

А.Р. Зарецкий^{1,2}, В.А. Яровая³, Л.В. Чудакова², В.В. Назарова⁴,
Л.В. Демидов⁴, А.А. Яровой³

Опыт молекулярного тестирования увеальной меланомы I–III стадии при консервативном и хирургическом лечении

¹ГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н. И. Пирогова» Минздрава РФ,

²ООО «Евроген Лаб»,

³ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава РФ,

⁴ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава РФ,
Москва

Молекулярное тестирование — перспективный метод дифференциальной диагностики и определения прогноза при увеальной меланоме (УМ). В рамках проспективного исследования на серии из 58 образцов мы апробировали метод комплексного тестирования УМ, включающий морфологический анализ, цитогенетические и молекулярно-генетические маркеры. Показана выполнимость такого тестирования, в том числе на цитологическом материале. Мутационные тесты как метод верификации диагноза УМ показали очень высокую чувствительность. Выявлен большой процент несовпадений между молекулярно-генетической и цитогенетической классификацией УМ; прогностическое значение этих несовпадений должно быть определено в ходе окончательного анализа данных настоящего исследования и других проспективных работ.

Ключевые слова: увеальная меланома, прогноз, биомаркеры, тонкоигольная аспирационная биопсия, генетические тесты, моносомия 3, амплификация 8q, мутации, EIF1AX, SF3B1, VAP1

Увеальная меланома (УМ) — самая часто встречающаяся внутриглазная злокачественная опухоль у взрослых [1]. Лечение первичных очагов УМ к настоящему времени достигло весьма высоких показателей эффективности и развивается в сторону все большего распространения органосохраняющих методов [2, 3]. Тем не менее, после успешного хирургического и/или лучевого лечения у пациентов с УМ сохраняется существенный риск развития отдаленных метастазов, который составляет 35–50% в течение 10 лет и не зависит от метода лечения первичной опухоли [2–4]. При этом метастатическая УМ остается инкурабельным заболеванием с медианой общей выживаемости не более 12 мес. [3, 4 и др.]; существенное увеличение выживаемости может быть достигнуто только при комплексном

лечении пациентов с единичными метастатическими очагами небольшого размера [5]. Соответственно, наиболее актуальными направлениями клинических исследований при УМ в настоящее время являются: поиск методов раннего выявления небольших метастатических очагов и разработка эффективной адъювантной терапии. Для обоих этих направлений критически важен адекватный отбор пациентов с высоким риском метастазирования, который существенно затрудняется отсутствием высокоинформативных валидированных прогностических критериев.

Прогноз при УМ индивидуален и зависит от широкого круга факторов [6, 7]. В частности, с более высоким риском метастазирования ассоциированы мужской пол пациента, возраст старше 50 и особенно старше 65 лет, средний или большой размер первичного очага, вовлечение в опухоль цилиарного тела и экстраокулярное распространение опухоли. Кроме того, прогностическую ценность имеют многие морфологические признаки — в частности, в качестве предикторов плохого прогноза при УМ описаны эпителиоидная морфология опухолевых клеток, большое количество митозов, некрозы, признаки патологического сосудобразования (псевдососудистые петли), наличие инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или макрофагов и проникновение опухолевых клеток в окружающие ткани (инвазия или инфильтрация).

Совокупность клинических и морфологических факторов дает важную, но далеко не исчерпывающую информацию о риске метастазирования конкретной опухоли. В связи с этим большие надежды возлагаются на молекулярные факторы прогноза [8].

Молекулярный патогенез УМ изучен достаточно хорошо. «Драйверами» канцерогенеза при УМ являются мутации в «горячих точках» генов *GNAQ*, *GNA11* и реже — других генов того же сигнального каскада (*CYSLTR2*, *PLCB4* и, возможно, также *PLCB3*) [8]. Фенотипические эффекты данных мутаций во многом специфич-

ны для увеальных меланоцитов и очень схожи между собой, поэтому неудивительно, что тестирование на эти мутации имеет существенную ценность в дифференциальной диагностике УМ, но не в определении ее прогноза. В отличие от драйверных мутаций, молекулярные нарушения «модификаторы», появляющиеся на более поздних стадиях канцерогенеза, при УМ демонстрируют значительное разнообразие, и их набор, обнаруживаемый в конкретной опухоли, существенно коррелирует с риском ее метастазирования.

На основании анализа молекулярных нарушений «модификаторов» при УМ можно выделить четыре класса опухолей, которые ассоциированы с различным прогнозом — условно говоря, «хорошим», «средним», «плохим» и «очень плохим» [8]. Существование этих четырех молекулярных классов было многократно продемонстрировано в работах нескольких независимых научных групп с применением различных молекулярно-биологических методов — цитогенетического анализа, мутационного тестирования и профилирования экспрессии мРНК (см. табл. 1). Фундаментальное исследование консорциума TCGA 2017 г. [17] с помощью высокопроизводительного анализа генома, метилома, транскриптома и протеома клеток УМ подтвердило биологическую релевантность этой четырехчастной классификации и в очередной раз показало ее корреляцию с прогнозом, т.е. с риском метастазирования и смерти от УМ.

