

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

На правах рукописи

КАБАРДИКОВА ЛЕЙЛА АЛИМОВНА

**«Прогнозирование эффективности лечения меланомы хориоидеи:
роль циркулирующих микроРНК»**

3.1.5. Офтальмология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Доктор медицинских наук,
профессор, академик РАН, заслуженный
деятель науки РФ

Бровкина Алевтина Фёдоровна;

Научный консультант:
Доктор медицинских наук, доцент
Мирзаев Карин Бадавиевич

Москва 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. Обзор литературы.....	16
1.1. Эпидемиология, клиника меланомы хориоидеи, проблема диагностики её метастазирования	16
1.2. Методы лечения меланомы хориоидеи и витальный прогноз.....	18
1.3. Способы выявления метастазов меланомы хориоидеи	20
1.4. Роль микроРНК в оценке эффективности лечения в общей онкологии	26
Глава 2. Материал и методы исследования	30
2.1. Характеристика обследованных пациентов.....	30
2.2. Методы исследования пациентов	33
2.3. Лабораторные методы исследования пациентов.....	34
2.4. Статистическая обработка результатов исследования	36
Глава 3. Результаты и их обсуждение.....	37
3.1. Брахитерапия и характер изменения микроРНК в плазме крови больных после лечения	37
3.1.1. Экспрессия микроРНК в первые 18 месяцев после брахитерапии	39
3.1.2. Экспрессия микроРНК в отдаленные сроки после брахитерапии	45
3.2. Энуклеация и её влияние на уровень экспрессии микроРНК в плазме крови больных.....	48
3.2.1. Характер экспрессии микроРНК в ранние и отдаленные сроки после энуклеации	48
3.2.2. Особенности экспрессии микроРНК-155 у больных меланомой хориоидеи.....	56
3.3. Гематогенные метастазы меланомы хориоидеи и реакция микроРНК в плазме крови больного.....	65
Заключение	76
Выводы	78
Практические рекомендации	79
Список литературы	80

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БТ	- брахитерапия
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
КТ	- компьютерная томография
мРНК	- матричная рибонуклеиновая кислота
МРТ	- магнитно-резонансная томография
МХ	- меланома хориоидеи
ОА	- офтальмоаппликатор
ОКТ	- оптическая когерентная томография
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПЭТ-КТ	- позитронно-эмиссионная компьютерная томография
РНК	- рибонуклеиновая кислота
УЗИ	- ультразвуковое исследование
УМ	- увеальная меланома
ЦОК	- циркулирующие опухолевые клетки
Cq	- значение порогового цикла ПЦР реакции
dCq	- значение разницы пороговых циклов ПЦР

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертации

Среди меланом сосудистой оболочки глаза наибольшую долю занимает меланома хориоидеи (МХ): её частота достигает 85-90%, причем у взрослых она является единственной первичной злокачественной опухолью хориоидеи [5, 46, 71]. Частота заболеваемости варьирует в зависимости от возраста, этнической принадлежности и географии проживания, и составляет по всему миру от 5,0 до 10,24 случаев на 1 млн взрослого населения [1, 141]. Эпидемиологические данные свидетельствуют о различиях в частоте МХ в разных регионах, причем в Европе частота выше на севере [116, 141].

МХ не только ухудшает зрительные функции, но и негативно влияет на витальный прогноз пациентов. Медиана выживаемости больных после выявления гематогенных метастазов опухоли, в первую очередь в печень (92-95%), в среднем составляет 12 месяцев [41, 110]. Именно поэтому в первую очередь целью локального лечения МХ является сохранение жизни больного и предотвращение развития метастатической болезни.

К факторам риска возникновения гематогенных метастазов МХ относят старший возраст пациентов, преэкваториальную локализацию опухоли с вовлечением в опухолевый процесс цилиарного тела, большие размеры опухоли, её эписклеральное распространение [41, 71]. Доказано, что при первичной МХ пятилетняя выживаемость больных снижается с 96% при I стадии до 26% у больных III стадии [49].

Оценка эффективности лечения злокачественных опухолей представляет собой сложную задачу как в общей онкологии, так и в офтальмоонкологии. Один из важных критериев эффективности проведенного лечения МХ – отсутствие гематогенного метастазирования. Гематогенные метастазы могут возникать и на ранних стадиях заболевания, а микрометастазы способны оставаться в состоянии покоя в течение нескольких лет без возможности их эффективного выявления [55, 102, 104, 119]. Метастазирование может возникать за 5 лет до постановки диагноза и начала лечения МХ [87, 129], а при первоначальном диагнозе МХ практически у 2% пациентов

обнаруживают метастазы в печень [59, 123]. После лечения первичной МХ метастазы могут возникнуть и спустя годы [47, 48, 122]. Таким образом, сроки появления метастазов у больных МХ варьируют.

Возможности раннего выявления метастазов МХ в печень значительно расширились с внедрением в клиническую практику визуализирующих методов исследования, особенно магнитно-резонансной (МРТ) и компьютерной (КТ) томографии [92, 110]. Было показано, что чувствительность и прогностическая ценность МРТ превосходит позитронно-эмиссионную компьютерную томографию (ПЭТ-КТ) ($p=0,01$) [118]. И все же метастазирование констатируют при визуализации опухолевого очага в печени размерами не менее 5 мм [55], риск возникновения которого не исчезает даже после удаления глаза и при формировании рубца на месте локального лучевого воздействия на опухоль.

Попытки поиска биомаркеров метастазирования увеальной меланомы (УМ) в периферической крови привели к изучению циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК), описанных еще в 1869 году [24]. В 2004 году обнаружили, что пациенты, страдающие раком молочной железы, с меньшим количеством ЦОК в крови живут дольше, чем те, у кого их больше [43]. Схожие результаты получили и при исследовании опухолей других локализаций, в том числе колоректального рака и рака простаты [96].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) рассматривают в литературе как основной метод выявления ЦОК при УМ. В одном из исследований, проведенном с участием пациентов при отсутствии метастазов в ходе наблюдения обнаружена экспрессия мРНК тирозинкиназы, рассматриваемой как маркер ЦОК. У части обследованных пациентов после проведенного лечения этот биомаркер перестал определяться, что было интерпретировано авторами как результат уменьшения опухолевой нагрузки вследствие удаления опухолевого очага из организма [96]. Полученные данные позволили предположить, что предтерапевтическое выявление мРНК тирозинкиназы методом ПЦР может служить предиктором неблагоприятного витального прогноза.

Сложность данного метода остается в отделении опухолевых клеток от остальных клеток крови [145]. Высокая частота выявления ЦОК, вероятно, связана с более чувствительным протоколом (большее число образцов и повторные ПЦР), при сохранении риска ложноположительных результатов из-за межлабораторных и технических вариаций [43].

Указанные расхождения стали основанием для дальнейшего поиска оптимального биомаркера плазмы крови для УМ, сместившей научный интерес в сторону анализа микроРНК.

Степень разработанности проблемы

Молекулы микроРНК изучают на протяжении более 30 лет с момента открытия их роли в 1993 году [83]. Путем многолетних исследований и наблюдений доказано, что этот класс малых некодирующих РНК с важными посттранскрипционными регуляторными функциями играет роль в физиологических процессах в норме и при патологических состояниях, в том числе онкогенезе [23, 106]. В зависимости от своих функций, они могут быть разделены на две группы: онкогены и онкосупрессоры, изменение уровня экспрессии которых в ткани или биологических жидкостях организма, включая плазму крови, играет роль в стимуляции или подавлении онкогенеза путем регуляции роста, пролиферации и апоптоза клеток [106].

МикроРНК, участвуя в патогенезе злокачественных новообразований, играют важную роль и в уточнённой молекулярной диагностике опухолей, включая МХ [4]. Исследования профиля микроРНК при УМ были инициированы в 2008 году после проведения сравнительного анализа уровней их экспрессии в тканях первичной опухоли и метастатических очагов, что позволило выявить молекулярные различия, потенциально значимые для прогноза [146]. Спустя четыре года в зарубежной научной литературе опубликованы первые данные, свидетельствующие о возможности анализа экспрессии микроРНК в плазме периферической крови таких больных [138]. Следует отметить, что исследование проводили на фоне существующих метастазов МХ.

К настоящему времени в клинической практике аннотировано 2707 микроРНК [73]. В контексте УМ изучено 13 микроРНК, вовлечённых в молекулярные механизмы опухолевого роста и прогрессии, что отражает растущий интерес к выявлению потенциальных биомаркеров данного заболевания.

В России первые научные работы по изучению циркулирующих микроРНК, выявляемых в плазме крови у больных МХ, начали проводить с 2020 года. Впервые в отечественной научной практике проведена системная оценка уровней экспрессии микроРНК-223, микроРНК-155, микроРНК-126 и микроРНК-146а как потенциальных молекулярных маркеров, отражающих биологическое поведение опухоли. Особенно важно подчеркнуть, что в рамках клинической практики впервые начато изучение микроРНК-27b, ранее не исследовавшейся в контексте МХ [7]. Однако в литературе в настоящее время при проведении поиска в отечественных и зарубежных научных ресурсах не обнаружены сведения о значимости экспрессии микроРНК в оценке эффективности локального лечения этой опухоли.

МикроРНК, благодаря своей устойчивости в биологических жидкостях и специфичности к целевым мРНК [68], предоставляют возможность малоинвазивно оценить активность опухолевых процессов и эффективность проведенного лечения. В клинической практике это позволяет не только отслеживать динамику болезни, но и прогнозировать её течение.

МикроРНК играют ключевую роль в регуляции генной экспрессии и могут служить биомаркерами для оценки реакции опухоли на лечение и риска развития метастазов [25, 150, 151]. Изменение экспрессии микроРНК в крови зарегистрировано при различных видах рака в ответ на хирургическое или лучевое лечение. Так, в ходе наблюдений после проведения иммунотерапии рака молочной железы было зафиксировано снижение исходно повышенного уровня экспрессии микроРНК в периферической крови, а также у пациентов с немелкоклеточным и плоскоклеточным раком лёгкого, гепатоцеллюлярной карциномой и колоректальным раком [22, 58, 75, 84, 85, 103, 144]. Сходные изменения экспрессии микроРНК были отмечены и при хирургическом удалении опухолевого очага: снижение уровней микроРНК наблюдалось у

больных с немелкоклеточным раком лёгкого, колоректальным раком, раком молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномой, а также папиллярным раком щитовидной железы. Отдельные работы указывают на потенциал микроРНК в качестве маркера эффективности лучевой терапии [40, 108, 134].

Измерение экспрессии циркулирующих микроРНК в плазме крови дает возможность получения малоинвазивной и более точной оценки эффективности лечения злокачественных опухолей. В отношении МХ таких исследований на данный момент нет. Таким образом, исходя из представленных данных, была определена цель данного исследования.

Цель исследования: изучить изменения уровня экспрессии циркулирующих микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 и их роль в прогнозировании эффективности брахитерапии и энуклеации больных меланомой хориоидеи.

Для реализации поставленной цели сформулированы следующие **задачи**:

1. Провести анализ профиля экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 в плазме крови больных меланомой хориоидеи до и после проведения брахитерапии в разные сроки наблюдения.
2. Исследовать особенности экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 в постлучевом периоде у пациентов с меланомой хориоидеи с учетом исходных размеров опухоли
3. Проанализировать изменение уровня экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 в плазме крови больных меланомой хориоидеи до и после энуклеации в разные сроки наблюдения
4. Проанализировать экспрессию микроРНК-155 в плазме крови пациентов, принимая во внимание морфологические и биологические характеристики микроокружения меланомы хориоидеи
5. Изучить характер экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 на фоне метастатического процесса у пациентов с меланомой хориоидеи.

Материал и методы исследования

Обследовано 124 больных МХ в стадии N_0M_0 , средний возраст $60,65 \pm 13,05$ (22-83 лет). Из них 41 пациент получил брахитерапию (БТ) офтальмоаппликаторами (ОА), в процессе наблюдения метастазы развились у 2 больных. Энуклеация выполнена у 83 пациентов, среди которых метастазы в процессе наблюдения выявлены у 7 больных. Экспрессионный профиль микроРНК в плазме периферической крови пациентов с МХ оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени до и после лечения в процессе наблюдения. В группу контроля включено 28 волонтеров, средний возраст $62,9 \pm 1,42$ (45-78 лет), не имеющих ни опухолевых, ни хронических аутоиммунных заболеваний.

Исследование было проведено в период с 2022 по 2025 год на кафедре офтальмологии ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России и на клинической базе ГБУЗ «Московский городской офтальмологический центр» ММНКЦ им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы. Лабораторную часть работы, включающую анализ экспрессии микроРНК, выполняли на базе НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО «РМАНПО». Патогистологическое исследование энуклеированных глаз осуществляли в патологоанатомическом отделении ГБУЗ «ММНКЦ им. С.П. Боткина» ДЗМ.

Диссертационное исследование проведено при поддержке Российского научного фонда в рамках реализации научного проекта №24-25-00340.

Все пациенты были обследованы в плановом порядке согласно общепринятой клинической схеме, предусматривающей обязательное проведение биомикроофтальмоскопии, цифровой фоторегистрации картины глазного дна, эхобиометрии глаза и опухоли, а также оптической когерентной томографии при наличии технических условий для её выполнения. Патогистологическое исследование энуклеированных глаз проводили с обязательным выполнением иммуногистохимического анализа, включающего выявление и количественную оценку лимфоидных клеток в пределах опухолевой ткани и её микроокружения. С целью исключения метастатического процесса в ходе наблюдения всем пациентам было проведено

инструментальное обследование с применением КТ или МРТ органов грудной клетки и брюшной полости.

Научная новизна работы:

Впервые изучен характер изменения экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b и микроРНК-155 в плазме крови больных меланомой хориоидеи в динамике после проведения брахитерапии и энуклеации с целью оценки эффективности проведенного лечения.

Доказано постепенное снижение уровня микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 в плазме крови больных начальной и средней меланомой хориоидеи после брахитерапии по мере уменьшения размера опухолевого узла (патент №2839875 13.05.2025).

Впервые установлено, что у пациентов с меланомой хориоидеи после брахитерапии опухоли или энуклеации глаза наблюдается повышение уровня циркулирующей в плазме крови микроРНК-27b как при явном метастатическом процессе, так и в случаях скрытого метастазирования (патент №2828566 от 14.10.2024).

Установлена взаимосвязь между уровнем экспрессии микроРНК-155 в плазме крови у пациентов с меланомой хориоидеи и характером лимфоидной инфильтрации как в пределах опухоли, так и в её микроокружении, что может опосредованно свидетельствовать о наличии метастазирования.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты исследования уровня экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 в плазме крови больных меланомой хориоидеи до и после энуклеации или брахитерапии позволяют прогнозировать эффективность проведенного лечения, выявлять скрытое метастазирование до возможности его инструментального выявления.

Методологическая и теоретическая база исследований

Настоящее исследование опирается на теоретическую базу, сформированную на основе анализа научных трудов российских и зарубежных авторов,

рассматривающих значение микроРНК в механизмах онкогенеза МХ. Кроме того, в рамках теоретической части были изучены данные о динамике уровней экспрессии микроРНК в плазме крови пациентов с опухолями различной локализации в ответ на проведение хирургического вмешательства или лучевую терапию по поводу злокачественного новообразования.

Методология исследования включала в себя исследования, направленные на диагностику первичного очага (визометрия, статическая компьютерная периметрия, пневмотонометрия, биомикроофтальмоскопия, цифровая фоторегистрация глазного дна, ультразвуковая биометрия, оптическая когерентная томография при технической возможности её проведения), а также после лечения с целью динамического наблюдения больных. Патогистологическое исследование удаленных глаз проводили в том числе с выявлением и подсчетом степени лимфоидной инфильтрации меланомы хориоидеи и ее микроокружения. Определение уровня и особенностей экспрессии микроРНК в плазме крови пациентов на различных этапах наблюдения осуществлялось методом ПЦР в режиме реального времени.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Снижение уровня экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 у больных меланомой хориоидеи после брахитерапии в разные сроки наблюдения - объективное доказательство эффективности лечения.
2. Снижение экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 в плазме крови больных начальной и средней меланомой хориоидеи после брахитерапии происходит до уровня контрольных значений и ниже, ассоциируясь с регрессом опухоли. При больших меланом хориоидеи после брахитерапии отсутствует полная регрессия опухоли, что сопровождается сохранением экспрессии исследованных микроРНК на высоком уровне.
3. Снижение уровня экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 в плазме крови больных меланомой хориоидеи в процессе наблюдения после энуклеации - свидетельство эффективности лечения.

4. Риск развития гематогенного метастазирования повышается с появлением лимфоидной инфильтрации ткани опухоли и ее микроокружения, что ассоциировано с высоким уровнем микроРНК-155. Увеличение экспрессии микроРНК-27b в плазме крови больных меланомой хориоидеи в посттерапевтическом периоде (энуклеация и брахитерапия) ассоциировано с метастазированием опухоли.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Достоверность полученных данных обусловлена репрезентативностью клинической выборки, включающей обследование пациентов с МХ (n=124), а также лиц контрольной группы (n=28), не имеющих признаков опухолевых или аутоиммунных заболеваний. В рамках исследования были применены современные офтальмологические методы диагностики, такие как биомикроофтальмоскопия, цифровая фоторегистрация опухолевого очага, эхобиометрия и, при наличии технической возможности, оптическая когерентная томография. Обработку полученных данных осуществляли с применением стандартных методов статистического анализа с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel и пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics версии 27.0 (США).

Апробация

Апробация диссертации состоялась 5 июля 2025 г. на расширенном заседании кафедры офтальмологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (Протокол от 05.07.2025 № 9).

Внедрение результатов исследования в практику

Полученные в диссертационном исследовании результаты внедрены в практическую деятельность офтальмоонкологического отделения Московского городского офтальмологического центра ГБУЗ «ММНКЦ им. С.П. Боткина» ДЗМ. Ключевые положения работы нашли применение при разработке учебных программ циклов профессиональной переподготовки и повышения квалификации врачей-офтальмологов, в части, посвящённой офтальмоонкологии.

