19 Sadovaya-Chernogryazskaya ul., Moscow, 105062, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 608 41 44. E-mail: amiryanyan@yandex.ru

Alexander Yu. Tsygankov – MD, PhD, Junior Research Fellow, Department of Ophthalmic Oncology and Radiology¹

Alexey M. Burdenny – PhD (in Biology), Senior Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics²

Vitaly I. Loginov – PhD (in Biology), Leading Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics²

Mariam R. Khlgatyan – MD, Ophthalmologist, Postgraduate Student, Department of Ophthalmic Oncology and Radiology¹

¹ Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases; 14/19 Sadovaya-Chernogryazskaya ul., Moscow, 105062, Russian Federation

² Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8 Baltiyskaya ul., Moscow, 125315, Russian Federation

Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interests.