В последние годы были разработаны подробные прогностические классификаторы-номограммы, которые учитывают клинические, морфологические и молекулярные факторы и позволяют максимально индивидуализировать прогноз пациентов с УМ [18–22]. Использование молекулярных факторов в этих номограммах не только повышает точность прогноза, но также может «компенсировать» отсутствие некоторых клинических или морфологических данных (например, при недоступности гистологического материала [21]). Несмотря на это, уровень прогностической эффективности, продемонстрированный в работах [18–22], все же далек от идеала. Поскольку клинические и морфологические предикторы при УМ изучены уже достаточно подробно и используются «по максимуму», дальнейшее повышение точности прогностических классификаторов при УМ возможно прежде всего за счет их молекулярной составляющей. Для этого необходимо, во-первых, обеспечить техническую выполнимость молекулярных тестов на большинстве образцов, получаемых в рутинной клинической практике, и, во-вторых, сравнить прогностическую ценность различных молекулярных классификаций

УМ — цитогенетической, молекулярно-генетической, экспрессионной и т.д. — и по результатам такого сравнения выбрать наиболее информативные прогностические маркеры.

Цель настоящего пилотного клинического исследования — определить техническую выполнимость и прогностическую ценность цитогенетической и молекулярно-генетической (мутационной) классификации увеальной меланомы I–III стадии при консервативном и хирургическом лечении первичной опухоли. В настоящей статье мы представляем первый промежуточный анализ результатов данного исследования, призванный оценить техническую выполнимость цитогенетического и мутационного анализа и соотношение результатов, получаемых с помощью этих двух методов.

Таблица 1. Основные молекулярные классы увеальной меланомы и их прогностическая значимость

Метод	Маркеры молекулярных классов при увеальной меланоме				Ссылки
---	Тип I: благоприятный прогноз		Тип II: неблагоприятный прогноз		---
	Класс 1 [IA]: «хороший» прогноз	Класс 2 [IB]: «средний» прогноз	Класс 3 [IIA]: «плохой» прогноз	Класс 4 [IIB]: «очень плохой» прогноз	
Цито-генетический	Дисомия по хромосоме 3		Потеря хромосомы 3		[9, 10]
	Дисомия по хромосоме 8	Аберрации хромосомы 8 (8q↑ ± 8p↓)	Дисомия по хромосоме 8	Аберрации хромосомы 8 (8q↑ ± 8p↓)	
Мутационный	Отсутствие инактивации гена BAP1		Инактивация гена BAP1		[11–13]
	Мутации в гене EIF1AX	Мутации в гене SF3B1 или SRSF2	---	Мутации в гене SF3B1 или SRSF2	
Экспрессионный	Экспрессионный тип 1		Экспрессионный тип 2		[14–16]
	Отсутствие экспрессии гена PRAME	Экспрессия гена PRAME	Отсутствие экспрессии гена PRAME	Экспрессия гена PRAME	

8q↑ — увеличение количества копий длинного плеча хромосомы 8 (8q), 8p↓ — уменьшение количества копий короткого плеча хромосомы 8 (8p). Экспрессионные типы 1 и 2 — многокомпонентные маркеры: принадлежность образца УМ к одному из них определяется по специальному алгоритму с использованием данных об уровне экспрессии мРНК 15 генов в опухолевых клетках [14, 15].

Материал и методы

Настоящее пилотное клиническое исследование проводится в отделе офтальмоонкологии и радиологии ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. С. Н. Федорова» Минздрава России с 2016 г. и по своему характеру является одноцентровым открытым ретроспективно-проспективным наблюдательным. В исследование включали пациентов старше 18 лет с увеальной меланомой I–III стадии.

Критериями исключения пациента из исследования были снятие диагноза УМ по результатам морфологического исследования, недоступность или неинформативность гистологического материала (для ретроспективной когорты) и отзыв информированного согласия.

Для лечения первичной опухоли использовали такие методы, как брахитерапия с $^{106}\text{Ru}+^{106}\text{Rh}$, эндовитреальное удаление опухоли (эндорезекция) с последующей брахитерапией, стереотаксическая радиохirurgия на установке «Гамма-нож», трансклеральное удаление опухоли (блок-эксцизия) и энуклеация пораженного глаза. Обследование пациентов после лечения включает осмотр офтальмолога (раз в 3 месяца в течение одного года, затем раз в полгода в течение 4 лет и далее раз в год), а также КТ грудной клетки и МРТ брюшной полости (оба исследования — с контрастированием) раз в полгода.

У всех пациентов осуществляли забор опухолевого материала для морфологического анализа и молекулярного тестирования. При выполнении органосохраняющего лечения проводили тонкоигольную аспирационную биопсию (ТИАБ) опухоли по методике, описанной нами ранее [23]: для преэкваториальных опухолей — трансклерально с использованием короткой иглы 30G, при постэкваториальном расположении опухоли — трансклерально через *pars plana* с использованием длинной иглы 25G или 27G. При проведении энуклеации выполняли аналогичную процедуру на удаленном глазу. У пациентов из ретроспективной когорты использовали доступный материал в виде парафиновых блоков с фиксированной формалином опухолевой тканью.