Личный вклад автора в проведенное исследование

В рамках исследования автор провёл целенаправленный обзор отечественной и зарубежной литературы по заявленной теме. Все пациенты были обследованы им как до начала лечения, так и в ходе последующего наблюдения после его завершения. Полученные в ходе работы результаты были структурированы автором, проведен статистический анализ, сформулированы выводы и подготовлены тексты научных публикаций.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Содержание диссертационного исследования соответствует формуле и паспорту научной специальности 3.1.5 – «Офтальмология». В рамках обозначенного направления в работе рассмотрены подходы к оценке эффективности лечения больных меланомой хориоидеи с учетом реакции показателей циркулирующих микроРНК на брахитерапию опухоли и энуклеацию глаза и сопоставления результатов исследования до и после проведения лечения.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 7 научных работ в журналах и сборниках научных трудов. Из них 3 статьи - в печатных изданиях, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК РФ, 2 патента РФ на изобретение:

1. Бровкина А. Ф., Мирзаев К. Б., **Кабардикова Л. А.**, Цыбикова Н. Д. Меланома хориоидеи: энуклеация по-прежнему актуальна? // Российский офтальмологический журнал. – 2024. – Т. 17, № 4. – С. 7–13.
2. Бровкина А. Ф., Мирзаев К. Б., **Кабардикова Л. А.** Способ оценки риска метастазирования после энуклеации глаза с большими меланомами хориоидеи: пат. RU 2828566 С1 Рос. Федерация. № заявки 2024105575; заявл. 04.03.2024; опубл. 14.10.2024.

3. **Кабардикова Л. А.** МикроРНК-27b как биомаркер метастазирования меланомы хориоидеи // Медицинская наука: вчера, сегодня, завтра : сб. статей и тезисов. — М. : Тритон, 2024. — С. 1941–1948.
4. **Кабардикова Л. А.,** Стешенко О. Н. Меланома хориоидеи и ретинит Коатса как маскарадный синдром. Роль биологических маркеров в уточнении диагноза // Вятский медицинский вестник. — 2024. — Т. 84. — № 4. — С. 78-82.
5. **Кабардикова Л.А.** МикроРНК плазмы крови больного увеальной меланомой — доказательство скрытого метастазирования // Материалы XV научно-практической конференции молодых ученых РМАНПО. — М., 2024. — С. 171–172.
6. Бровкина А.Ф., **Кабардикова Л.А.,** Щербаков П.А., Буре И.В., Мирзаев К.Б. Увеальная меланома и ее локальное воспаление — добро или зло для больного? // Вестник офтальмологии. — 2025. — Т. 141, № 1. — С. 5–12.
7. Бровкина А. Ф., Мирзаев К. Б., **Кабардикова Л. А.,** Буре И. В. Способ оценки эффективности брахитерапии начальных и средних меланом хориоидеи: пат. RU 2839875 С1 Рос. Федерация. № заявки 2024119520; заявл. 11.07.2024; опубл. 13.05.2025.

Всего по тематике проведённого исследования представлено 8 научных докладов, включающих выступления на конференциях молодых учёных Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования, а также на международных научных форумах с последующим опубликованием тезисов, отражающих основные результаты работы.

Структура и объем диссертации

Диссертационное исследование изложено на 99 страницах машинописного текста и включает структурные разделы: введение, аналитический обзор литературы, описание материалов и методов, раздел с результатами и их обсуждением, заключение, формулировку выводов, практические рекомендации, перечень использованных источников и список сокращений. Работа содержит 12 таблиц и 27 рисунков.

Библиографический список - 156 наименований, среди которых представлены 19 отечественных и 137 зарубежных источников.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Эпидемиология, клиника меланомы хориоидеи, проблема диагностики её метастазирования

Меланома хориоидеи (МХ) доминирует среди меланом сосудистой оболочки глаза, занимая до 85-90% всех случаев, и является единственной первичной злокачественной опухолью хориоидеи у взрослых [5, 46, 71]. Частота заболеваемости варьирует в зависимости от возраста, этнической принадлежности и географии проживания, и составляет по всему миру от 5 до 10 случаев на 1 млн населения в год [1, 141]. Эпидемиологические данные свидетельствуют о различиях в частоте МХ в разных регионах, причем в Европе частота выше на севере [116, 141].

Возникать МХ может как первично, так и из предсуществующего невуса. Источник её развития - меланоциты, что и приводит к окраске опухоли от аспидно-серого до светло-желтого цвета. Опухоль по локализации подразделяют на пре- и постэкваториальную, на последнюю приходится до 57% МХ [5]. Этиология все ещё остается неясной, фактором риска остается старший возраст больных [71]. В хориоидеи меланома растёт, как правило, монолатерально и в виде одиночного узла, начинает свое развитие в наружных её слоях (артериолярный слой хориоидеи).

С морфологической точки зрения меланома подразделяется на веретеночлесточный, эпителиоидночлесточный и смешанный тип, последний из которых характеризуется наличием в опухолевой ткани члесточных элементов обоих первых типов. Веретеночлесточный тип опухоли связывают с более благоприятным прогнозом, в то время как присутствие эпителиоидного компонента в составе смешанночлесточной и эпителиоидночлесточной морфологии опухоли достоверно значительно увеличивает риск метастазирования [18, 69, 71, 93].

Клиническая картина МХ включает такие офтальмоскопические признаки, как одиночный проминирующий очаг, наличие в нем новообразованных не всегда визуально определяемых сосудов, дистрофические изменения в надлежащей сетчатке, что приводит к функциональным нарушениям зрения. Жалобы на метаморфопсии, а также появление “искр”, “вспышек”, сопровождающие возникновение вторичной

отслойки сетчатки, зачастую являются первыми симптомами и поводом обращения пациентов к офтальмологу, где около 30% первичных опухолей выявляется случайно [32, 45].

МХ, ухудшая зрительные функции, негативно влияет на витальный прогноз пациентов. Учитывая особенности развития меланомы в хориоидее, обоснована склонность её к гематогенным метастазам. Основным таргетным органом считают печень (93-95%) [41, 110]. По данным литературы, медиана выживаемости больных после выявления гематогенных метастазов опухоли, несмотря на предпринимаемые попытки их лечения, составляет 12-28 месяцев [82, 110, 112, 148]. Таким образом, исход МХ – плохой витальный прогноз пациентов. Поэтому в первую очередь целью локального лечения МХ является сохранение жизни больного и предотвращение развития метастатической болезни.

Среди факторов, повышающих вероятность гематогенного метастазирования МХ, выделяют старший возраст пациентов, большие размеры опухоли, близкую расположенность к цилиарному телу и к диску зрительного нерва, инфильтрацию ткани самой опухоли и её микроокружения лимфоидными клетками, локальный рецидив опухоли после проведенного лечения, быструю регрессию опухоли после локальной лучевой терапии, а также прорастание склеры [27, 53, 79, 90, 94]. Наличие у пациента более двух из перечисленных симптомов говорит в пользу уже имеющихся гематогенных метастазов опухоли [114].

Как считают некоторые авторы, практически у половины всех больных первичной МХ спустя 2–3 года после установления диагноза и начала лечения развиваются метастазы [50]. По другим данным, примерно у 40% пациентов с МХ выявляют гематогенное метастазирование в печень в течение 10 лет после первичного диагноза и лечения опухоли [128]. Следует отметить, что на момент постановки диагноза среди первично обратившихся к офтальмологу пациентов приблизительно у 2% уже имелись выявленные инструментально метастазы в таргетные органы [130]. Л.Т. Хи с соавт. подчеркивают важность появления метастазов и у больных с начальными МХ [148]. В течение пятилетнего периода наблюдения метастазирование выявляется

у 16% пациентов с начальными меланомами хориоидеи, тогда как при опухолях средних и больших размеров этот показатель составляет 32% и 53% соответственно [121]. Таким образом, частота гематогенного метастазирования МХ после лечения обосновывает необходимость пожизненного наблюдения за больными и регулярного обследования с целью наиболее раннего его выявления.

1.2. Методы лечения меланомы хориоидеи и витальный прогноз

Выбор метода лечения МХ зависит от многих факторов, среди которых размер опухоли, её стадия (проращение оболочек глаза), локализация. С момента первого описания внутриглазной меланомы в 1583 году (греч. μέλας «чёрный» + -ομα «опухоль») вплоть до середины XX века единственным методом её лечения оставались энуклеация или экзентерация орбиты [21]. Однако даже после применения таких, казалось бы, радикальных методов лечения у больных возникали гематогенные метастазы. Как предполагал Zimmerman L. в 1979 году, причиной этому может быть миграция опухолевых клеток в системный кровоток вследствие сильных колебаний внутриглазного давления во время проведения энуклеации, что, как считал автор, требовало изменения техники самой операции [156].

Попытки органосохранного лечения, преследующие цель сохранить глаз и его функции, начали предпринимать еще в начале XX века. Локальное облучение МХ в виде БТ как транссклерального облучения внутриглазных опухолей используют со второй половины XX века. Высокая эффективность БТ с помощью ОА, как самостоятельного метода лечения МХ, подтверждена многолетними наблюдениями, и на сегодняшний день обоснованно признана «золотым стандартом» лечения при начальных и средних размерах МХ [1, 34]. В поддержку этого утверждения можно привести данные, представленные в статье J.T. Luo с соавторов, где на обширной выборке (более 700 пациентов с МХ) установлено, что эписклерально БТ применяется у 76% больных, тогда как локальная резекция опухоли используется в 3,2% случаев, а лазерная терапия – у 9,9% [88]. Следует отметить, что речь идет о МХ, размеры которых не превышают 5,5 мм по толщине и 15 мм по максимальному базальному диаметру [1, 30, 111]. В указанных условиях достигается локальный контроль за

опухолью - до 90% наблюдений [37, 117], однако, несмотря на это, у 40% пациентов и более в отдаленной перспективе развивается метастатическая болезнь в течение 10 лет наблюдения, преимущественно с локализацией в печени [6].

Данные, представленные в литературе, демонстрируют устойчивую положительную оценку эффективности БТ при сроках наблюдения от трех лет и более, что подтверждено, в частности, результатами, опубликованными в работе Markiewicz A. с соавторами [91]. Согласно обобщенным клиническим наблюдениям, пятилетняя выживаемость пациентов с МХ после проведения БТ составляет от 72% до 92%, а к десятилетнему периоду наблюдения – около 62% [12, 60]. Установлено, что размеры опухоли на момент начала лечения оказывают значимое влияние на сроки наступления метастатического процесса [14, 82, 125]. Так, в исследовании, включавшем в себя 8033 пациента с УМ, частота метастазирования через 10 лет варьировала в зависимости от толщины опухоли: при толщине 1 мм метастазы развивались у 5% пациентов, при толщине 2 мм – у 10%, а при толщине 6 мм – у 30% [122]. Наилучшие клинические результаты достигнуты при лечении МХ начальных и средних размеров, где пятилетняя выживаемость после БТ составила 92,8% больных. Напротив, при облучении больших МХ этот показатель снизился до 46,6% [16].

В настоящее время четкие показания к проведению БТ при МХ определяются, прежде всего, размерами опухоли при обязательном инструментальном подтверждении отсутствия отдаленных метастазов в органы-мишени. Подлежат БТ опухоли с максимальной проминенцией до 5 мм и максимальным диаметром не более 15 мм. Оценку ответа на БТ проводят, как правило, через 3 месяца после проведения локального облучения, а полноценная оценка характера резорбции опухоли становится возможной не ранее чем через 24 месяца после БТ. В дальнейшем контроль за клиническим течением облученной опухоли проводят с периодичностью каждые 3 месяца в течение первого года наблюдения, а затем – дважды в год. Следует отметить, что пациенты, получившие лечение по поводу МХ, в России подлежат пожизненному диспансерному наблюдению. Такая тактика является обоснованной, что подтверждается данными литературы о возможности развития как местных рецидивов,

так и отдаленных метастазов в крайне поздние сроки – от 20 до 40 лет после первичного лечения [47, 65, 95]. Согласно данным литературы, уровень 5-летней выживаемости у больных МХ после БТ составили 84-93%, а после энуклеации – 77-85% [13, 122], в то время как некоторые авторы считают, что метод лечения первичной УМ не влияет на выживаемость [124].

1.3. Способы выявления метастазов меланомы хориоидеи

Проблема ранней диагностики метастатической болезни МХ остается открытой. Вопрос раннего выявления метастазов, и особенно в печень, играет большую роль в прогнозировании продолжительности жизни пациента. Существует мнение, что выявление метастазов УМ в органах-мишенях после проведения лечения есть свидетельство микрометастазирования опухоли за несколько лет до самого лечения [55]. Как показывают исследования, при длительном наблюдении за больными, данная концепция действительно имеет место быть [65, 95], однако на сегодняшний день не существует достоверных инструментальных или лабораторных методов, позволяющих выявить эти микрометастазы на доклинической стадии.

В настоящее время в процессе наблюдения за больными МХ остается важным и, порой, трудно решаемым вопрос раннего выявления метастазирования. В США ультразвуковое исследование (УЗИ) печени и определение уровней печеночных ферментов в крови используют в качестве методов наблюдения за такими больными, однако исследования показали их невысокую чувствительность в раннем выявлении метастазов (только у 1-2% пациентов) [128]. В Европе и в России отдают предпочтение КТ и МРТ внутренних органов [1, 152]. На сегодняшний день МРТ считают наиболее чувствительным инструментальным методом для выявления метастазов МХ, обеспечивая возможность визуализации очагов размером от 5 мм и более [31, 110]. Обследование органов грудной клетки и брюшной полости проводят с помощью МРТ, КТ, ПЭТ-КТ первые 2 года после лечения 1 раз в 6 месяцев, затем 1 раз в год как у пациентов после органосохранного лечения, так и у пациентов после энуклеации или экзентерации. По данным Eskelin S. и соавт. (2000), от начала метастатической диссеминации УМ до клинической манифестации метастазов в среднем

проходит 2,2 года, поэтому, исходя из предполагаемых темпов роста, рациональным интервалом наблюдения для их выявления считают 4–6 месяцев [55].

Остаются неэффективными методы лечения множественных метастазов, но развиваются методы локального лечения одиночного метастаза в печень. В некоторых случаях лечение единичных очагов системной или внутripеченочной химиотерапией или частичной резекцией печени может продлевать жизнь больных [152]. Выявление ранних метастазов до их клинико-инструментального проявления после локального лечения МХ имеет принципиально важное значение не только в плане витального прогноза, но и может явиться базой для создания таргетного лечения метастазов на ранних стадиях их развития.

Биологическая роль микроРНК в патогенезе меланомы хориоидеи

В патогенезе МХ в последние два десятилетия определенное значение уделяют молекулярно-генетическим изменениям. Открытие роли молекул микроРНК изменило понимание об эпигенетической регуляции физиологических процессов в норме и патологии, в том числе при канцерогенезе. В 1993 году исследовательская группа V. Ambros из Гарвардского университета, изучая механизмы регуляции развития у нематод (круглых червей) впервые убедительно показала специфическую физиологическую роль коротких молекул РНК – регуляцию экспрессии генов, что позднее привело к выделению отдельного класса микроРНК, ранее трактовавшихся как случайные обломки деградации РНК, лишённые биологической функции [83]. МикроРНК, которых у человека на 2023 год аннотировано и зафиксировано в базах данных микроРНК 2707 [73], представляют собой класс некодирующих коротких молекул (18-25 нуклеотидов), участвующих в канцерогенезе, где они могут выполнять двойственную биологическую функцию, выступая как в роли онкосупрессоров, подавляющих рост опухоли, так и в качестве онкогенов, способствующих опухолевой прогрессии за счёт прямой стимуляции пролиферации злокачественных клеток или посредством иммуносупрессивного воздействия. Механизмы их действия реализуются на транскрипционном, посттранскрипционном и трансляционном уровнях

путём специфического связывания с комплементарными участками целевых матричных РНК [120].

В 2002 году появилось первое сообщение о роли микроРНК (микроРНК-15 и микроРНК-16) в развитии хронического лимфолейкоза [36]. Это и последующие исследования показали участие молекул микроРНК в онкогенезе опухолей различных локализаций. Первая научная публикация, посвящённая возможной роли микроРНК в патогенезе МХ, датируется 2008 годом [146]. В данном исследовании авторы проанализировали экспрессию различных микроРНК в ткани первичного опухолевого узла, полученного из энуклеированных глаз, а также в метастатических очагах в печени. Отмечено повышение экспрессии *let-7b* и *miR-199a*, что дало основания рассматривать эти микроРНК как вовлечённые в механизмы метастазирования меланомы хориоидеи. В своем исследовании J. Wroblewska и соавт., проанализировали 46 образцов ткани увеальной меланомы после энуклеации и выявили статистически значимые сдвиги профиля микроРНК: у пациентов с развившимися впоследствии гематогенными метастазами фиксировали повышение уровней *hsa-miR-346*, *hsa-miR-1247* и *hsa-miR-592* при одновременном снижении *hsa-miR-513c* и *miR-506* [147]. Таким образом, доказана роль молекул микроРНК в онкогенезе УМ. Следует отметить, что исследования эти проводили непосредственно в ткани первичной опухоли, что может ограничивать возможность оценки активности биомаркеров при проведении органосохранного лечения УМ, поскольку проведение тонкоигольной аспирационной биопсии этой опухоли может сопровождаться жизнеугрожающими осложнениями [126].

В дальнейшем, доказано, что микроРНК могут быть обнаружены не только в ткани, но и в биологических жидкостях организма, в том числе плазме циркулирующей крови [97]. В 2012 году исследовательская группа под руководством Triozzi P. опубликовала первые данные, свидетельствующие о положительных результатах при анализе уровня экспрессии шести микроРНК в плазме крови пациентов с УМ [138].

В последующие годы продолжена работа по изучению большего количества микроРНК в качестве биологических маркеров в плазме крови больных МХ. В исследовании, проведенном Achberger S. с соавторами в 2014 году, установлено, что у пациентов с подтвержденными с помощью инструментальных методов гематогенными метастазами УМ, уровни экспрессии микроРНК-223, микроРНК-155 и микроРНК-146а в плазме крови были значительно повышены [20]. Дальнейшие исследования подтвердили связь дерегуляции циркулирующих микроРНК при УМ и её гематогенных метастазах. В данных работах анализируют показатели экспрессии на фоне уже доказанных метастазов опухоли, а характер экспрессии микроРНК определяют однократно.

Выявлена высокая диагностическая значимость повышения экспрессии микроРНК-211 в плазме крови больных с метастатической УМ [132]. Из 55 обследованных больных только в одном случае удалось проанализировать уровень экспрессии микроРНК в плазме крови повторно через 1 год после лечения, где в панели из шести микроРНК повышение экспрессии зарегистрировано только по микроРНК-211, что предшествовало инструментальному выявлению метастазов у данного больного за 12 месяцев. Авторы опасаются делать однозначные выводы на одном случае, однако данные результаты свидетельствуют о возможной тенденции возникновения дерегуляции микроРНК плазмы крови на фоне скрытого метастазирования.

Научные исследования, направленные на оценку диагностического потенциала изменений экспрессии микроРНК в плазме крови у пациентов с МХ, проводят в России с 2020 года. В рамках этих работ особое внимание уделено анализу экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155, микроРНК-146а и микроРНК-126 [3, 4, 7]. Проведённые исследования подтвердили участие молекул микроРНК в механизмах онкогенеза МХ, при этом наибольшая активность была зафиксирована в отношении микроРНК-223 и микроРНК-27b. Доказано повышение уровня экспрессии исследованных микроРНК по мере увеличения размеров первичной опухоли ($p < 0,05$).