Морфологические и генетические тесты в рамках настоящего исследования проводили в отделе молекулярной онкологии ООО «Евроген Лаб». Все лабораторные тесты выполняли в соответствии с инструкциями производителей наборов реагентов и собственными протоколами ООО «Евроген Лаб». Методики генетического анализа были предварительно валидированы на референсных материалах (Horizon Dx, США), а также на образцах опухолевой ткани пациентов с известными цитогенетическими и молекулярно-генетическими нарушениями и «нормальной» ткани тех же пациентов.

Подготовку материала к лабораторным тестам осуществляли по стандартным методикам. Из каждого образца ТИАБ, предварительно помещенного в консервант «ЦитоПротект» (ООО «Евроген Лаб», Москва), методом жидкостной цитологии изготавливали 4 стеклопрепарата; использовали материалы серии «ЦитоСкрин» (ООО «Хоспитекс Диагностика», Москва). С каждого парафинового блока на ротационном микротоме изготавливали по 16 срезов, которые помещали на 8 стеклопрепаратов. По 4 стеклопрепарата от каждого образца использовали для исследований *in situ* — морфологического, FISH и иммуноцитохимического или иммуногистохимического. Оставшийся материал — 4 стеклопрепарата со срезами или супернатант после жидкостной цитологии — использовали для выделения ДНК и последующих ПЦР-тестов. ДНК из гистологического и цитологического материала выделяли с использованием наборов реагентов серий «ЭкстрактДНК» (ЗАО «Евроген», Москва) и QiaAmp (Qiagen, Германия), соответственно; концентрацию и качество ДНК оценивали методом ПЦР в режиме реального времени с помощью набора «aXY-Детект» (ООО НПФ «Синтол», Москва).

Морфологическое исследование гистологических и цитологических стеклопрепаратов с целью верификации диагноза УМ выполняли по стандартным протоколам. Параллельно проводили молекулярную верификацию адекватности полученного материала путем поиска драйверных молекулярных нарушений, характерных для УМ — мутаций в «горячих точках» экзонов 4 и 5 гена *GNAQ*, экзонов 4 и 5 гена *GNAII*, экзона 20 гена *PLCB4* и экзона 1 гена *CYSLTR2* — методами

усиленной аллель-специфической ПЦР-РВ и ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру.

Для построения цитогенетической классификации исследуемые образцы тестировали на потерю одной из копий хромосомы 3 и увеличение количества копий длинного плеча хромосомы 8 (далее — моносомия 3 и амплификация 8q). В качестве маркерных регионов для детекции этих нарушений в соответствии с данными [17, 24] были выбраны регионы 3p25.2 (район гена *PPARG*) и 8q24.21 (район гена *MYC*). Анализ осуществляли методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием реагентов серии Poseidon (Kreatech, Нидерланды); исследовали до 100 клеток на образец (в малоклеточных образцах — не менее 10 клеток), и образец признавали положительным по тому или другому цитогенетическому нарушению, если в нем обнаруживалось не менее 5 клеток с соответствующей этому нарушению FISH-картиной и количество таких клеток при этом составляло не менее 10% от всех проанализированных клеток. По результатам анализа образец относили к одному из 4 цитогенетических классов (ЦГК) в соответствии с Табл. 1: ЦГК1 — нарушения не выявлены, ЦГК2 — выявлена только амплификация 8q, ЦГК3 — выявлена только моносомия 3, ЦГК4 — выявлены оба нарушения.

Для построения молекулярно-генетической классификации исследуемые образцы тестировали на мутации в «горячих точках» генов *EIF1AX* (экзоны 1 и 2) и *SF3B1* (экзон 14) и на инактивацию гена *BAP1*. Мутационный анализ проводили методом ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру. Тест на инактивацию гена *BAP1* выполняли иммуноцитохимическим или иммуногистохимическим методом согласно [25] с использованием моноклонального антитела С-4 к белку BAP1 человека (Santa Cruz Biotechnology, США). Исследовали до 100 клеток на образец (в малоклеточных образцах — не менее 10 клеток), и положительными считали образцы с интенсивным специфическим окрашиванием ядер не менее 80% опухолевых клеток; уровень экспрессии белка BAP1 ниже данного порога позитивности расценивали как признак инактивации гена *BAP1*. По результатам анализа образец относили к одному из 8 молекулярно-генетических классов (МГК; нумерация подобрана для удобства сопоставления с цитогенетической классификацией): МГК1 — выявлена только мутация в гене *EIF1AX*, МГК2 — выявлена только мутация в гене *SF3B1*, МГК3 — выявлена только инактивация гена *BAP1*, МГК4 — выявлена мутация в гене *SF3B1* и инактивация гена *BAP1*, МГК5 — выявлена мутация в гене *EIF1AX* и инактивация гена *BAP1*, МГК6 — выявлены мутации в генах *EIF1AX* и *SF3B1*, МГК7 — выявлены все три нарушения, МГК8 — нарушения не выявлены.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Software, США), а также онлайн-версии статистического калькулятора VassarStats [26].

Результаты и обсуждение

К настоящему моменту в исследование включено 58 пациентов, из них 53 — в проспективную когорту. Основные характеристики сформированной группы пациентов достаточно адекватно отражают особенности российской популяции пациентов с УМ (см. табл. 2); набор пациентов в исследование продолжается.