Вопросы раннего (скрытого) метастазирования злокачественных опухолей начали привлекать внимание исследователей в XX веке [43], когда стали изучать вопрос обнаружения циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови, которые неизбежно сопровождают процесс метастазирования.

Таблица 1

Сравнительная характеристика биомаркеров крови в диагностике злокачественных новообразований

Критерий	микроРНК	Белковые маркеры	ЦОК
Тип биомаркера	Молекулы нуклеотидов	Белки, продуцируемые опухолевыми или нормальными клетками в ответ на опухоль	Целые опухолевые клетки, попадающие в кровоток из опухоли
Метод выявления	ПЦР в режиме реального времени, секвенирование, микрочипы	Иммуноферментный анализ, масс-спектрометрия, иммуногистохимия	Иммуноцитохимия, микрофлюидика
Стабильность	Высокая (устойчивы к деградации в крови, связаны с белками или экзосомами)	Низкая (легко деградируют)	Низкая (клетки могут разрушаться, требуют быстрой обработки)
Чувствительность	Высокая (могут обнаруживаться на ранних стадиях)	Переменная (зависит от конкретного маркера и стадии заболевания)	Умеренная (зависит от количества клеток, при ранних стадиях их мало)
Специфичность	Умеренная (одна и та же микроРНК может быть связана с различными видами рака)	Переменная (некоторые маркеры специфичны, другие могут быть повышены при различных состояниях)	Высокая (специфичны для конкретной опухоли)
Трудоемкость и стоимость	Умеренная (требует специализированного оборудования и реагентов)	Высокая (методы выделения и анализа СТС технически сложны и дороги)	Низкая (широко распространены и относительно недороги)

Идеальный биомаркер крови в диагностике злокачественных опухолей должен обладать следующими свойствами: высокая специфичность и чувствительность (с

целью минимизации ложноположительных результатов, возможности быть обнаруженными даже при минимальных количествах), органоспецифичность, минимальная инвазивность его получения, возможность изучения в динамике для оценки ответа на лечение и выявления прогрессирования заболевания. Сравнение различных биомаркеров опухолей в крови представлено в таблице 1.

Циркулирующие в плазме крови больных МХ микроРНК могут оказаться полезными биомаркерами как в оценке эффективности локального лечения, так и дальнейшего течения заболевания, в том числе и раннего выявления микрометастазов опухоли. Поскольку молекулы микроРНК циркулируют в составе микровезикул, это обеспечивает их относительную стабильность к ферментам РНКазам, а присутствие в плазме крови делает их более доступными для изучения [95]. Преимуществами их перед другими биомаркерами является высокая чувствительность, специфичность, стабильность образцов при их длительном хранении. Основным недостатком микроРНК как биомаркеров можно считать высокую вариабельность уровня их экспрессии, которая связана со склонностью данных молекул к плеiotропности: одна микроРНК может воздействовать на множество генов-мишеней с разными эффектами [153].

Преимущества биомаркеров крови перед тканевыми в доступности их получения и регулярного изучения в динамике. Таким образом, можно сделать вывод о перспективности циркулирующих микроРНК в качестве биомаркеров крови в онкологии благодаря высокой чувствительности и способности выявлять ранние изменения, предшествующие их клиническим проявлениям.

К настоящему времени доказана роль в онкогенезе УМ 13 молекул микроРНК (микроРНК-16, микроРНК-20а, микроРНК-92b, микроРНК-106а, микроРНК-125b, микроРНК12b, микроРНК146а, микроРНК-155, микроРНК-181а, микроРНК-199а, микроРНК-199а-5p, микроРНК-223, микроРНК-27b) [3, 62, 105, 115, 137, 143, 149]. В литературе к настоящему моменту при проведении поиска в отечественных и зарубежных научных ресурсах не обнаружены сведения о значимости экспрессии микроРНК в оценке эффективности локального лечения УМ.

1.4. Роль микроРНК в оценке эффективности лечения в общей онкологии

Прогностические биомаркеры злокачественных новообразований, свидетельствующие о прогрессировании заболевания, имеют важное клиническое применение. По данным литературы, многочисленные исследования, посвященные изучению микроРНК в качестве биомаркеров эффективности лечения злокачественных опухолей, показали, что проводимая хирургическая резекция или локальное облучение опухолей различных локализаций влияет на характер экспрессии микроРНК в плазме крови больных в соответствии с дальнейшим клиническим течением заболевания, а также ролью самой микроРНК - понижение или повышение уровня экспрессии в соответствии с онкогенной или онкосупрессорной функцией микроРНК (таблица 2).

Первые исследования, посвященные изучению данного вопроса, датируются 2012 годом и продолжаются и в настоящее время. Как видно из таблицы 1, подавляющее большинство работ свидетельствует о *снижении* уровня экспрессии микроРНК у больных после лечения, за исключением больных с колоректальным раком, в патогенезе которого микроРНК-24, микроРНК-320а и микроРНК-423-5р выполняют роль онкосупрессоров, закономерно повышаясь после проведенной резекции опухоли [57].

Сроки проведения повторного анализа уровня экспрессии микроРНК в указанных работах колебались от 7 дней до 24 месяцев по окончании лечения. В целом, отмечена четкая тенденция снижения экспрессии как в ранние сроки, так и сохранение низких показателей при более длительных сроках наблюдения при условии благополучного общеклинического течения заболевания. В результате авторами выявлено повышение показателей экспрессии микроРНК, вероятно, играющих онкогенную функцию, при рецидиве или метастазировании злокачественной опухоли [67, 86, 109].

Изменение уровня экспрессии микроРНК в плазме крови онкологических пациентов на фоне хирургического или лучевого лечения опухоли

Локализация опухоли	МикроРНК	Характер изменения экспрессии	Сроки контрольного исследования
Рак молочной железы [70]	miR-210	снижение	6 месяцев
Рак молочной железы [42]	let-7b, let-7g, miR-18b	снижение	2 и 24 недели
Немелкоклеточный рак легкого [84]	miR-1825, miR-574-5p	разнонаправленный	каждые 3 месяца в течение 18 месяцев
Рак молочной железы [85]	miR-155	снижение	через 1 месяц после резекции опухоли и 3 месяца после курса химиотерапии
Гепатоцеллюлярная карцинома [136]	miR-21	снижение	10-30 дней
Рак молочной железы [131]	miR-155 , miR-181b, miR-24	снижение	Не указаны
Плоскоклеточный рак легкого [28]	miR-205, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-451, miR-30b	снижение	7-10 дней
Немелкоклеточный рак легкого [86]	miR-486, miR-150	Снижение; повышение при рецидиве и метастазировании	7-10 дней; 24 месяца
Колоректальный рак [57]	miR-24, miR-320a, miR-423-5p	Повышение изначально низкого уровня	10 дней
Рак молочной железы [67]	miR-21-5p, miR-375, miR-103, miR-107	Снижение; повышение при рецидиве и метастазировании	26 дней; 70 дней; 2-3 года
Рак щитовидной железы [113]	miR-146a-5p, miR-221-3p	Значительное снижение; незначительное снижение – рецидив или метастазирование	1 и 12-24 месяца

(продолжение таблицы 2)

Рак молочной железы [142]	miR-21	Значительное снижение; не-значительное снижение – рецидив или мета-стазирование	Не указаны
Плоскоклеточный рак полости рта [109]	miR -92a-3p, miR-92b-3p, miR-320c, miR-629-5p	Снижение, при рецидиве – повышение, далее после повторной резекции - снижение	3 года
Рак прямой кишки [134]	miR-21	Снижение	6 недель
Рак молочной железы [142]	miR-146a, miR -155 , miR-221, miR-222	Снижение	1 месяц
Рак простаты [108]	miR-93, miR-221	Снижение	6 месяцев

Так, у больных с диагнозом рак молочной железы в образцах плазмы периферической крови установлено снижение экспрессии микроРНК-200a, микроРНК-200b, микроРНК-200c, микроРНК-210, микроРНК-215 и микроРНК-486-5p [89]. Из 248 обследованных больных экспрессия выбранной панели микроРНК была снижена у 196 больных, метастазов у которых не было выявлено на протяжении как минимум 50 месяцев наблюдения после проведенного лечения рака. В 52 случаях отмечено сохранение высоких уровней экспрессии, и именно у этих пациентов метастазы были выявлены в течение последующих 2 лет. Таким образом, продемонстрирован потенциал анализа уровня микроРНК в плазме крови для обнаружения начала метастазирования опухоли до его клинико-инструментального выявления ($p < 0,02$).

Анализ данных литературы позволяет заключить, что уменьшение опухолевой массы и локальный лизис опухолевых клеток, происходящие в результате хирургического удаления или воздействия ионизирующего излучения, сопровождаются снижением концентрации микроРНК в плазме крови. Данное явление может быть рассмотрено как потенциальный признак благоприятного ответа на проводимое

лечение. При этом следует учитывать, что уровень экспрессии отдельных микроРНК может варьировать в зависимости от морфологического типа новообразования, стадии опухолевого процесса и временных параметров наблюдения.

Дальнейшие исследования в этой области могут привести к разработке персонализированных подходов к лечению рака, основанных на микроРНК-профилях опухолей. Благодаря внедрению в практику метода определения уровня экспрессии циркулирующих в плазме крови микроРНК появилась перспектива более уточненной диагностики опухолей различных локализаций, их течения и возможности доклинического выявления метастазирования.

На основе вышесказанного можно сделать вывод о перспективности изучения уровня экспрессии циркулирующих в плазме крови больных УМ специфических для данной опухоли микроРНК. Такое исследование позволит оценить эффективность проводимого лечения первичной опухоли, а также на ранних стадиях выявить пациентов, у которых имеется высокий риск возникновения рецидива или развития метастазов.

Глава 2. Материал и методы исследования

2.1. Характеристика обследованных пациентов

Исследование проводили в ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава РФ на кафедре офтальмологии и НИИ «Молекулярной и персонализированной медицины» РМАНПО, где проводили лабораторную часть по определению уровня экспрессии микроРНК в плазме крови пациентов (исполнитель: к.б.н. Буре И.В.). Больные обследованы на базе Московского городского офтальмологического центра ГБУЗ «ММНКЦ им. С.П. Боткина» ДЗМ.

В рамках настоящего ретро- и проспективного исследования были проанализированы клинические данные 124 пациентов с установленным диагнозом МХ. Средний возраст включённых в исследование составил $60,65 \pm 13,05$ лет (от 22 до 83 лет). В обследуемой группе незначительно преобладали женщины — 64 человека (51,6%), число мужчин составило 60 (48,4%). Все участники исследования предварительно предоставили добровольное письменное информированное согласие на участие в клиническом наблюдении и обработку полученных данных в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и требованиями биоэтической экспертизы.

Критерии включения пациентов в исследование.

Основанием для включения являлось наличие подтвержденного диагноза МХ без признаков метастазирования, соответствующего стадии N_0M_0 . Установление диагноза базировалось на комплексном обследовании: биомикроофтальмоскопии и УЗ-сканировании, а также на данных КТ либо МРТ грудной и брюшной полостей, позволяющих исключить метастатическое поражение.

Критерии исключения пациентов из исследования:

Из исследования исключали пациентов при наличии следующих состояний, способных оказывать влияние на интерпретацию уровня циркулирующих микроРНК или прогноз течения заболевания:

- наличие в анамнезе злокачественных новообразований любой локализации;
- наличие системных аутоиммунных заболеваний;

- наличие тяжёлых хронических соматических патологий, находящихся на момент обращения в стадии суб- или декомпенсации, что могло бы существенно исказить результаты биомаркеров или повлиять на выбор тактики лечения.

Такой подход к формированию выборки позволил минимизировать влияние внешних клинико-патофизиологических факторов на исследуемые молекулярно-биологические показатели и обеспечить максимальную валидность выводов по результатам анализа.

Таблица 3

Характеристика больных МХ по метрическим показателям, полу, возрасту, локализации в хориоидее, типе проведенного лечения

	Начальные МХ (h ≤ 3 мм, d ≤ 10 мм)	Средние МХ (h >3 до = 5, d > 10 до = 15 мм)	Большие МХ (h > 5 мм, d > 15 мм)
Количество пациентов (n)	26 (21,0%)	17 (13,7%)	81 (65,3%)
Возраст (лет)	61,6±12,6 (29-81)	54,9±17,4 (25-78)	60,8±12,0 (22-83)
Пол	ж - 21 (75%) м - 7 (25%)	ж - 11 (64,7%) м - 6 (35,3%)	ж - 34 (42%), м - 47 (58%)
Средняя проминенция (мм)	2,11±0,6 (0,74-2,93)	4,32±0,50 (3,47-5,00)	9,69±3,80 (5,01-22,0)
Средний максимальный диаметр (мм)	9,94±2,12 (4,32-9,2)	12,81±2,33 (8,74-14,52)	13,85±3,88 (5,0-23,06)
Локализация опухоли (n):			
Презэкваториальная	7 (25%)	0 (0%)	44 (54,3%)
Постэкваториальная	21 (75%)	17 (100%)	37 (45,7%)
Вид лечения (n):			
энуклеация	2 (7,1%)	3 (17,7%)	78 (96,3%)
брахитерапия	24 (92,9%)	14 (82,3%)	3 (3,7%)

Характеристика пациентов представлена в таблице 3. Согласно данным УЗИ-биометрии все опухоли были разделены на 3 группы: начальные, средние и большие (классификация Shields J. 1983 г.). Как следует из таблицы 3, превалировали МХ больших размеров. По результатам патоморфологического исследования энуклеированных глаз выявлена веретенноклеточная МХ (n-65), эпителиоидноклеточная (n-5) и МХ смешанного типа (n-11).

В качестве контрольной группы в исследование были включены 28 добровольцев (14 мужчин и 14 женщин) в возрасте $62,9 \pm 1,42$ года (от 45 до 78 лет), не имеющих в анамнезе онкологических заболеваний или хронических аутоиммунных патологий. Формирование контрольной группы осуществлялось в соответствии с заранее определёнными клинико-физиологическими критериями.

Критерии включения волонтеров в группу:

- возрастной диапазон от 40 до 80 лет;
- отсутствие тяжёлой соматической патологии и активных воспалительных процессов;
- из офтальмологической патологии допускалось наличие возрастной (сенильной) катаракты;
- наличие заключения терапевта об удовлетворительном общем состоянии здоровья.

Критерии исключения:

- офтальмологические (глаукома, воспалительные, сосудистые заболевания) и выраженные соматические патологии;
- злокачественные новообразования или системные аутоиммунные заболевания.

Такая структура контрольной выборки была направлена на обеспечение сопоставимости биологических параметров с основной группой и снижение влияния сторонних факторов, способных исказить молекулярно-биологические результаты исследования.

2.2. Методы исследования пациентов

Клиническое офтальмологическое обследование всех пациентов осуществляли в соответствии с принятыми диагностическими стандартами. Оценку остроты зрения (визометрию) выполняли при каждом визите пациента, применяя проектор знаков «Tomeu» (Япония) в сочетании с подбором корректирующих линз по утверждённой методике. Измерение внутриглазного давления проводили бесконтактным способом с использованием тонометра «Huvitz» Non-contact tonometer (Корея). Исследование полей зрения осуществляли на приборе сферопериметр «Периком» с использованием стандартного протокола, предусматривающего демонстрацию световых стимулов различной яркости и размеров, адаптированных к уровню остроты зрения пациента.

Биомикроскопическое исследование проводили с использованием щелевой лампы «Zeiss» (Германия) при увеличении 10×, 16× и 24× с детальной оценкой состояния придаточного аппарата глаза, анатомических структур переднего сегмента и стекловидного тела. Офтальмоскопию выполняли поэтапно: первично осуществляли прямую офтальмоскопию после медикаментозного расширения зрачка с применением 0,5% раствора тропикамида, используя офтальмоскоп «Keeler Ltd.» (Великобритания). Далее проводили непрямую биомикроофтальмоскопию на щелевой лампе «Zeiss» с применением бесконтактной линзы 78D или 90D производства «Volk Optical Inc.» (США), а также контактной трёхзеркальной линзы Гольдмана (Volk Optical Inc., США), которую устанавливали после инстилляций 0,4% раствора оксибупрокаина в целях местной анестезии.

Диафаноскопическое исследование выполняли в условиях затемнённого помещения при максимально выраженном медикаментозном мидриазе с использованием трансиллюминатора производства «Welch Allyn Inc.» (США). Гониоскопию проводили при помощи линзы Гольдмана после предварительного обезболивания 0,4% раствором оксибупрокаина, введённого инстилляционно.

Ультразвуковую биометрию глаза и опухоли проводили в отделении функциональной диагностики с использованием эхографического комплекса «A/B Scan Tomey UD 6000» (Япония) (заведующий отделением Добросердов А.В.).

В случаях постэкваториальной локализации опухолевого очага выполняли оптическую когерентную томографию на платформе Spectralis HRA + OCT (Heidelberg, Германия), оборудованной системой слежения за движением глаза (EYE Tracking) и стационарной камерой (проводила врач-офтальмолог, к.м.н. Мусаткина И.В.).

Цифровую регистрацию глазного дна осуществляли с помощью фундус-камеры TRC-50EX (Япония) после достижения медикаментозного мидриаза путём инстилляции 0,5% раствора тропикамида.

Патоморфологическое исследование энуклеированных глаз, включающее иммуногистохимическое исследование и количественную оценку лимфоидных клеток в структуре опухоли и её микроокружении, выполняли в гистологической лаборатории ГБУЗ «ММНКЦ им. С.П. Боткина» ДЗМ (заведующий отделением Чижигов Н.П., исследования проводил врач-патологоанатом Щербаков П.А.).

Все пациенты были обследованы с целью исключения метастатического поражения МХ. С учётом характерного для данного заболевания гематогенного пути метастазирования преимущественно в печень и лёгкие, каждому пациенту проводили инструментальное обследование в виде компьютерной или магнитно-резонансной томографии органов грудной клетки и брюшной полости как на этапе до начала лечения, так и в процессе диспансерного наблюдения после его завершения. Пациенты с МХ остаются под пожизненным диспансерным наблюдением в специализированных офтальмоонкологических учреждениях Москвы.

2.3. Лабораторные методы исследования пациентов

Материалом для анализа уровней экспрессии микроРНК служила плазма периферической крови пациентов (4 мл) с подтвержденной МХ. До начала исследования каждый участник был предварительно информирован о целях и задачах проводимой работы, после чего было получено письменное информированное согласие на

участие. Исследование плазмы крови проводили до начала лечения и в различные сроки после его проведения: через 3 - 60 месяцев у 83 больных, перенесших энуклеацию, и через 3-49 месяцев у 41 больного, получившего БТ.

Поскольку микроРНК определяется в каждом конкретном случае индивидуально и не имеют нормативных показателей, для контроля была использована плазма крови волонтеров в том же количестве и по аналогичной методике.

Методика ПЦР в режиме реального времени

Обратную транскрипцию выполняли с использованием набора miScript II RT Kit (Qiagen) строго по протоколу производителя. На синтез комплементарной ДНК (кДНК) в каждую реакцию вносили по 300 нг суммарной РНК соответствующего образца. Реакционная смесь (до 20 мкл РНКазо-свободной водой) содержала: 3,8 мкл 5× miScript HiFlex Buffer, 2 мкл 10× miScript Nucleics Mix, 1 мкл ферментной смеси miScript Reverse Transcriptase Mix и 2,2 мкл экзогенного контроля cel-miR-39-3p. Инкубацию проводили при 37 °С в течение 60 мин, после чего для инактивации обратной транскриптазы смесь прогревали при 95 °С в течение 5 мин.

Количественную оценку экспрессии микроРНК осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени. Для каждой анализируемой микроРНК, а также для экзогенного контроля cel-miR-39-3p реакции ставили в трёх технических повторах, используя набор miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen). В качестве праймеров применяли готовые miScript Primer Assay (Qiagen) и, при необходимости, праймеры лабораторной разработки. Итоговый объём одной ПЦР-реакции составлял 12 мкл и включал: 2 мкл полученной кДНК, 5 мкл 2× QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, по 1 мкл 10× miScript Universal Primer и 10× miScript Primer Assay, а также РНКазо-свободную воду для доведения объёма. Амплификацию выполняли на системе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Геркулес, США) при температурном режиме, рекомендованном производителем: активация HotStarTaq DNA Polymerase — 95 °С, 15 мин; далее 40 циклов, включающих денатурацию при 94 °С (15 с), отжиг при 55 °С (30 с) и элонгацию при 70 °С (30 с). Полученные уровни экспрессии нормировали по экзогенному spike-in контролю cel-miR-39-3p.

В контрольной группе добровольцев проводили определение уровня экспрессии каждой из исследуемых микроРНК в плазме периферической крови. Для каждой выбранной микроРНК рассчитывали среднее значение уровня экспрессии в пределах данной группы. Контрольным уровнем явились следующие показатели:

микроРНК-223 = **0,04998±0,0345;**

микроРНК-27b = **0,000098±0,000016;**

микроРНК-155 = **0,039±0,007.**

Измерение уровня микроРНК производили в условных единицах, и все показатели далее для удобства и наглядности оценки полученных результатов выражены в процентном соотношении, где уровень контроля принят за 100%, а уровень экспрессии каждой микроРНК выражали в процентах отклонения от уровня контроля.

2.4. Статистическая обработка результатов исследования

Все полученные данные, после предварительной формализации, были переведены в электронный формат с использованием программных продуктов Excel Microsoft Windows® 7 и IBM SPSS Statistics версии 27.0. Для оценки соответствия распределения количественных данных нормальному закону применялся критерий Колмогорова–Смирнова. Сравнительный анализ исследуемых параметров и выявление статистически значимых различий между группами осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента и критерия Манна–Уитни (U). В случае анализа более двух групп применяли дисперсионный анализ (ANOVA). Для оценки различий по конкретным признакам использовали критерий χ^2 (хи-квадрат) и точный критерий Фишера (F). Исследование взаимосвязей между признаками, представленными в категориальной шкале, проводили с использованием ранговой корреляции Спирмена (r). Для оценки влияния независимых переменных на зависимую переменную, а также с целью прогностического моделирования, применялся метод логистического регрессионного анализа. Чувствительность и специфичность диагностического подхода определяли на основании анализа ROC-кривых.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Брахитерапия и изменения микроРНК в плазме крови больных после лечения

Исследование плазмы крови больных МХ ($T_{1-3}N_0M_0$) проводили через 3, 10-18 и 32-49 месяцев после БТ. При определении сроков исследования руководствовались особенностями местной лучевой реакции после снятия офтальмоаппликатора. Первые 10-12 месяцев – ранняя лучевая реакция, проявляется отеком ткани облученной опухоли и реакцией окружающих здоровых тканей на облучение. Период резорбции опухоли с последующим формированием ретиносклерального рубца при полном разрушении опухоли наступает к 24 месяцу [6]. Через 3 месяца после локального облучения МХ уровень экспрессии циркулирующих в плазме крови микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 исследовали у 26 больных, через 10-18 месяцев – у 24 из них¹. Уровень экспрессии микроРНК в отдаленные сроки (через 32-49 месяцев после брахитерапии) проанализирован у 15 больных МХ. Таким образом, всего проведено 106 исследований плазмы крови с целью выявления экспрессии микроРНК у 41 больного МХ.

В литературе имеются ссылки на характер изменения экспрессии микроРНК в плазме крови онкологических больных при условии M_0N_0 , но без указания размеров первичной опухоли [98]. Как показывают наши исследования, действительно, в первые 18 месяцев после брахитерапии экспрессия микроРНК (-223, -27b, -155) равномерно и последовательно снижалась [39, 98]. На рисунке 1 полученные результаты отражены графически: уровень экспрессии всех трех микроРНК с учетом отдаленного периода демонстрирует равномерное снижение до $13,3 \pm 1,9$ месяцев с резким отклонением его уровня от условной нормы при увеличении сроков повторного исследования до $37,9 \pm 5,7$ месяцев. Но все микроРНК имели разные показатели: меньше всех отреагировала микроРНК-27b – на 16% ниже контроля, микроРНК-223 – на 64% и микроРНК-155 – на 74%.

¹ в двух случаях летальный исход наступил до проведения повторного исследования ПЦР по причинам, не связанным с основным заболеванием

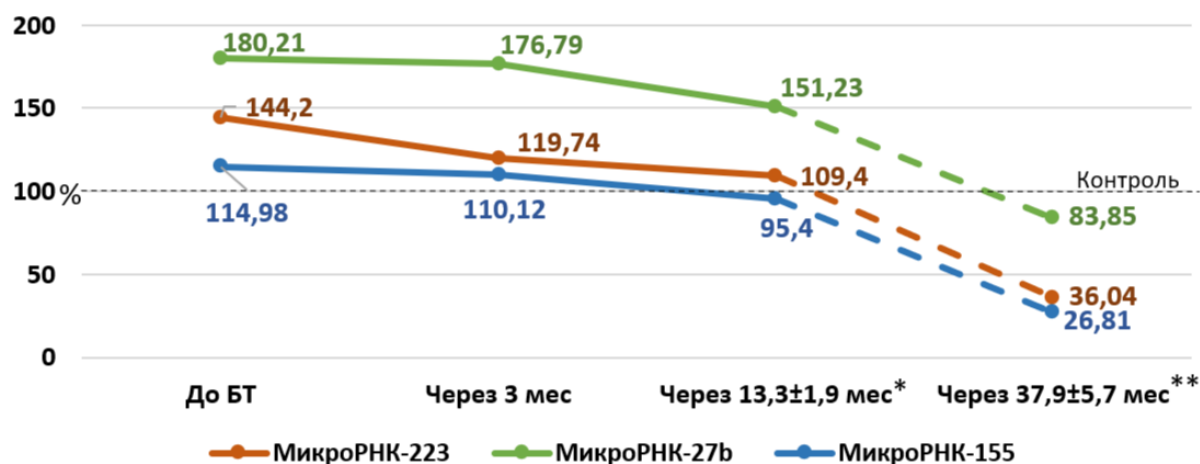


Рисунок 1. Линейное представление динамики экспрессии микроРНК в зависимости от продолжительности периода наблюдения после брахитерапии (n=41).

*у больного Т. 50 лет выявлены гематогенные метастазы через 5 месяцев после брахитерапии;

**у больной Б. 48 лет выявлены гематогенные метастазы через 48 месяцев после брахитерапии

Таблица 4

Распределение больных в зависимости от размеров меланомы хориоидеи

Группа	n	Средняя проминенция опухоли, мм	Средний максимальный диаметр опухоли, мм
Начальные МХ	24	2,08±0,62 (0,74 – 2,93)	9,84±2,17 (4,32 – 14,00)
Средние МХ	14	4,31±0,52 (3,47 – 5,00)	12,93±0,52 (8,74 – 16,52)
Большие МХ	3	6,06±0,21 (5,82 – 6,19)	13,06±1,58 (11,25 – 14,13)

В 2022 году была установлена корреляционная связь между уровнем экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155, микроРНК-126 и микроРНК-146a и размерами МХ [4]. До настоящего времени в литературе отсутствуют сведения о характере изменения экспрессии микроРНК в плазме крови больных УМ в

зависимости от проводимого лечения. Это же касается непосредственно и БТ. В связи с этим мы провели исследование, касающееся определения уровня и характера экспрессии микроРНК в плазме крови больных МХ, имеющих разные метрические показатели до и после БТ. С этой целью больные были подразделены на группы (таблица 4).

Уровень экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b и микроРНК-155 анализировали в каждой группе отдельно, с учетом размеров опухоли и сроков наблюдения за больными.

3.1.1. Экспрессия микроРНК в первые 18 месяцев после брахитерапии

В таблице 5 представлены показатели уровня экспрессии циркулирующих в плазме крови исследуемых микроРНК в первые 3-18 месяцев у больных МХ с учетом исходных размеров опухоли.

Таблица 5

Уровень экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 с учетом исходных размеров опухоли и сроков наблюдения после брахитерапии

Мик-роРНК	Средний уровень экспрессии в плазме крови			p1-3
	до БТ (% от контроля (абс. значение))	через 3 ме- сяца (% от исходного уровня)	через 10-18 месяцев (% от исход- ного уровня)	
Начальные МХ (n=14), сроки повторных исследований 11-16 мес				
223	0,052021±0,007513 (104,08 ±15,03)	↓на 6,1%	↓на 14,3%	<0,001*
27b	0,000137±0,000034 (139,51 ±34,86)	↓на 6,5%	↓на 15,0%	<0,001*
155	0,043138±0,004828 (110,61 ±12,38)	↓на 7,2%	↓на 22,9%	<0,001*
Средние МХ (n=8)**, сроки повторных исследований 10-15 мес				
223	0,068532±0,011635 (137,12 ±23,28)	↓на 4,4%	↓на 14,1%	=0,004*
27b	0,000157±0,000066 (159,71 ±67,28)	↓на 2,5%	↓на 20,6%	=0,004*
155	0,046287±0,004705 (118,68 ±12,07)	↓на 2,5%	↓на 13,0%	=0,01*

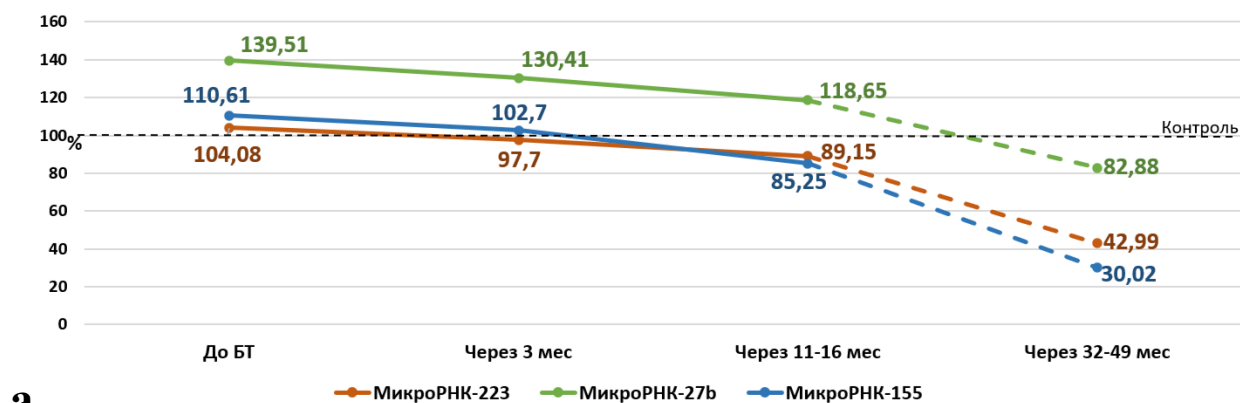
(продолжение таблицы 5)

Большие МХ (n=3), сроки повторных исследований 13-18 мес				
223	0,173089±0,036493 (346,32 ±73,02)	↓на 48,7%	↓на 54,2%	
27b	0,000369±0,000146 (376,86 ±148,54)	↓на 0,5%	↓на 30,0%	
155	0,047885±0,005119 (122,78 ±13,13)	↑на 1,2%	↓на 10,0%	

*разница статистически значима ($p<0,05$)

**в одном из наблюдений через 5 месяцев после брахитерапии выявлены метастазы в печень. Подробнее разбор этого случая представлен в параграфе 3.2.3.

Уровень микроРНК в плазме крови больных начальными МХ. В первые 3 месяца после снятия ОА у больных этой группы, когда проявляются ранние признаки локального облучения, что офтальмоскопически представлено, как правило, отеком ткани опухоли, окружающей сетчатки, отмечено равномерное снижение уровня экспрессии всех трёх микроРНК в пределах 6-7% от исходного уровня (таблица 5, рисунок 2а).



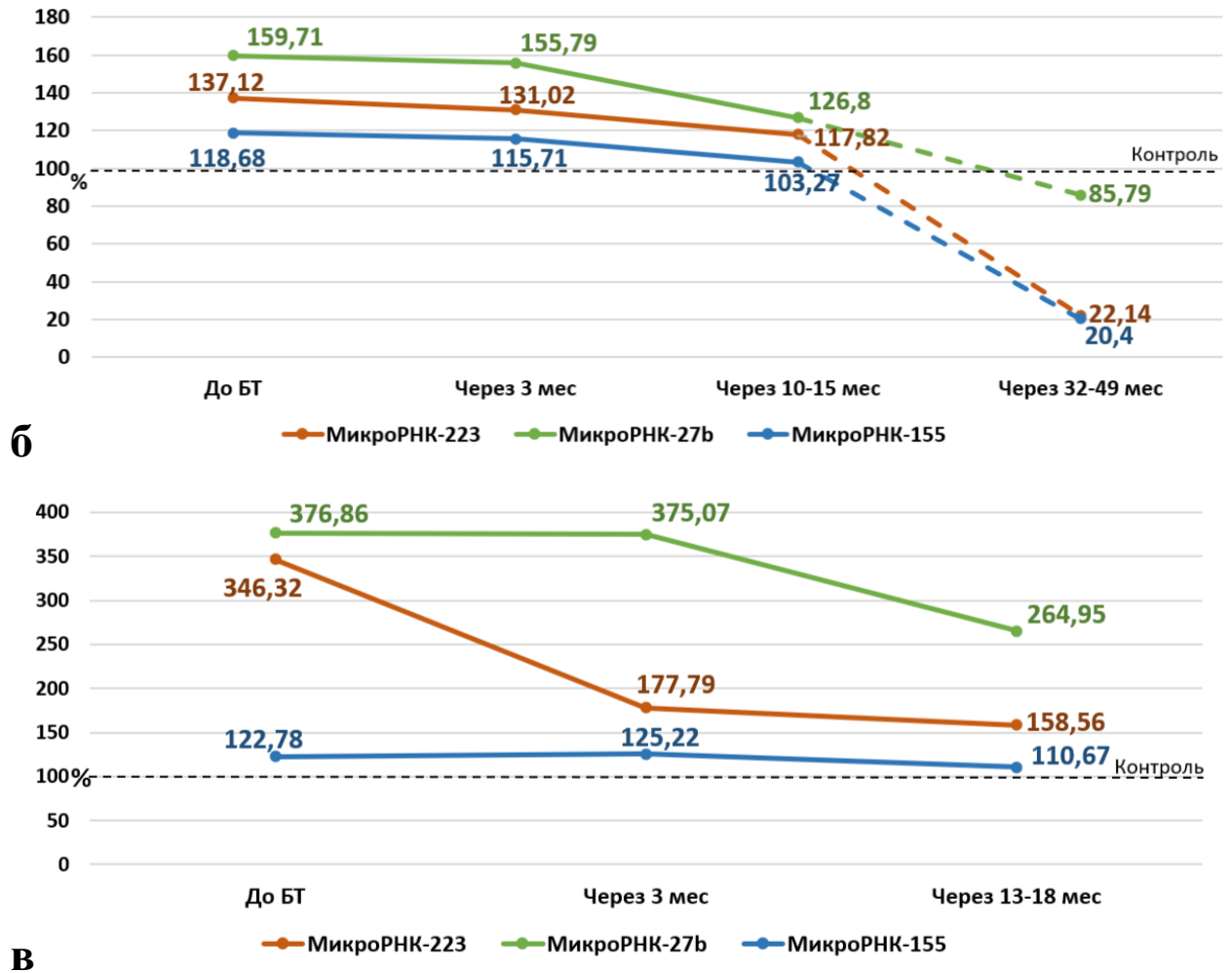


Рисунок 2. График изменения уровня экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 в плазме крови больных МХ, получивших брахитерапию, в зависимости от размеров опухоли: а) начальные МХ; б) средние МХ; в) большие МХ.

К $12,9 \pm 1,32$ месяцам уровень микроРНК-223 снижался до $89,15 \pm 7,55\%$, микроРНК-27b – до $118,65 \pm 29,04\%$. Таким образом, уровень экспрессии этих микроРНК за последующие 7-13 месяцев снизился ещё в 2 раза. Что касается микроРНК-155, то она принимает участие не только в онкогенезе, но и в формировании лимфоидного микроокружения меланомы [44]. Не исключено, что уменьшение активизации клеток лимфоидного микроокружения в ответ на лучевой ожог и явилось причиной уменьшения экспрессии микроРНК-155 в плазме крови до $85,25,27 \pm 24,06\%$. Полученные данные позволяют предположить, что изменение уровня экспрессии

микроРНК в плазме крови у пациентов с МХ отражает ответную реакцию организма на локальное лучевое воздействие, направленное на опухолевый очаг уже в первые 3 месяца с постепенным снижением их уровня, и достоверно продолжает снижаться в более продолжительные сроки исследования ($p < 0,05$ для всех исследуемых микроРНК).

Уровень экспрессии микроРНК в плазме крови больных средними МХ. В случаях средних МХ – по толщине более 3 до 5 мм, показатели экспрессии всех микроРНК в плазме крови в первые 3 месяца после локального облучения имели тот же характер снижения, но в более замедленном темпе – на 2,5-4,4% от первоначальных показателей (таблица 5, рисунок 26). При исследовании через $13,3 \pm 1,5$ месяцев продолжалось равномерное постепенное снижение экспрессии циркулирующих в плазме крови микроРНК: соответственно оказались сниженными микроРНК-223 – до $117,82 \pm 24,15\%$, микроРНК-27b – до $126,8 \pm 55,6\%$. Что касается микроРНК-155, то уровень её экспрессии снизился в среднем до $103,27 \pm 15,5\%$. Таким образом, локальное облучение при средних МХ сопровождается постепенным снижением экспрессии всех микроРНК и в сроки через 11–16 месяцев, что коррелирует с офтальмоскопической картиной и эхобиометрическими данными (рисунок 3).