Всем пациентам было успешно выполнено радикальное лечение первичной опухоли с использованием органосохраняющих техник ($n =$

41) или энуклеации ($n = 17$). Перед органосохраняющим лечением пациентам выполнялась ТИАБ опухоли. Следует отметить относительно низкую встречаемость серьезных осложнений при ТИАБ и органосохраняющем лечении: нами был отмечен только 1 случай витреального кровоизлияния, которое потребовало проведения витрэктомии для улучшения зрительных функций пациента. Другие осложнения, в частности, отслойка сетчатки, эндофтальмит, диссеминация опухоли в стекловидное тело и прогрессия опухоли [27], в данной когорте пациентов зафиксированы не были. Медиана наблюдения за пациентами составляет 8,6 мес. (разброс — от 1,6 до 66,4 мес.); к настоящему моменту не выявлено ни одного случая прогрессирования болезни.

Опухолевый материал для лабораторного тестирования был получен от всех 58 пациентов. В 48 случаях был представлен цитологический материал, в 10 случаях — гистологический. Все 10 гистологических и 42 из 48 цитологических образцов оказались пригодны как для морфологического, так и для генетического тестирования; в 3 случаях цитологический материал оказался пригоден только для генетического и еще в 3 случаях — только для морфологического анализа (впоследствии для 2 из них был получен другой материал, пригодный также и для генетических тестов). Таким образом, морфологический анализ был проведен у 55 образцов, а генетический — у 57.

Морфологическое исследование подтвердило диагноз УМ во всех 55 проанализированных случаях (чувствительность — 100%). При этом в 19 случаях было выявлено наличие в опухоли эпителиоидных клеток, в 7 случаях — признаки ядерной атипии, еще в 2 случаях — отсутствие пигментации в опухолевых клетках. Кроме того, среди 10 гистологических образцов в 5 случаях была обнаружена опухолевая инфильтрация склеры, в одном случае — высокая митотическая активность и еще в одном случае — распространение опухоли по сосудисто-нервному пучку.

Концентрация ДНК, выделенной из образцов УМ, составила $27,6 \pm 24,24$ нг/мкл для гистологических и $9,6 \pm 17,14$ нг/мкл для цитологических образцов ($p = 0,0069$, критерий Стьюдента). Количество выделенной из образца ДНК не коррелировало с размерами опухоли и с техническими особенностями получения гистологического или цитологического материала. Качество ДНК во всех случаях было удовлетворительным. Доля опухолевой ДНК в тех случаях, когда ее можно было однозначно оценить — а именно, у пациентов мужского пола с мутацией в гене *EIF1AX* ($n = 8$) — составила не менее 50% для гистологических и не менее 80% для цитологических образцов.

Молекулярная верификация диагноза УМ путем тестирования на драйверные мутации дала положительный результат в 53 образцах из 57 (чувствительность — 93%). В 29 случаях были обнаружены мутации в гене *GNAQ*, в 23 случаях — в гене *GNA11* и в одном случае — в гене *PLCB4*. Результаты молекулярной верификации отражены в табл. 3 (раздел «Драйверы») и соответствуют литературным данным. Интересно, что во всех трех образцах, непригодных для морфологического тестирования, при молекулярной верификации был получен положительный результат.

Анализ цитогенетических прогностических маркеров к настоящему моменту проведен у части образцов ($n = 33$). В 31 (93,9%) случае получены результаты по обоим маркерам, еще в 2 случаях (6,1%) образцы были признаны непригодными для достоверного FISH-исследования. Моносомия 3 обнаружена в 11 случаях, амплификация 8q — в 15 случаях, в том числе в 5 случаях наблюдалось сочетание обоих цитогенетических нарушений. Распределение образцов по цитогенетическим прогностическим классам представлено в табл. 4 (графа А). Полученные результаты в целом соответствуют литературным данным. Статистически достоверных ассоциаций между профилем цитогенетических нарушений в опухоли и известными клиническими и морфологическими факторами прогноза выявить не удалось.

Анализ молекулярно-генетических прогностических маркеров к настоящему моменту проведен у всех образцов, признанных потенциально пригодными для него ($n = 57$). В 48 случаях (84,2%) были получены результаты по всем маркерам; в 7 случаях (12,3%) не удалось получить однозначный результат иммуноцитохимического исследования на белок VAP1 и в 2 случаях (3,5%) мутационное тестирование было проведено не в полном объеме по причине недостаточного количества ДНК. Мутации в гене *EIF1AX* были обнаружены в 11, мутации в гене *SF3B1* — в 13, инактивация гена *BAP1* — в 16 случаях из 48. Инактивация гена *BAP1* в 4 случаях сочеталась с мутациями в гене *SF3B1* и в 2 случаях — с мутациями в гене *EIF1AX*. Результаты мутационного тестирования представлены в табл. 3 (раздел «Модификаторы»), распределение образцов по молекулярно-генетическим прогностическим классам — в табл. 4 (графа В). Полученные результаты не противоречат литературным данным. Мутации в гене *SF3B1* и инактивация гена *BAP1* были ассоциированы с наличием в опухоли эпителиоидных клеток ($p = 0,035$ и $0,04$, соответственно; двусторонний точный критерий Фишера); инактивация гена *BAP1* была также ассоциирована с вовлечением цилиарного тела в опухоль ($p = 0,03$).