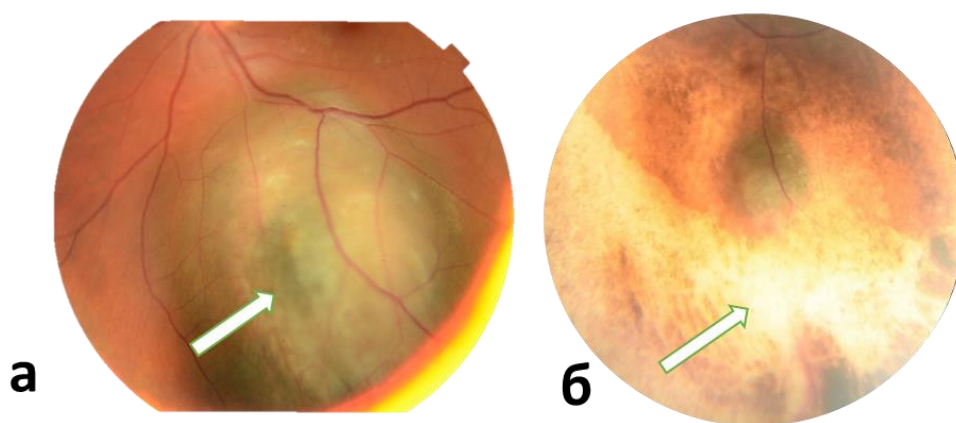


Рисунок 3. Картина глазного дна больной М. 31 года с меланомой хориоидеи средних размеров - $h=3,55$ мм: а) до брахитерапии (стрелкой обозначена опухоль); б) через 17 месяцев после брахитерапии (стрелкой обозначена зона формирования рубца).

Уровень экспрессии микроРНК в плазме крови больных большими МХ. Таких больных было трое. Причина брахитерапии – категорический отказ больных от энуклеации. Характер изменения уровня экспрессии у этих больных представлен в таблице 6 и на рисунке 2в.

Таблица 6

Уровень экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 в плазме крови больных большими меланомами хориоидеи в первые 18 месяцев после брахитерапии (n=3)

МикроРНК	Пациент К., 76 лет, преэкваториальная л-я Уровень экспрессии (% от контроля) h=5,82			Пациент К., 60 лет, преэкваториальная л-я Уровень экспрессии (% от контроля) h=6,17			Пациент Д., 52 года, постэкваториальная л-я Уровень экспрессии (% от контроля) h=6,19		
	до	через 3 мес	через 13 мес	до	через 3 мес	через 18 мес	до	через 3 мес	через 17 мес
223	266,20	↓36,7	↓44,9	409,11	↓55,3	↓61,0	363,64	↓50,0	↓53,3
27b	222,97	↓0,7	↓6,0	519,40	↓7,0	↓49,0	388,22	↑7,2	↓14,7
155	132,90	↑1,4	↓5,4	127,49	↑7,2	↓12,9	107,95	↓3,4	↓11,7

Как следует из таблицы, практически равномерное снижение уровня экспрессии в пределах 37-55% отмечено только по результатам микроРНК-223 – до $158,56 \pm 11,51\%$. В дальнейшем отмечено сохранение показателей на уровне выше контрольного и практически отсутствие их изменения в более поздние сроки исследования. Таким образом, как показывают данные позднего исследования, можно высказать предположение, что отсутствие снижения экспрессии сопряжено с отсутствием дальнейшей резорбции опухоли. И действительно, офтальмоскопически и эхографически отмечена стабилизация размеров опухоли (рисунок 4), что

коррелирует с показателями экспрессии микроРНК-223 в сроки $16,0 \pm 2,65$ месяцев. И это должно настораживать клиницистов в плане сохранения условий для дальнейшего метастазирования.

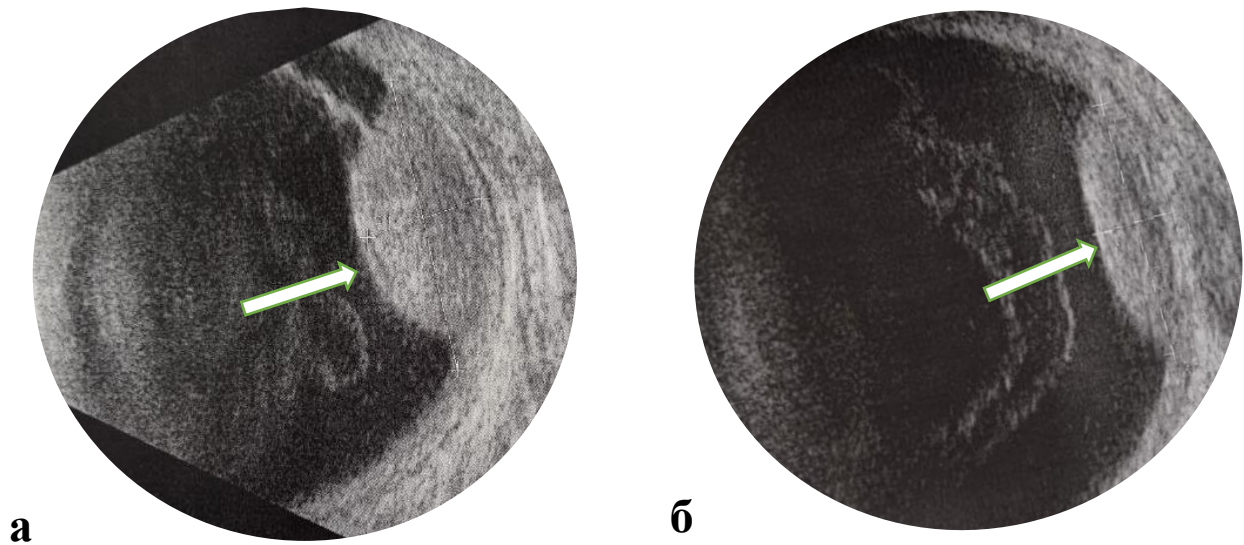


Рисунок 4. Эхограмма глаза больной МХ 76 лет: а) до брахитерапии, проминенция опухоли 5,65 мм; б) спустя 18 месяцев после брахитерапии, проминенция опухоли 2,68 мм.

Что касается микроРНК-27b, снижение ее экспрессии происходило достаточно медленно и в меньшей степени, чем микроРНК-223: до $375,07 \pm 134,81\%$. В более отдаленные сроки ($16,0 \pm 2,65$ месяцев) уровень её экспрессии в плазме крови снижался, однако всё еще оставался более чем в 2 раза выше контрольного уровня – $264,95 \pm 61,45\%$. Ни в одном из случаев полной регрессии опухоли не наступило, что тоже должно настораживать в отношении дальнейшего прогноза больных.

МикроРНК-155 известна своей ролью не только в качестве онкогенного маркера, но и в качестве активного участника провоспалительных процессов организма и контроле иммунного ответа [64, 66, 76, 99, 135]. В двух случаях уровень её экспрессии несколько повышался (на 1,4-7,2% от первоначального уровня) в сроки активного проявления лучевого воспаления опухоли, и снижалась в более отдаленные сроки исследования. Такие проявления микроРНК-155 могут подтверждать не

только ее участие в онкогенезе, но и роль в воспалительной реакции, которая именно при УМ оказывает достаточно активную роль в воспалительной реакции ее микро-окружения.

Заключая в целом, позволим сформулировать следующий вывод: уровень экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 у больных УМ в первые 18 месяцев коррелирует с регрессией опухоли, и речь идет, прежде всего, об опухолях начальных и средних размеров. Известно, что размер опухоли - важный фактор, влияющий на эффективность лечения, а динамику уровня экспрессии микроРНК, которая связана с биологическими особенностями более агрессивных опухолей, следует признать полезной в процессе динамического наблюдения за больными.

3.1.2. Экспрессия микроРНК в отдаленные сроки после брахитерапии

В отдаленном периоде после БТ при сроках наблюдения через 32-49 месяцев ($37,87 \pm 5,67$) уровень экспрессии микроРНК исследован у 15 больных МХ. Исходные показатели опухоли в этой группе соответствовали начальным и средним меланомам (таблица 7, рисунок 5).

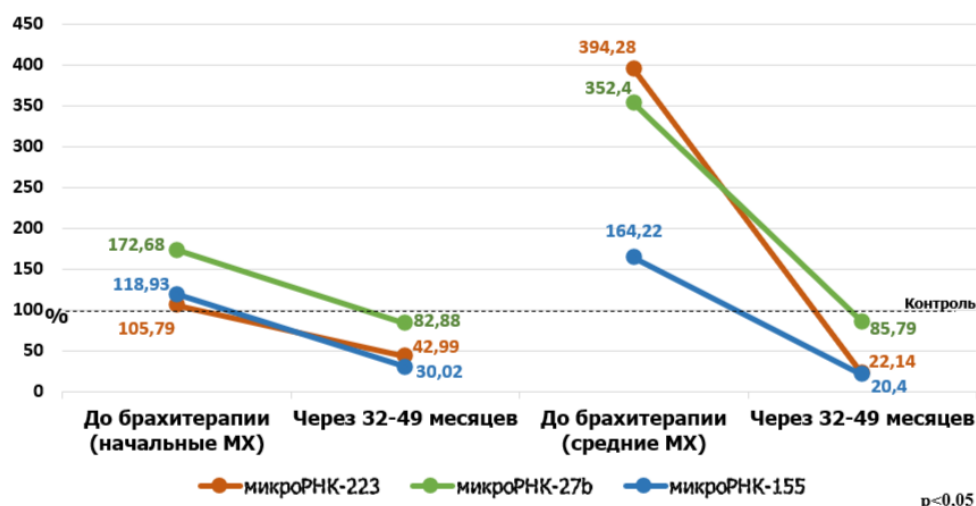


Рисунок 5. График изменения уровня экспрессии микроРНК у 15 больных начальными и средними меланомами хориоидеи до и через 32-49 месяцев после брахитерапии

Уровень экспрессии микроРНК до и после брахитерапии 15 больных начальными и средними МХ через 32-49 месяцев

МикроРНК		Средний уровень экспрессии микроРНК			p
		до БТ (% от контроля)	через 32-49 мес (% уменьшения экспрессии ниже контроля)		
Начальные МХ (n=10)**	223	0,052876±0,005513 (105,79±11,03)	↓на 57,01%		<0,001*
	276	0,000169±0,000149 (172,68±152,37)	↓на 17,12%		<0,001*
	155	0,046384±0,012201 (118,93±31,29)	↓на 69,98%		<0,001*
Средние МХ (n=5)	223	0,197063±0,001258 (394,28±2,51)	↓на 77,86%		<0,001*
	276	0,000345±0,000305 (352,40±311,03)	↓на 14,21%		=0,005*
	155	0,064044±0,013780 (164,22±35,33)	↓на 79,6%		<0,001*

*изменения показателей статистически значимы ($p<0,05$)

**в одном случае выявлены гематогенные метастазы в печень через 48 месяцев после брахитерапии и 16 месяцев после повторного исследования уровня экспрессии микроРНК в плазме крови.

В сроки 32-49 месяцев наблюдения уровни микроРНК-223, микроРНК-155, микроРНК-27b у всех больных ($n = 15$) сохранялись в пределах контроля (ниже 100%). И если микроРНК-223 и микроРНК-155 имели схожие показатели – ниже условной «нормы» на 60-80%, то микроРНК-27b меньшую степень снижения - не превышающую 17% в обеих подгруппах.

Офтальмоскопически в обеих группах у 14 больных имело место замещение опухоли постлучевым рубцом (рисунок 6). В одном случае у больной Б., 48 лет через 32 месяца после БТ на фоне показателей экспрессии микроРНК в пределах

контрольных значений оставался проминирующий очаг до 1,15 мм при исходных размерах толщины опухоли 2,0 мм. Спустя 48 месяцев после БТ – гематогенное метастазирование. Это наблюдение позволяет согласиться с мнением, что контрольными сроками оценки эффективности лечения следует считать 5 лет [12].

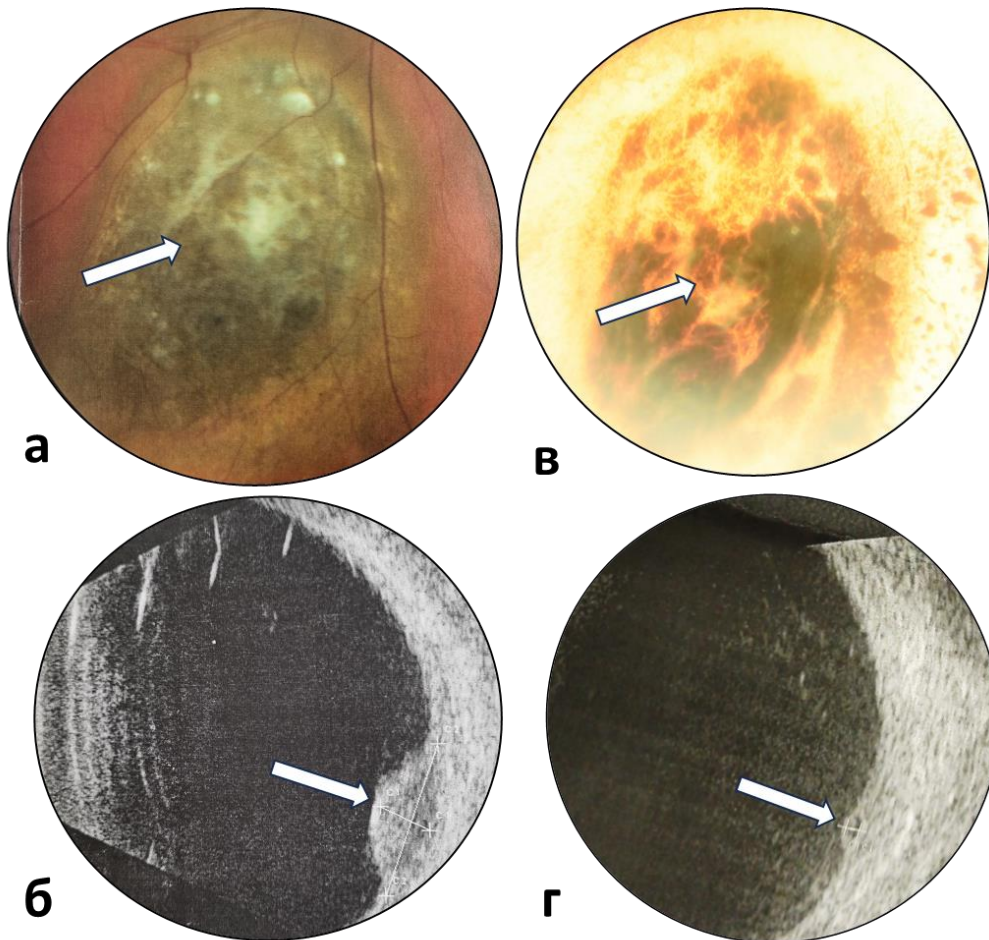


Рисунок 6. Больного О. 44 лет, меланома хориоидеи (указана стрелками) правого глаза с проминенцией 2,93 мм, максимальным базальным диаметром 8,76 мм. а) фото глазного дна до брахитерапии; б) эхограмма того же глаза до брахитерапии; в) глазное дно того же больного через 36 месяцев после облучения: опухоль резорбировала практически полностью, контурируется четкий отграничительный ретиносклеральный рубец; г) эхограмма глаза того же больного спустя 36 месяцев после лечения в зоне интереса видна достаточно интенсивная тень проминенцией 0,66 мм, что можно расценить как постлучевой рубец. Стрелками обозначена зона опухоли.

Полученные нами результаты позволяют заключить, что уровень экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 в плазме крови больных начальными и средними МХ и в отдаленные сроки положительно коррелируют с клинико-инструментально подтвержденным благополучным состоянием больного. Снижение экспрессии указанных микроРНК и сохранение их в пределах контрольных значений – показатель эффективности проведенного лечения и отсутствия в органах-мишенях гематогенных метастазов.

3.2. Энуклеация и её влияние на уровень экспрессии микроРНК в плазме крови больных

3.2.1. Характер экспрессии микроРНК в ранние и отдаленные сроки после энуклеации

Выбор метода лечения пациентов с МХ остается дискуссионным, при этом энуклеацию проводят у 50-70% больных с большими опухолями и у 30-40% со средними МХ [80, 107]. Главная цель лечения МХ – сохранение и продление жизни пациента, и ключевым показателем эффективности проведенного лечения считают отсутствие признаков метастазирования опухоли. Возможности раннего выявления метастазов МХ во внутренние органы расширились с внедрением в клиническую практику визуализирующих методов исследования, наибольшая чувствительность принадлежит МРТ и КТ [31, 118]. И всё же метастазирование констатируют, когда визуализируют опухолевый очаг в печени размером более 5 мм. Появившиеся в 12-13 гг. настоящего века публикации свидетельствуют об изменении характера экспрессии микроРНК в плазме крови онкологических больных после локального удаления рака в сторону *уменьшения* изначально высокой экспрессии [42, 28, 72] или наоборот *увеличения* исходно низких показателей [86, 57]. Это позволяет рассматривать микроРНК плазмы крови как перспективные биологические маркеры в оценке эффективности лечения злокачественных новообразований.

Противопоказаниями к органосохранному лечению МХ считают опухоли больших размеров, юкстапапиллярную их локализацию, вовлечение в патологический процесс сетчатки и стекловидного тела, экстрасклеральный рост опухоли [1, 13]. Энуклеация проведена нами 83 больным МХ (рисунок 7), средний возраст которых составил $61,07 \pm 11,89$ (22 – 83) лет. Все опухоли относили к большим (рисунок 8): средняя проминенция – $9,55 \pm 3,7$ мм, средний максимальный диаметр $13,73 \pm 3,9$ мм, за исключением трех, расположенных аннулярно вокруг диска зрительного нерва, проминенция которых соответственно 2,23, 3,59 и 4,12 мм (рисунок 9).



Рисунок 7. Макропрепарат энуклеированного глаза с большой меланомой хориоидеи (опухоль обозначена стрелками)

Презкваториально меланома локализовалась в 36 глазах (в 21 из них с вовлечением цилиарного тела в опухолевый процесс), в 47 глазах выявлена постэкваториальная локализация. При патогистологическом исследовании выявлена веретенноклеточная (n-67), эпителиоидноклеточная (n-5) и смешаноклеточная (n-11) меланома.

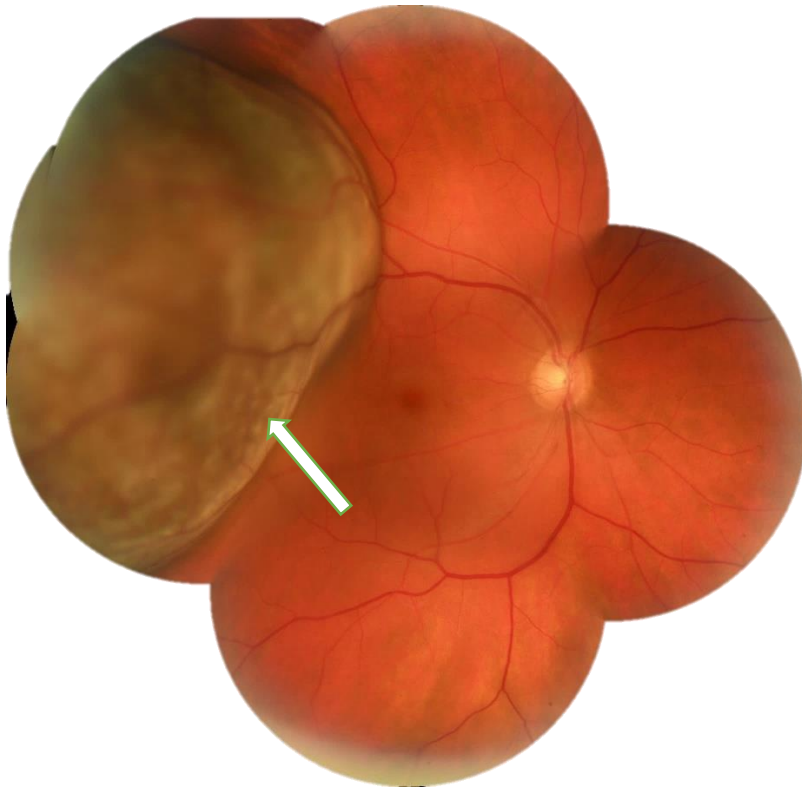


Рисунок 8. Фото глазного дна больного Р. 46 лет с большой меланомой хориоидеи: проминенция 6,67 мм, максимальный базальный диаметр 14,08 мм. Гистологически: опухоль смешанноклеточного строения. Стрелкой обозначена опухоль

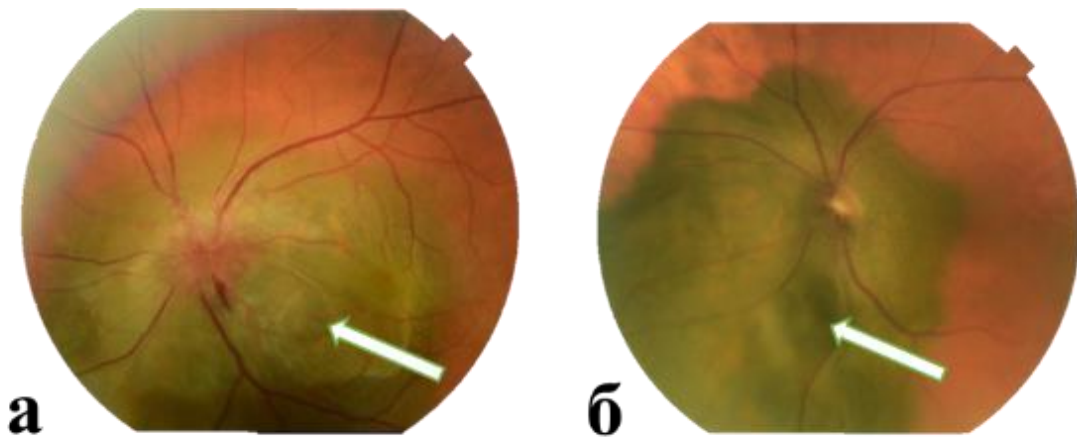


Рисунок 9. Фото глазного дна больных с юкстапапиллярной аннулярной меланомой хориоидеи: а – больного Т. 53 лет, б – больной К. 72 лет. Стрелками обозначены опухолевые очаги

Уровень экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b и микроРНК-155 в плазме крови до операции был повышен у всех 83 больных (таблица 8).

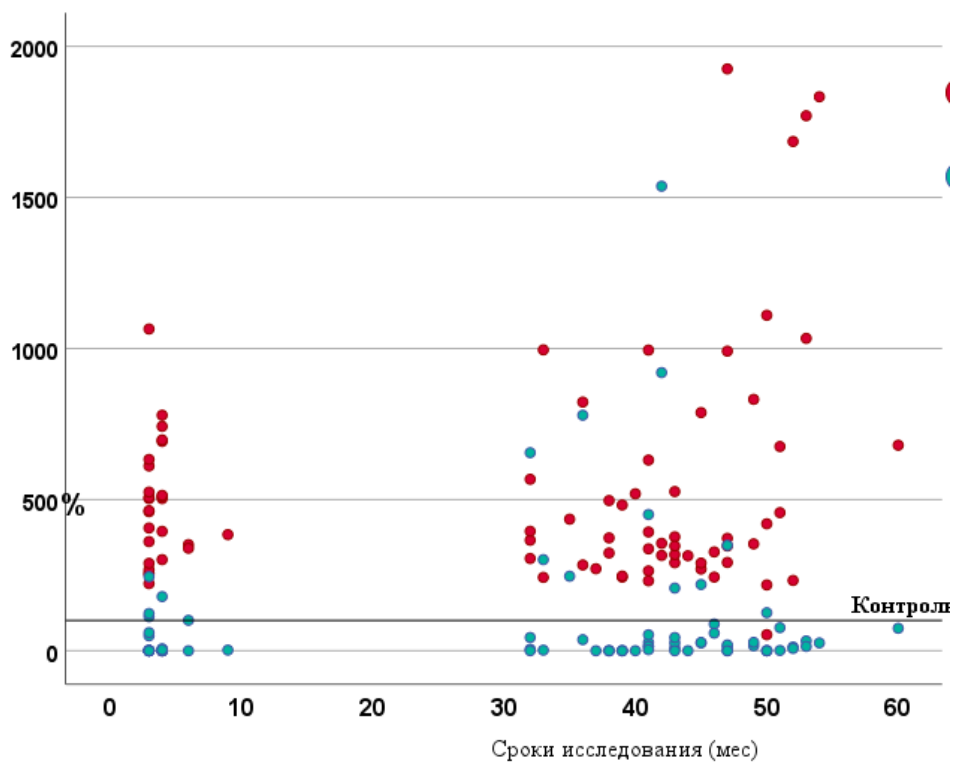
Экспрессия микроРНК у обследуемых больных до энуклеации

микроРНК	Контрольный уровень экспрессии (100%)	Показатели экспрессии (%)	p
223	0,04998±0,0345	0,210177±0,204566 (↑ 528,7)	<0,05*
27b	0,000098±0,000016	0,204566±0,0002389 (↑ 453,5)	<0,05*
155	0,039±0,007	0,0002389±0,028277 (↑ 175,3)	<0,05*

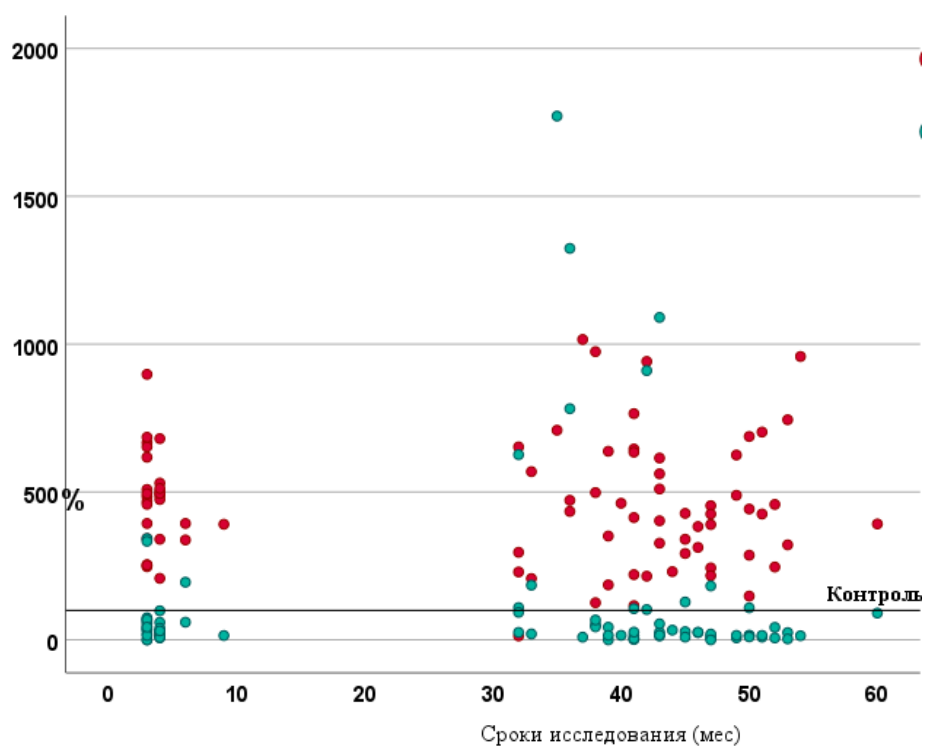
* - различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

Таким образом, подтверждены данные предыдущих исследований о диагностической значимости повышения уровня экспрессии исследованных микроРНК у больных, страдающих МХ [3, 4].

После удаления глаза, пораженного МХ, по всей группе в целом экспрессия исследуемых микроРНК в плазме крови больных имела *тенденцию* к снижению (рисунки 10 а, б, в). Это подтверждает высказанное ранее мнение об уменьшении экспрессии циркулирующих микроРНК после хирургического удаления злокачественной опухоли [28, 42, 57, 72, 86, 142]. Как было указано выше, все больные на момент энуклеации имели заключение об отсутствии дистантных гематогенных метастазов (N_0M_0).



б



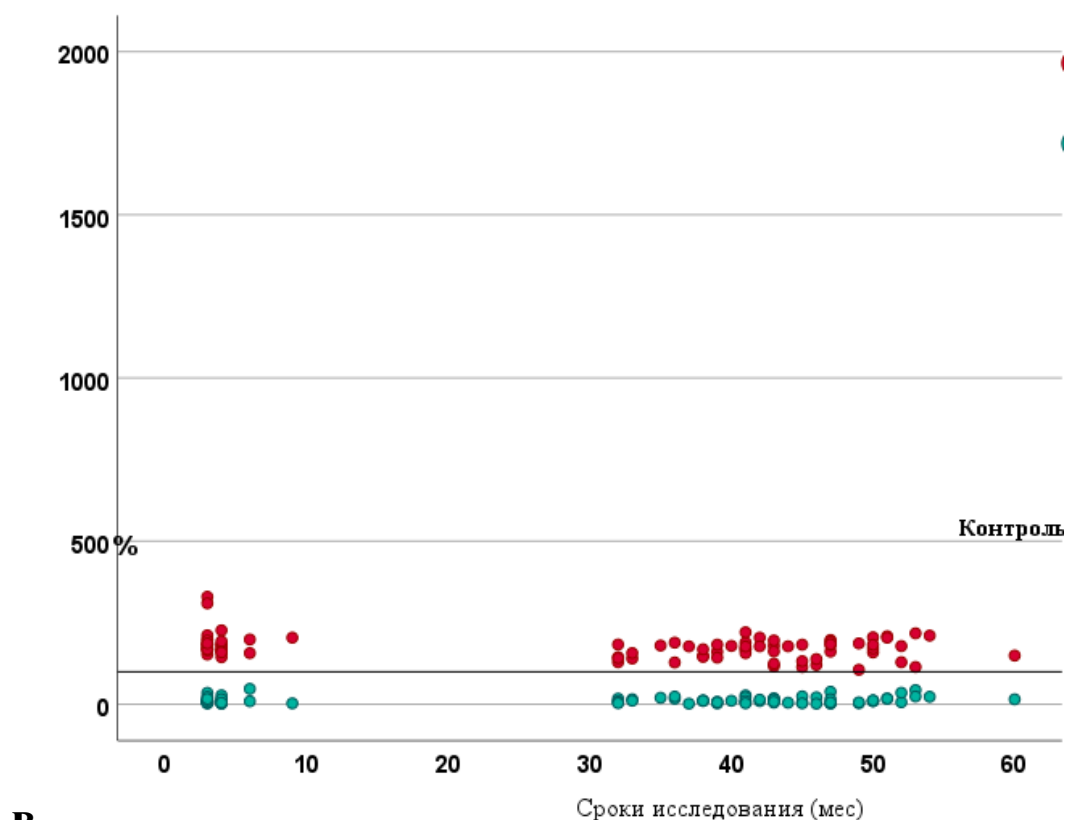


Рисунок 10. Характер экспрессии микроРНК до (красным цветом) и после (зеленым цветом) энуклеации (n=83) в сроки 3-60 месяцев: а) микроРНК-223; б) микроРНК-27b; в) микроРНК-155.

В связи с тем, что сроки исследования крови после операции у больных различались, были выделены три группы с учетом интервала времени между энуклеацией и повторным исследованием уровня экспрессии микроРНК (таблица 9).

Таблица 9.

Сроки забора крови для исследования после энуклеации (n=83)

Группа	n	Сроки после энуклеации (мес)	Частота метастазирования (n)
1	28	3-9 ($3,8 \pm 1,32$)	2
2	9	12-36 ($33,4 \pm 1,74$)	4
3	46	>36 ($44,9 \pm 4,75$)	1

В 7 случаях выявлены гематогенные метастазы МХ в сроки от 6 до 45 месяцев после энуклеации, и, как следует из таблицы 9, большинство из этих случаев пришлось на первые 36 месяцев после операции. Уровень экспрессии исследуемых в плазме крови микроРНК данной группы больных достоверно отличался от показателей остальных пациентов без выявленных метастазов. Результаты исследования 7 больных с выявленными метастазами представлены в параграфе 3.3.

Средний срок наблюдения за 76 больными МХ после энуклеации составил $49,84 \pm 20,14$ (10-72) месяцев, отсутствие гематогенных метастазов МХ во внутренних органах в процессе наблюдения доказано МРТ и КТ исследованиями. Показатели экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b и микроРНК-155 в плазме крови всех больных при сроках проведения повторного исследования через 3-60 месяцев ($30,25 \pm 19,93$) после энуклеации оказались сниженными (рисунок 11) в среднем в 7,6 раз (микроРНК-223), в 8,4 раза (микроРНК-27b) и в 15,4 раза (микроРНК-155) ($p < 0,05$).

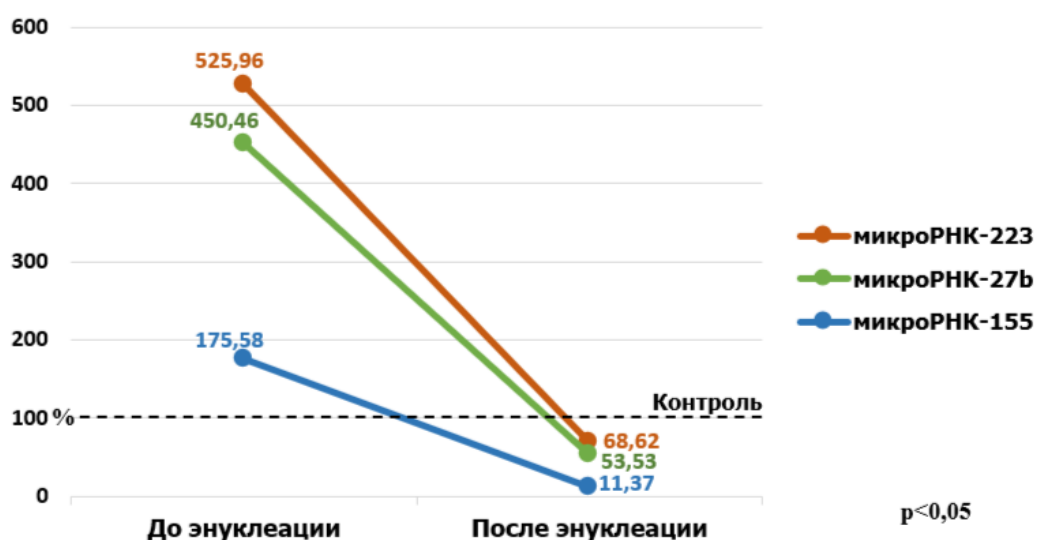


Рисунок 11. Характер изменения уровня экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b и микроРНК-155 в плазме крови 76 больных после энуклеации без выявленных метастазов.

На рисунке 12 представлен характер изменения экспрессии микроРНК в плазме крови больных по мере удлинения послеоперационных сроков наблюдения.

Оказалось, что в ранние сроки после энуклеации (3-9 месяцев) уменьшение экспрессии микроРНК-223 было 22-кратным (на 95,5%), микроРНК-27b – 9-кратным (на 89%), а микроРНК-155 снизилась в 19,7 раз (на 95%), находясь ниже контрольной линии ($p<0,05$).

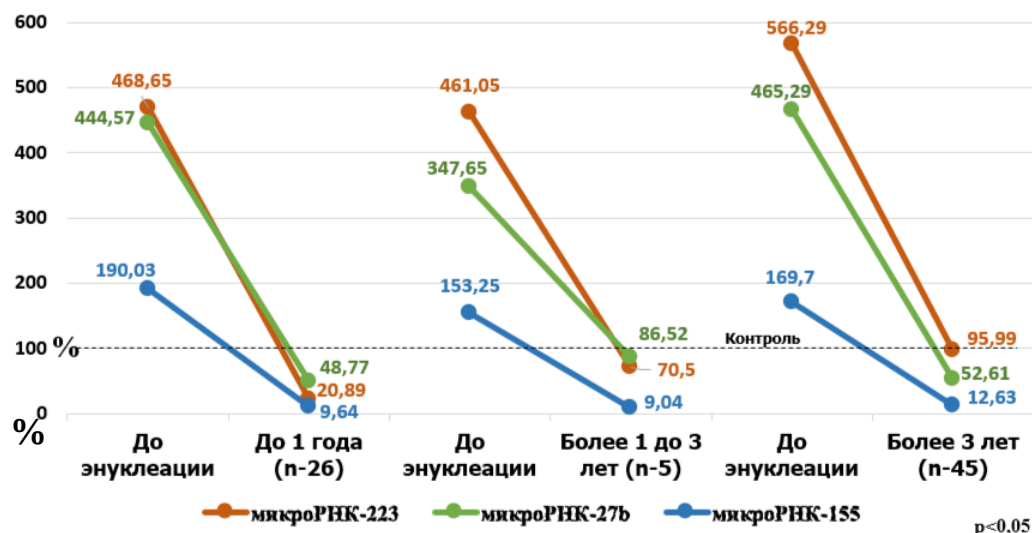


Рисунок 12. График снижения экспрессии исследуемой панели микроРНК в процессе наблюдения за больными после энуклеации (n=76).