Соотношение молекулярно-генетической и цитогенетической классификации было проанализировано на группе из 27 образцов, которые были протестированы обоими методами в полном объеме. Результаты анализа суммированы в табл. 4 (графа С). Совпадение молекулярно-генетического и цитогенетического профиля зафиксировано только в 7 случаях ($\kappa = 0,011$). Еще в 7 случаях цитогенетическая классификация «ухудшила» прогноз относительно молекулярно-генетической, в 3 случаях — наоборот, прогноз «ухудшила» молекулярно-генетическая классификация; наконец, оставшиеся 10 случаев по молекулярно-генетической классификации относятся к классу 0, который в настоящее время не имеет однозначной прогностической интерпретации. При трехмерном статистическом анализе с использованием критерия G^2 комбинированная прогностическая классификация, но не ЦГК или МГК по отдельности, достоверно предсказывала как наличие в опухоли эпители-

оидных клеток ($p = 0,022$ и $0,013$ для комбинаций «статус гена *BAP1* + статус хромосомы 3» и «статус гена *SF3B1* + статус хромосомы 8», соответственно), так и вовлечение цилиарного тела в опухоль ($p = 0,03$ и $0,034$ для комбинаций «статус гена *BAP1* + статус хромосомы 3» и «статус гена *SF3B1* + статус хромосомы 8», соответственно).

Низкая конкордантность двух классификаций объясняется несколькими причинами, среди которых следует прежде всего отметить: 1) взаимодополняемость тестов — цитогенетические и молекулярно-генетические маркеры могут выявлять разные подклассы одного и того же молекулярного класса опухолей; это касается таких «пар» маркеров, как моносомия 3 и инактивация гена *BAP1*, а также амплификация 8q и мутации в гене *SF3B1*; 2) частный случай такой взаимодополняемости — наличие образцов, имеющих только молекулярно-генетические ($n = 8$) или только цитогенетические ($n = 9$) нарушения; 3)

Таблица 2. Основные характеристики пациентов, включенных в исследование

Параметр	Кол-во пациентов	Параметр	Кол-во пациентов
Когорта: Ретроспективная Проспективная	5 (8,6%) 53 (91,4%)	Пол: Мужской Женский	24 (41,4%) 34 (58,6%)
Возраст: До 50 лет 50–65 лет Старше 65 лет	24 (41,4%) 25 (43,1%) 9 (15,5%)	Размер опухоли (по [28]): Малый Средний Большой	6 (10,4%) 29 (49,9%) 23 (39,7%)
Локализация опухоли: Хориоидея Хориоидея + цилиарное тело Радужка Радужка + цилиарное тело Все 3 отдела	46 (79,3%) 5 (8,6%) 0 1 (1,7%) 6 (10,4%)	Вид лечения: Брахитерапия Радиохирургия («Гамма-нож») Эндорезекция + брахитерапия Блок-эксцизия Энуклеация	34 (58,6%) 2 (3,4%) 4 (6,8%) 1 (1,7%) 17 (29,5%)
Экстраокулярный рост: Есть Нет	5 (8,6%) 53 (91,4%)	Эпителиоидные клетки: Присутствуют Отсутствуют	19 (32,8%) 39 (67,2%)
Материал: Гистологический Цитологический – ТИАБ ТВ Цитологический – ТИАБ ТС	10 (17%) 45 (77,9%) 3 (5,1%)	Проведенные тесты: Морфология + генетика Только морфология Только генетика	54 (93,2%) 1 (1,7%) 3 (5,1%)

ТИАБ ТВ / ТС – тонкоигольная аспирационная биопсия трансвитреальным / трансклеральным доступом.

Таблица 3. Мутации, выявленные в ходе настоящего исследования, и частота их встречаемости в проанализированной группе образцов УМ

Тип	Ген	Мутация	Число случаев	
Д Р А Й В Е Р Ы	GNAQ	c.548G>A (p.Arg183Gln)	2	
		c.626A>C (p.Gln209Pro)	17	
		c.626A>T (p. Gln209Leu)	9	
		c.626_627AA>TG (p.Gln209Leu)	1	
М О Д И Ф И К А Т О Р Ы	EIF1AX	c.547C>T (p.Arg183Cys)	1	
		c.626A>T(p.Gln209Leu)	22	
		PLCB4	c.1888G>T (p.Asp630Tyr)	1
		CYSLTR2	- - -	0
М О Д И Ф И К А Т О Р Ы	SF3B1	c.1-29 c.7dup36 (p.3_4insArgArgArgGluValAlaAlaThrAlaMetProLys)	1	
		c.10A>C (p.Asn4His)	1	
М О Д И Ф И К А Т О Р Ы	EIF1AX	c.17G>A (p.Gly6Asp)	3	
		c.25G>C (p.Gly9Arg)	2	
		c.26G>A (p.Gly9Asp)	1	
		c.26G>T (p.Gly9Val)	1	
М О Д И Ф И К А Т О Р Ы	SF3B1	c.37C>T (p.Arg13Cys)	1	
		c.38G>A (p.Arg13His)	1	
М О Д И Ф И К А Т О Р Ы	SF3B1	c.1873C>A (p.Arg625Ser)	1	
		c.1873C>T (p.Arg625Cys)	6	
		c.1874G>A (p.Arg625His)	6	

возможность одновременного появления в опухоли различных нарушений, которые обычно считаются взаимоисключающими — например, в нашей выборке наблюдаются случаи сочетания мутации в гене *EIF1AX* с моносомией 3 ($n = 3$) или с инактивацией гена *BAP1* ($n = 2$).

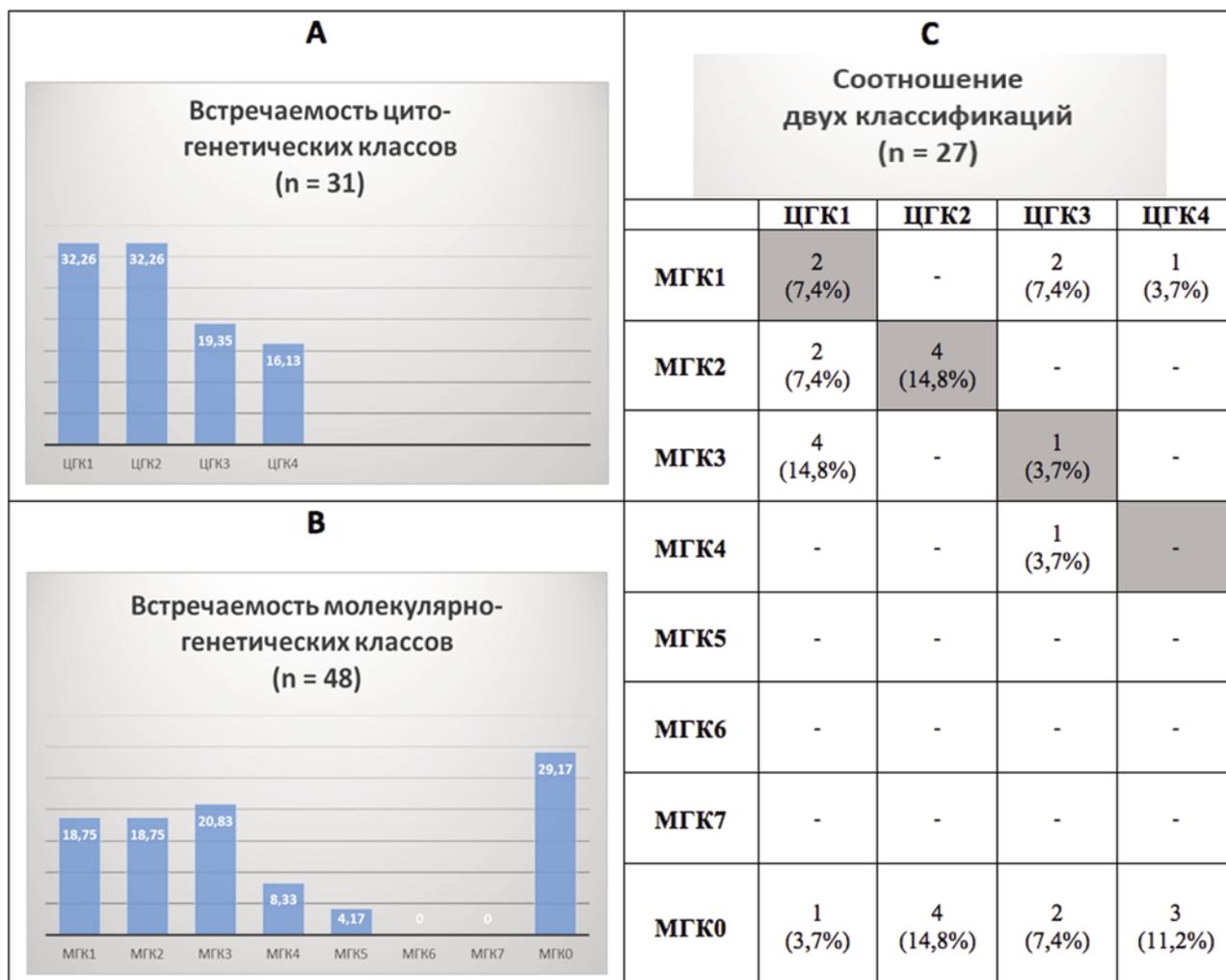
Прогностическое значение расхождений между двумя классификациями в настоящее время неизвестно. Если цитогенетическая классификация имеет определенную не очень высокую, но достоверно подтвержденную прогностическую ценность, то в отношении молекулярно-генетической классификации УМ этого сказать нельзя, поскольку до настоящей работы, насколько нам известно, задача проверить ее прогностическую ценность в проспективном исследовании даже не ставилась. В недавней статье [29] были продемонстрированы данные о существенном проценте расхождений между цитогенетической и экспрессионной классификацией УМ — но также без оценки прогностической значимости этих расхождений [30]. Имеют ли все эти несовпадения биологических классификаций

какой-то клинический коррелят и поможет ли их учет улучшить тактику ведения пациентов с УМ? Корректно ответить на этот вопрос могут только финальные результаты нескольких проспективных исследований, включая наше. Но уже сейчас можно сказать, что в случае использования только одного метода для прогностического тестирования образцов УМ интерпретировать условно благоприятные результаты такого тестирования (класс 1 для цитогенетических, класс 0 или класс 1 для молекулярно-генетических тестов) следует с максимальной осторожностью.