При сроках повторного исследования более 1 года до 3 лет снижение уровня экспрессии микроРНК-223 было в 6,5 раз (на 84,7%), микроРНК-27b – в 4 раза (на 75%), а микроРНК-155 – в 17 раз (на 94%) ($p<0,05$). И всё же несмотря на то, что показатели оказались ниже контрольных значений, снижение это было менее выраженное по микроРНК-223 и микроРНК-27b. Важно отметить, что наибольшая частота метастазирования наблюдалась именно в эти сроки наблюдения. В указанных случаях патоморфологически выявлено распространение МХ на цилиарное тело (n=1), прорастание склеры и формирование эписклерального узла, рост в эмиссарии (n=3). Учитывая характер изменения уровня экспрессии микроРНК используемой панели в группе больных с метастазами, доказанными МРТ исследованиями, есть основание полагать, что и эти больные должны быть отнесены в группу высокого риска гематогенного метастазирования.

Что касается микроРНК-155, то уровень повышения ее экспрессии до операции выражен в меньшей степени, чем микроРНК-223 и микроРНК-27b, а уменьшение экспрессии после энуклеации, напротив, значительно увеличивается. Не исключено, что это связано в значительной степени с ее ролью в контроле иммунитета [25].

В отдаленные сроки повторного исследования после энуклеации (в среднем $44,9 \pm 4,75$ мес.) у 45 человек сохраняется четкая тенденция уменьшения экспрессии микроРНК: микроРНК-223 - в 5,9 раз (на 83,0%), микроРНК-27b - в 8,8 раз (на 88,7%), и микроРНК-155 в 13,4 раза (на 92,6%)($p < 0,05$).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о необходимости тщательного мониторинга пациентов с большими МХ, особенно в течение первых трех лет после энуклеации, что обусловлено статистически подтвержденным высоким риском развития метастатического процесса в этот временной интервал. МикроРНК-223, микроРНК-27b и микроРНК-155, определяемые в плазме крови, представляют собой потенциальные малоинвазивные биомаркеры, отражающие эффективность проведения энуклеации у данной категории пациентов. Снижение уровня их экспрессии в плазме крови свидетельствует о положительном эффекте проведенного лечения, а сверхэкспрессия микроРНК в циркулирующей крови больного после энуклеации в процессе диспансерного наблюдения должна насторожить врача относительно риска выявления гематогенных метастазов опухоли.

3.2.2. Особенности экспрессии микроРНК-155 у больных меланомой хориоидеи

Злокачественные опухоли, включая внутриглазные новообразования, способны к иммунному уклонению [87], при этом глаз, обладая уникальными иммуноэмбрионными особенностями, остается под контролем системного иммунитета [11, 99], что проявляется либо в иммунном надзоре, либо в механизмах опухолевого ускользания [44]. Ключевую роль в прогрессировании опухоли играет её микроокружение, преимущественно представленное Т-лимфоцитами [51], которое способствует ангиогенезу и метастазированию через механизмы иммунной супрессии. Активность

опухолевого микроокружения является достоверным прогностическим фактором неблагоприятного исхода [15, 17, 44].

МикроРНК-155 - многофункциональная молекула, выполняющая основную роль в биологии клетки, но нередко роль ее оказывается противоречивой в различных типах злокачественных опухолей [61, 76, 140]. Характер и уровень ее экспрессии варьируют в разных типах клеток и тканевой среде и регулируются множеством путей в ответ на клеточные сигналы и индуцированное воспаление [135, 155, 66]. Увеличение экспрессии микроРНК-155 в плазме крови больных УМ наблюдали как при одиночном узле опухоли в глазу, так и на фоне ее гематогенного метастазирования [77]. Правда, это увеличение экспрессии и в ткани опухоли, и в биологических жидкостях по сравнению с группой контроля было не велико (до 62%) [3, 112]. МикроРНК-155 отличается от других своей способностью активировать миелоидные и лимфоидные клетки, контролировать множественные физиологические процессы, начиная от воспаления и заканчивая иммунологической памятью [64]. Одной из ее особенностей является способность экспрессироваться как иммунными клетками, так и клетками *самой* меланомы. Но, если при некоторых опухолях, в том числе и кожной меланоме, иммунные клетки, инфильтрируя ее ткань, *активизируют* противоопухолевый иммунитет, чем и улучшают витальный прогноз [29], то в группе больных УМ наличие инфильтрации ткани опухоли Т-лимфоцитами и макрофагами свидетельствует о *высоком* риске метастазирования [101].

Суммируя изложенное, можно заключить, что к настоящему моменту описаны и изучены морфологические признаки не только самой опухоли, но сопроводительные изменения воспалительно-иммунного характера в микроокружении ее, имеется достаточно информации о прогностической значимости изменений экспрессии микроРНК-155 в плазме крови больных УМ, подчеркивающие неблагоприятный витальный прогноз. Однако отсутствуют данные о возможной связи эпигенетической регуляции опухолевого процесса с локальными воспалительными изменениями.

Из 83 обследованных нами больных, подвергнутых энуклеации, лимфоидная инфильтрация МХ выявлена в 18 глазах. Средний возраст в этой группе составил

64,0±11,7 (36-83) лет. Толщина опухоли достигала в среднем 9,57±5,1 (2,23-20,0) мм, максимальный базальный диаметр - 14,0±3,7 (7,62-22,1) мм. В 3-х глазах МХ располагалась юстапапиллярно при толщине опухоли в пределах 2,23-4,12мм и максимальном базальном диаметре 10-14 мм.

Распределение МХ по клеточному типу и частота выявления лимфоидной инфильтрации зоны интереса представлены в таблице 10.

Таблица 10

Частота лимфоидной инфильтрации увеальной меланомы в энуклеированных глазах с учетом морфологического типа опухоли

Патоморфологический тип увеальной меланомы	Всего глаз (n)	Наличие лимфоидной инфильтрации (n)	Из них наличие микроокружения (n)
Веретенноклеточная	67	11	3
Эпителиоидноклеточная	5	1	0
Смешанноклеточная	11	6	3
Всего:	83	18 (21,7%)	6

Характер экспрессии микроРНК-155 в плазме крови изучен в группе больных с лимфоидной инфильтрацией МХ (n = 18) и без нее (n = 65) до и после первичной энуклеации. В 18 наблюдениях результаты экспрессии микроРНК-155 в сыворотке крови сопоставлены с результатами патоморфологических изменений непосредственно в меланоме и окружающей ее ткани. До операции инструментально во всех случаях исключены гематогенные метастазы (КТ, МРТ легких и печени). Срок наблюдения за больными в послеоперационном периоде составил 6 - 53 месяца (21,5±14,9). В двух случаях за период наблюдения через 6 и 10 месяцев после операции выявлены гематогенные метастазы в печень.

Уровень экспрессии микроРНК-155 представлен в таблице 11.

Уровень экспрессии микроРНК-155 у больных меланомой хориоидеи с лимфоидной инфильтрацией опухоли

	С лимфоидной инфильтрацией	Без лимфоидной инфильтрации	p
Количество больных (n)	18	65	
Уровень экспрессии микроРНК-155 (%)	193,3±46,2	167,4±28,0	0,02*

* - различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$).

Частота глаз с лимфоидной инфильтрацией в анализируемой группе больных МХ (таблица 10) составила 21,7% (рисунок 13). Степень проявления ее в первичном опухолевом узле колебалась от 1 до 25%. Следует отметить, что первые сведения о 5% инфильтрации УМ лимфоцитами описал F.H. Durie в 1990 году [52]. Поздние показатели лимфоидной инфильтрации, подавляющей активацию иммунной системы, среди диагностированных УМ достигают 12-24% [9, 81, 100]. В цитируемых исследованиях анализировали 20 полей зрения, и положительным результатом увеличения лимфоидной инфильтрации считали от 100 клеток и более. И речь в описываемых случаях шла о больных с метастатической УМ.

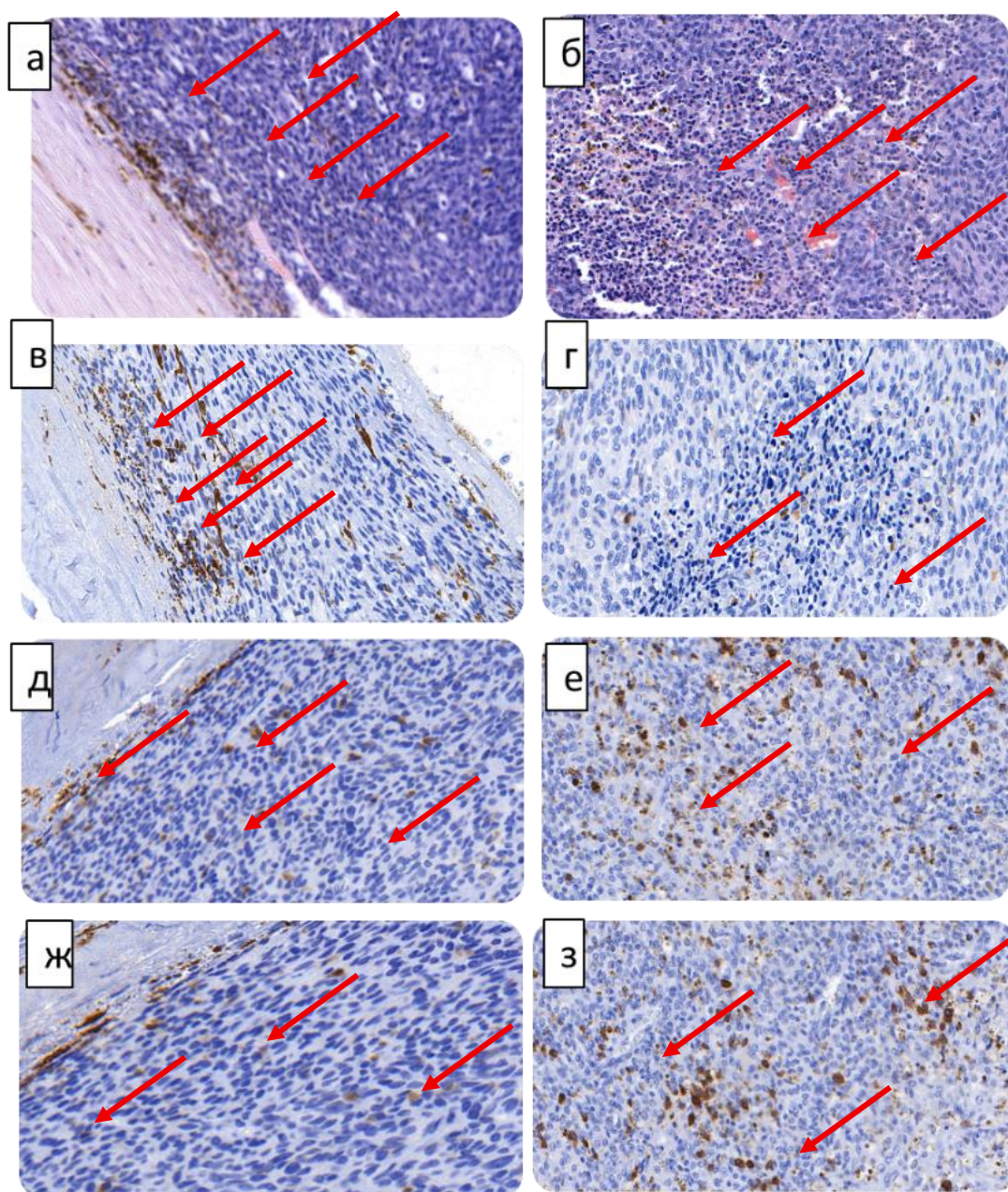


Рисунок 13. Микропрепараты энуклеированных глаз: а) перитуморальная строма, окраска гематоксилином-эозином, микроокружение опухоли (увеличение $\times 40$); б) инфильтрация в строме опухоли; в) Положительная ИГХ-реакция с антителами CD4 для выявления Т-хелперов CD4⁺ - лимфоцитов в перитуморальной строме (увеличение $\times 40$); г) наличие экспрессии CD4 в строме опухоли; д) Положительная ИГХ-реакция с антителами CD8 для выявления Т-цитотоксических CD8⁺ - лимфоцитов в перитуморальной строме (увеличение $\times 40$); е) наличие экспрессии CD8 в строме опухоли; ж) Положительная ИГХ-реакция с антителами CD25 для выявления Т-лимфоцитов CD25⁺ - лимфоцитов в перитуморальной строме (увеличение $\times 40$); з)

наличие экспрессии CD25 в строме опухоли. Стрелками обозначены лимфоидные клетки.

Все наши пациенты имели МХ T₃₋₄N₀M₀. Таким образом, лимфоидную инфильтрацию мы оценивали в группе больных при наличии первичного очага и доказанном отсутствии метастазов. Подсчет лимфоцитов проведен по описанной методике, но в 10 полях. Минимальные показатели лимфоидной инфильтрации составляли 1%, максимальные - 25%. По характеру инфильтрация была представлена в виде отдельных фокусов (17 глаз), вариация инфильтрации колебалась в пределах от 1 до 10%. Сплошная (или плотная) инфильтрация опухоли имела место в 4 глазах. В 6 глазах инфильтрация меланомы сочеталась с появлением лимфоидного микроокружения. Более низкий процент лимфоидной инфильтрации опухоли наблюдали при веретенноклеточном типе МХ (11 глаз). Но именно в этой группе имели место больные с метастазами в печень при лимфоидной инфильтрации опухоли не более 10% (сроки выявления метастазов через 6 и 10 месяцев после энуклеации). Локальная воспалительная реакция в 3 случаях веретенноклеточных МХ сопровождалась перифокальным лимфоидным микроокружением. Два из этих наблюдений относятся к нашим больным с развившимися метастазами. Складывается впечатление, что в большей степени угрозой метастазирования является именно формирование микроокружения. Доказательством этого является и увеличение лимфоидной инфильтрации и в метастатических очагах [17, 33, 78].

Эпителиоидная меланома представлена одним наблюдением, инфильтрация ткани опухоли не превышала 7%. Известно, что эпителиоидная УМ относится к наиболее агрессивно растущим внутриглазным меланомам. Количество представителей иммунитета в опухоли не намного выше, но в сочетании с такими признаками, как высокая плотность ангиогенеза, аннулярная форма роста юкстапапиллярной УМ, выход опухоли за пределы склеры резко ухудшают витальный прогноз в данном случае. Глаза со смешанноклеточной меланомой составили 13,3%, степень лимфоидной инфильтрации (в пределах 2-25%) отмечена практически в половине случаев (6 глаз),

представлена она была в виде отдельных фокусов скопления лимфоцитов (3 глаза), диффузной инфильтрацией лимфоцитами (3 глаза). В трех из этих опухолей имеется перифокальная инфильтрация. При сроках наблюдения 10-19 месяцев ($15,5 \pm 3,14$) видимых метастазов не выявлено. Однако локальное лимфоидное окружение УМ остается тревожным симптомом их возникновения [51].

Таким образом, лимфоидная инфильтрация, как элемент воспалительного неспецифического ответа на развитие опухоли, имеет место и при УМ, но, в отличие от других локализаций, увеличение степени инфильтрации её свидетельствует, скорее всего, об агрессивности процесса. Несмотря на то, что средняя степень лимфоидной инфильтрации опухоли у наших больных ограничивается достаточно низкими показателями (медиана 5,5%), анализ уровня экспрессии микроРНК-155 в этой группе оказался выше ($p=0,02$), чем у больных УМ без лимфоидной инфильтрации (рисунок 14).

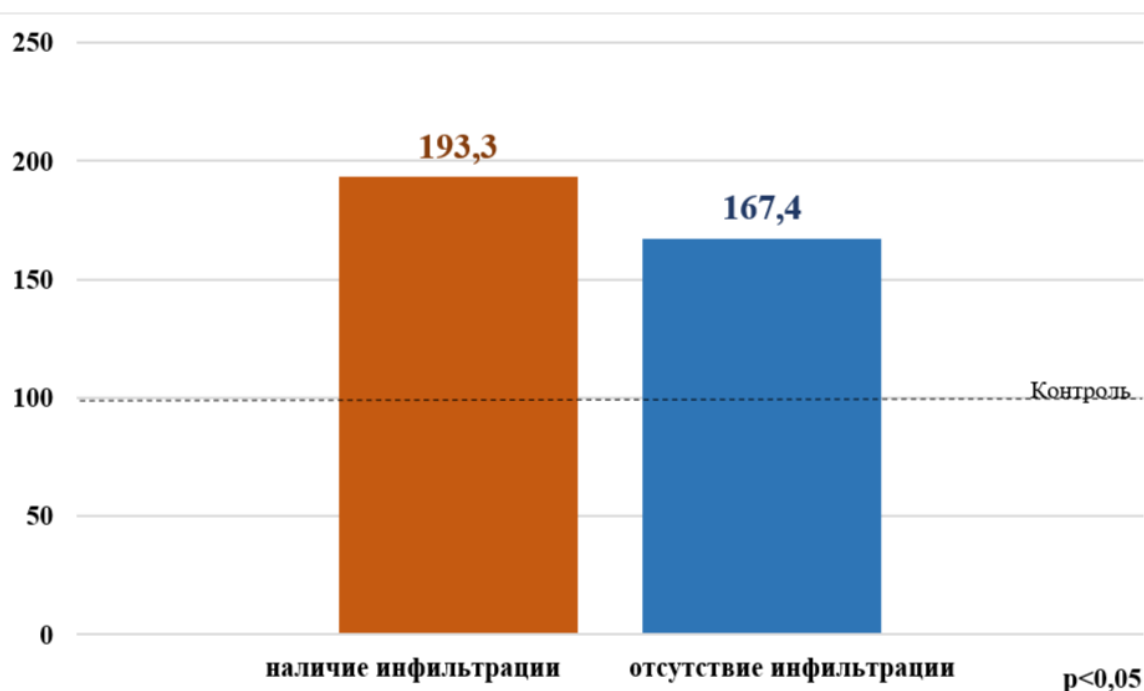


Рисунок 14. Графическое изображение уровня экспрессии микроРНК-155 в плазме крови больных УМ до операции с лимфоидной инфильтрацией опухоли (n-18) и без неё (n-65) (средние показатели, различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$))

Показатели экспрессии микроРНК-155 в плазме крови больных УМ во второй группе практически соответствует данным литературы [29]. Сопоставление уровня экспрессии микроРНК-155 в плазме крови у больных УМ (n=18) со степенью активности лимфоидной инфильтрации первичного узла четко указывает на тенденцию увеличения экспрессии микроРНК-155 в плазме крови по мере увеличения степени лимфоидной инфильтрации УМ (рисунок 15) (коэффициент корреляции Пирсона = 0,94, $p < 0,001$).