Выводы

В ходе настоящего исследования впервые в отечественной практике продемонстрирована техническая выполнимость мультимаркерного лабораторного тестирования у пациентов с I–III стадией УМ, в том числе при проведении органосохраняющего лечения. Показан как приемлемый профиль безопасности при заборе ма-

Таблица 4. Частота встречаемости молекулярных прогностических классов в проанализированной группе образцов УМ в процентах



териала, так и высокая информативность этого материала для морфологических и генетических тестов.

Разработана и апробирована процедура морфологического и молекулярного тестирования образцов УМ, позволяющая получить информацию обо всех исследуемых маркерах в 100% гистологических и 79% цитологических образцов. Неполная информативность цитологических образцов в большинстве случаев (7 из 10) касалась только одного маркера — иммуноцитохимического теста на инактивацию гена *BAP1*; планируется разработка альтернативного ПЦР-теста с показателем информативности не ниже 95%.

Молекулярно-генетическая верификация диагноза УМ путем анализа «драйверных» мутаций обладает крайне высокой чувствительностью и может быть использована как дополнительный метод дифференциальной диагностики, в частности, при неоднозначной морфологической картине или при небольшом количестве материала.

Молекулярно-генетическая прогностическая классификация УМ коррелирует с ключевыми клиническими и морфологическими факторами прогноза, но не с цитогенетической прогностической классификацией. Прогностическая ценность молекулярно-генетической классификации УМ, в том числе в сопоставлении с цитогенетической классификацией, должна быть определена на основании конечных результатов проспективных наблюдательных клинических исследований, включая исследование, описанное в настоящей работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2016 // *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. – 2016. – Vol. 66 (1). – P. 7–30. – doi:10.3322/caac.21332.
2. Yang J., Manson D.K., Marr B.P., Carvajal R.D. Treatment of uveal melanoma: where are we now? // *Ther Adv Med Oncol*. – 2018. – Vol. 10. – P. 1758834018757175. – doi:10.1177/1758834018757175.
3. Nathan P., Cohen V., Coupland S. et al. Uveal melanoma UK national guidelines // *European Journal of Cancer*. – 2016. – Vol. 51(16). – P. 2404–2412. – doi:10.1016/j.ejca.2015.07.013.
4. Damato B. E., Heimann H., Kalirai H., Coupland S. E. Age, survival predictors, and metastatic death in patients with choroidal melanoma: tentative evidence of a therapeutic effect on survival // *JAMA Ophthalmol*. – 2014. – Vol. 132(5). – P. 605–613. – doi:10.1001/jamaophthalmol.2014.77.
5. Carvajal R.D., Schwartz G.K., Tezel T. et al. Metastatic disease from uveal melanoma: treatment options and future prospects // *British Journal of Ophthalmology*. – 2016. – doi:10.1136/bjophthalmol-2016-309034.
6. Correa Z.M. Assessing Prognosis in Uveal Melanoma // *Cancer Control*. – 2016. – Vol. 23(2). – P. 93–98.
7. Berus T., Halon A., Markiewicz A. et al. Clinical, Histopathological and Cytogenetic Prognosticators in Uveal Melanoma — A Comprehensive Review // *Anticancer Res*. – 2017. — Vol. 37(12). – P. 6541–6549.
8. Amaro A., Gangemi R., Piaggio F. et al. The biology of uveal melanoma // *Cancer Metastasis Rev*. – 2017. – Vol. 36(1). – P. 109–140. – doi:10.1007/s10555-017-9663-3.
9. Sisley K., Rennie I. G., Parsons M. A. et al. Abnormalities of chromosomes 3 and 8 in posterior uveal melanoma correlate with prognosis // *Genes, Chromosomes & Cancer*. – 1997. – Vol. 19(1). – P. 22–28. – doi:10.1002/(SICI)1098-2264(199705)19:1<22::AID-GCC4>3.0.CO;2-2.
10. van den Bosch T., van Beek J. G., Vaarwater J. et al. Higher percentage of FISH-determined monosomy 3 and 8q amplification in uveal melanoma cells relate to poor patient prognosis // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2012. – Vol. 53(6). – P. 2668–2674. – doi:10.1167/iovs.11-8697.
11. Yavuziyigitoglu S., Koopmans A.E., Verdijk R.M. et al. Uveal melanomas with SF3B1 mutations: a distinct subclass associated with late-onset metastases // *Ophthalmology*. – 2016. – Vol. 123(5). – P. 1118–1128. – doi:10.1016/j.ophtha.2016.01.023.
12. Martin M., Masshofer L., Temming P., et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3 // *Nature Genetics*. – 2013. – 45(8). – P.933–936. – doi:10.1038/ng.2674.
13. Ewens K.G., Kanetsky P.A., Richards-Yutz J. et al. Chromosome 3 status combined with BAP1 and EIF1AX mutation profiles are associated with metastasis in uveal melanoma // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2014. – Vol. 55(8). – P. 5160–5167. – doi:10.1167/iovs.14-14550.
14. Onken M.D., Worley L.A., Ehlers J.P., Harbour, J.W. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death // *Cancer Research*. – 2004. – Vol. 64(20). – P. 7205–7209. – doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1750.
15. Onken M.D., Worley L.A., Char D.H. et al. Collaborative Ocular Oncology Group report number 1: prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma // *Ophthalmology*. – 2012. – Vol. 119(8). – P. 1596–1603. – doi:10.1016/j.ophtha.2012.02.017.
16. Field M.G., Durante M.A., Decatur C.L. et al. Epigenetic reprogramming and aberrant expression of PRAME are associated with increased metastatic risk in class 1 and class 2 uveal melanomas // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7(37). – P. 59209–59219. – doi:10.18632/oncotarget.10962.
17. Robertson A.G., Shih J., Yau C. et al. Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma // *Cancer Cell*. – 2017. – Vol. 32(2). – P. 204–220.e15. – doi:10.1016/j.ccell.2017.07.003.
18. Eleuteri A., Damato B., Coupland S. E., Taktak A. Enhancing survival prognostication in patients with choroidal melanoma by integrating pathologic, clinical and genetic predictors of metastases // *Int. J. Biomed Eng. Technol*. – 2012. – Vol. 8. – P. 18–35.
19. DeParis S.W., Taktak A., Eleuteri A. et al. External Validation of the Liverpool Uveal Melanoma Prognosticator Online // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2016. – Vol. 57(14). – P. 6116–6122. – doi:10.1167/iovs.16-19654.
20. Walter S.D., Chao D.L., Feuer W. et al. Prognostic Implications of Tumor Diameter in Association With Gene Expression Profile for Uveal Melanoma

- // JAMA Ophthalmol. – 2016. – Vol. 134(7). – P. 734-740. – doi: 10.1001/jamaophthalmol.2016.0913.
21. Vaquero-Garcia J., Lalonde E., Ewens K.G. et al. PRiMeUM: A Model for Predicting Risk of Metastasis in Uveal Melanoma // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2017. – Vol. 58(10). – P. 4096-4105. – doi: 10.1167/iovs.17-22255.
 22. Shields C.L., Say E.A.T., Hasanreisoglu M. et al. 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. – Vol. 124(10). – P. 1523-1531. – doi: 10.1016/j.ophtha.2017.04.003.
 23. Яровая В.А., Клеянкина С.С., Яровой А.А. и др. Прогностическая биопсия меланомы хориоидеи: техника, морфологическая и молекулярно-генетическая диагностика // Современные технологии в офтальмологии. – 2017. – № 1. – С. 375-377.
 24. Singh A.D., Aronow M.E., Sun Y. et al. Chromosome 3 status in uveal melanoma: a comparison of fluorescence in situ hybridization and single-nucleotide polymorphism array // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2012. – Vol. 53(7). – P. 3331-3339. – doi: 10.1167/iovs.11-9027.
 25. van de Nes J. A., Nelles J. et al. Comparing the prognostic value of BAP1 mutation pattern, chromosome 3 status, and BAP1 immunohistochemistry in uveal melanoma // The American Journal of Surgical Pathology. – 2016. – Vol. 40(6). – P. 796-805. – doi:10.1097/PAS.0000000000000645.
 26. <http://www.vassarstats.net>.
 27. Sellam A., Desjardins L., Barnhill R. et al. Fine Needle Aspiration Biopsy in Uveal Melanoma: Technique, Complications, and Outcomes // Am. J. Ophthalmol. – 2016. – Vol. 162. – P. 28-34.
 28. Edge S.B., Brookland K.B., Jessup J.M. et al. AJCC Cancer Staging Manual: 8th Edition. — Springer, 2017.
 29. Klufas M.A., Richter E., Itty S. et al. Comparison of Gene Expression Profiling and Chromosome 3 Analysis by Fluorescent in situ Hybridization and Multiplex Ligation Probe Amplification in Fine-Needle Aspiration Biopsy Specimens of Uveal Melanoma // Ocul. Oncol. Pathol. – 2017. – Vol. 4(1). – P. 16-20. – doi: 10.1159/000468941.
 30. Bellerive C., Grossniklaus H.E., Singh A.D. Prognostication for Uveal Melanoma: Are Two Tests Better than One? // Ocul. Oncol. Pathol. – 2017. – Vol. 3(4). – P. 301-303. – doi: 10.1159/000472153.

Поступила в редакцию 22.03.2018 г.

A.R. Zaretsky^{1,2}, V.A. Yarovaya³, L.V. Chudakova²,
V.V. Nazarova⁴, L.V. Demidov⁴, A.A. Yarovoy³

Molecular testing of stage I–III uveal melanoma in the context of conservative or surgical treatment: our experience

¹N.I. Pirogov Russian National Research Medical University

²Ltd. Evrogen Lab

³S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution,

⁴N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology
Moscow

Molecular testing is a promising approach to differential diagnostics and especially to prognostication of uveal melanoma (UM). We have tested a complex biomarker panel that included pathology and a number of cytogenetic and molecular markers on a series of 58 UM samples as a part of a prospective clinical study. Testing of all biomarkers has proved feasible on both FFPE and FNA samples. Molecular verification of UM diagnosis via mutation analysis demonstrated very high sensitivity. Cytogenetic and molecular genetic classifications gave discordant results in most samples from our series; prognostic significance of this discrepancy is yet to be elucidated through final data analysis of this and other prospective studies.

Key words: uveal melanoma, prognosis, biomarkers, FNA biopsy, genetic testing, monosomy 3, 8q gain, mutations, E1-F1AX, SF3B1, BAP1