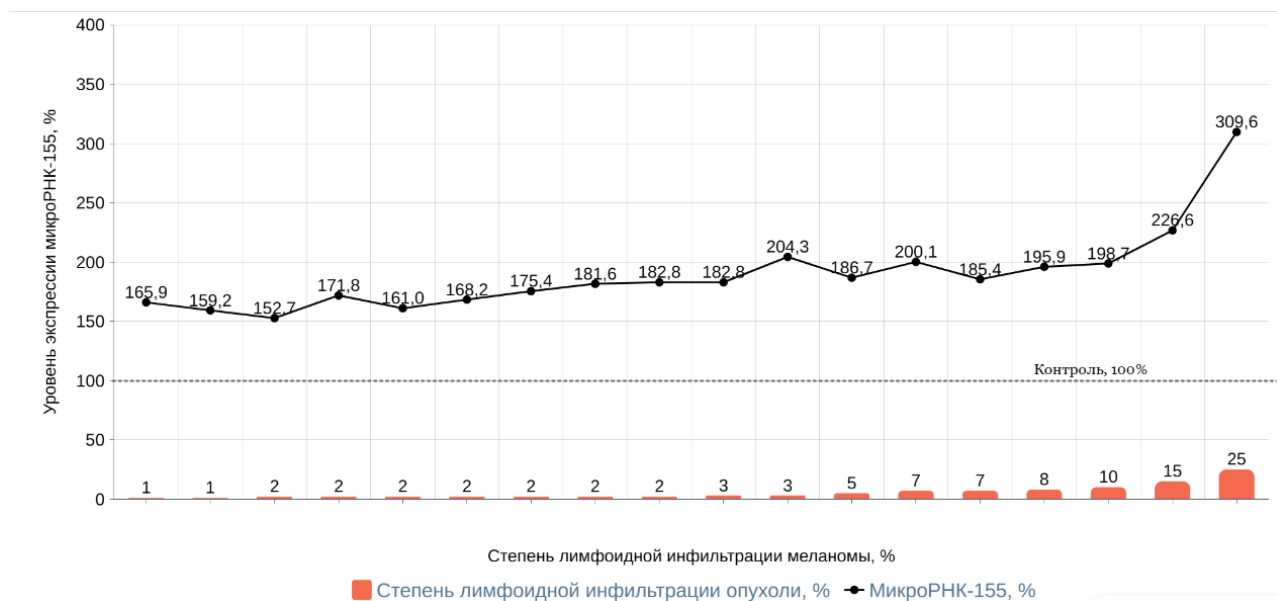


Рисунок 15. Графическое изображение корреляции уровня экспрессии микроРНК-155 плазмы крови больных со степенью лимфоидной инфильтрации ткани МХ. Красным обозначена степень лимфоидной инфильтрации опухоли, черным – уровень экспрессии микроРНК-155 в плазме крови тех же больных.

Оказалось, что после энуклеации уровень экспрессии микроРНК-155 в плазме крови тех же больных снижается в среднем в 14,1 раз (рисунок 16).

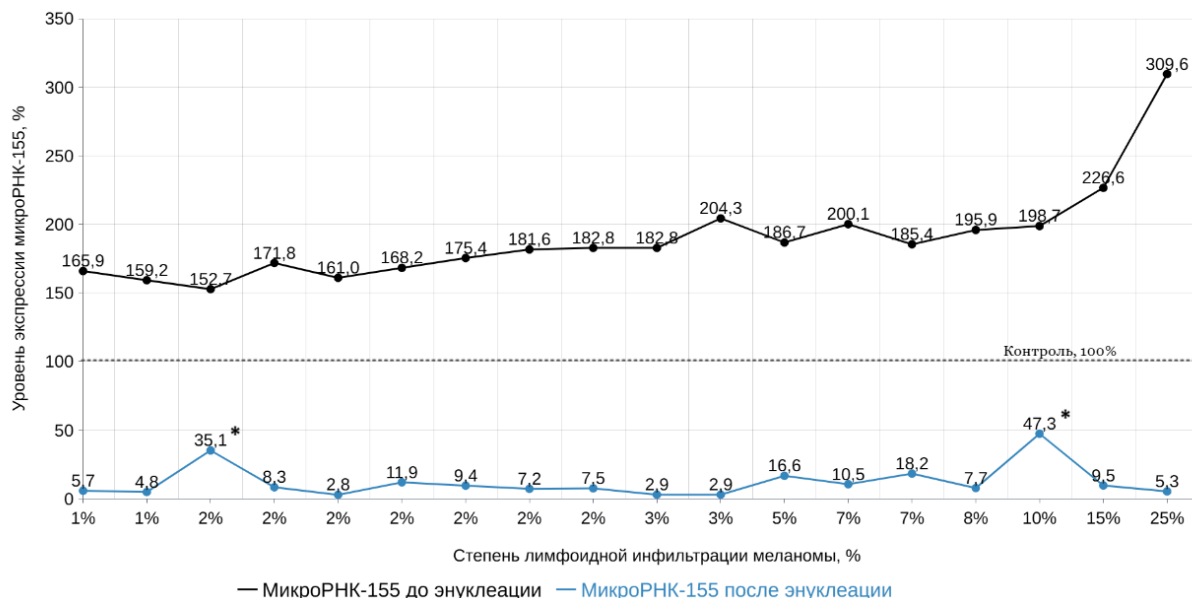


Рисунок 16. Уровень экспрессии микроРНК-155 в плазме крови больных увеличенной меланомой с лимфоидной инфильтрацией первичного узла до энуклеации (обозначено черным) и после операции (обозначено синим)

*уровень экспрессии микроРНК-155 в плазме крови больных после энуклеации на фоне выявленных гематогенных метастазов.

Исключением явились два пациента, у которых в ранние сроки были выявлены гематогенные метастазы: экспрессия микроРНК-155 снизилась у них значительно меньше (в 4,2 и 4,6 раза соответственно). Конечно, сроки наблюдения в нашей группе больных невелики, но выявление двух метастазов из достаточной малочисленной группы больных (18 человек) уже свидетельствует об агрессивности лимфоидной инфильтрации на ранней стадии её проявления. Представленные в данной главе показатели увеличения потенциала микроРНК-155 в плазме крови больных при прогрессировании УМ напрямую связаны с инфильтрацией опухоли лимфоцитами, основными представителями которых являются Т-лимфоциты [63].

3.3. Гематогенные метастазы меланомы хориоидеи и реакция микроРНК в плазме крови больного

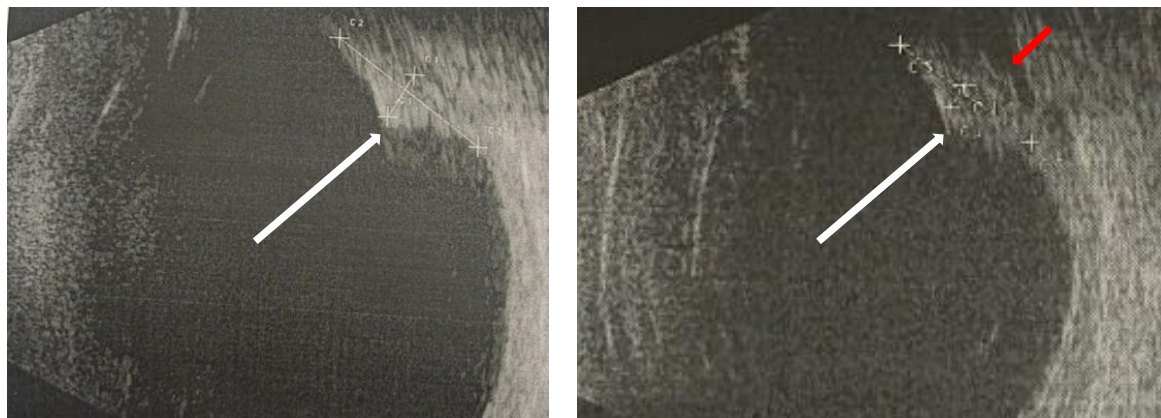
Гематогенные метастазы в процессе обследования и наблюдения за больными с МХ (124 человека) выявлены у девяти из них в сроки от 5 до 45 месяцев после проведения брахитерапии МХ (n-2) или энуклеации пораженного глаза (n-7) (таблица 12). До лечения у всех больных подтверждено M_0N_0 .

Таблица 12.

Частота и сроки появления метастазов в группе пролеченных больных МХ

Вид лечения		Брахитерапия (n-41)	Энуклеация (n-83)
Метастазы (n(%))		2 (4,9%)	7 (8,4%)
Возраст (лет)	без метастазов	60,4±15,5	60,7±12,2
	с метастазами	49,0±1,41	64,9±7,49
Срок наблюдения (мес)		31,9±18,51	49,84±20,14
Срок выявления метастазов (мес)		5; 48	6-45 (26,6±15,3)
Проминенция опухоли (мм)		3,1±1,45	9,3±4,0

Брахитерапия и гематогенные метастазы. Как следует из таблицы 12, в группе больных, получавших БТ, метастазы зафиксированы у двух пациентов через 5 и 48 месяцев после лечения. Следует отметить, что речь идет о больных с МХ, локализующимися постэкваториально и имеющих проминенцию 2,0 и 4,18 мм. При этом у первого пациента с начальной МХ метастаз был выявлен через 48 месяцев на фоне остаточной опухоли после БТ, которую наблюдали в процессе диспансерного наблюдения. Проминенция остаточной опухоли не превышала всё это время 1,15 мм (рисунок 17) и была окружена постлучевым рубцом.



а) $h=2,0$ мм б) $h=1,15$ мм

Рисунок 17. Эхограмма больной Б. 48 лет. Диагноз - начальная МХ а) эхограмма до брахитерапии, стрелкой обозначена тень опухоли; б) эхограмма через 32 месяца после брахитерапии, белая стрелка – тень остаточной облученной опухоли, красная стрелка – зона контакта ОА со склерой.

Исследование уровня экспрессии микроРНК в плазме крови через 32 месяца после БТ показало снижение всех показателей в пределах контрольных значений (рисунок 18).

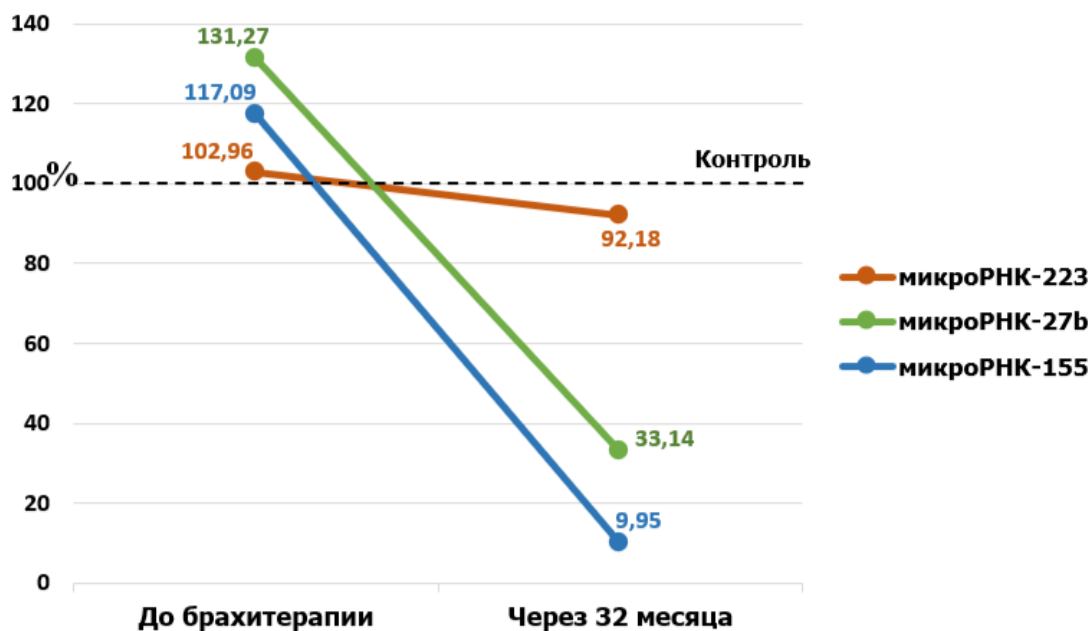


Рисунок 18. График уровня экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 больной Б. 48 лет (объяснение в тексте).

Но через 16 месяцев у больной были выявлены множественные метастазы, повторное исследование уровня микроРНК в плазме крови больной в этот период провести не удалось в связи с тяжелым общим состоянием пациентки (летальный исход наступил через 2 месяца после выявления метастазов). Таким образом, даже начальные опухоли имеют возможность метастазировать и приводить к генерализации процесса в течение нескольких месяцев. Приведенное наблюдение свидетельствует о том, что остаточных спокойных опухолей, скорее всего, не бывает, и такие опухоли обязательно подлежат повторному разрушению.

Что касается больного Т. 50 лет с диагнозом МХ средних размеров, то метастатическая болезнь была определена через 5 месяцев после БТ на основании множественных очаговых метастазов в печени. Обращает на себя внимание заключение рентгенологов о наличии кисты в печени. Именно на этом основании больному была проведена БТ внутриглазной опухоли. Выявленные при очередном плановом обследовании (через 5 месяцев) множественные очаги в печени расценили как метастатическое поражение. Анализ экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b и микроРНК-155, проведенный через 3 (до выявления метастазов) и 10 месяцев (на фоне выявленных метастазов) после окончания БТ показывал необычное увеличение уровня экспрессии микроРНК, и особенно это касается микроРНК-27b (рисунок 19).

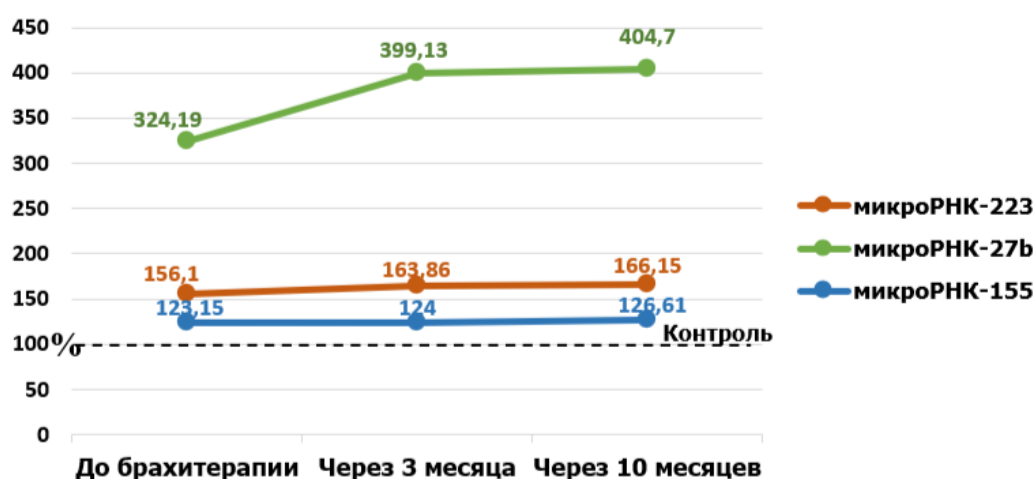
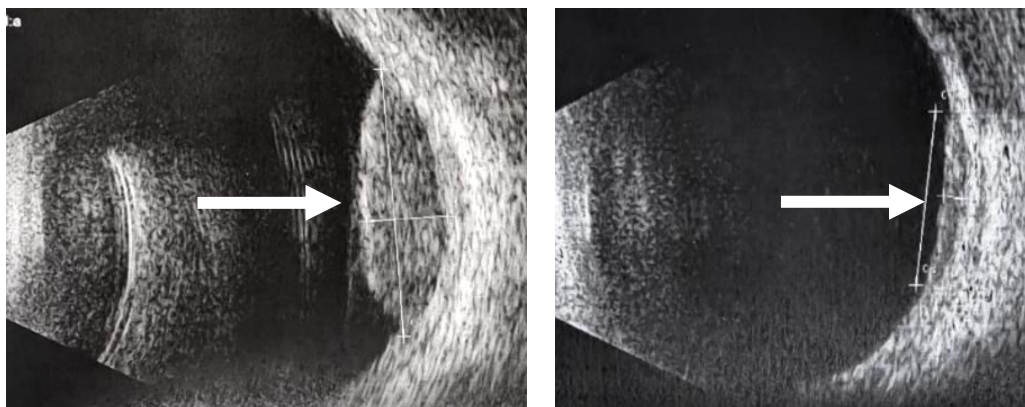


Рисунок 19. График уровня экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 в плазме крови больного средней МХ Т. 50 лет (объяснение в тексте).

Эти изменения имели место на фоне, казалось бы, благополучной резорбции опухоли (рисунок 20).



а) толщина МХ - 4,61 мм б) толщина МХ - 1,07 мм

Рисунок 20. Эхограмма пациента Т. 50 лет а) эхограмма до брахитерапии; б) через 10 месяцев после брахитерапии (стрелками обозначена зона тень опухоли).

Таким образом, уже через 3 месяца после БТ микроРНК показали подъем своей экспрессии. И, несмотря на проводимую иммунотерапию, микроРНК-27b, микроРНК-223 и в меньшей степени микроРНК-155 показывали увеличение своей экспрессии в плазме крови.

Приведенные наблюдения позволяют сделать следующие выводы: остаточная опухоль в пределах 1 мм всегда представляет опасность в плане метастазирования. А реакция микроРНК в ответ на развитие метастатической болезни вероятно происходит в более короткие сроки, что требует регулярного проведения исследования уровня микроРНК в плазме крови больных МХ в процессе диспансерного наблюдения после проведенного лечения.

Энуклеация и гематогенные метастазы. Среди больных, перенесших энуклеацию (n-83), у 7 выявлены метастазы в сроки 6 - 45 месяцев после лечения. До энуклеации у всех больных по результатам обследования внутренних органов метастазы были исключены, а уровень экспрессии микроРНК в плазме крови был в пределах показателей, типичных для больных с большими МХ.

В процессе диспансерного наблюдения за больными метастазы были выявлены через 6 и 10 месяцев у двух больных, через 21 и 29 месяцев у двух больных, и через 31, 44 и 45 месяцев у трех больных.

Как показали предыдущие результаты, уровень экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b и микроРНК-155 резко снижается после ликвидации опухолевого очага в среднем в 7,6 раз (микроРНК-223), в 8,4 раза (микроРНК-27b) и в 15,4 раза (микроРНК-155) до уровня ниже контрольного, причем как в первые 12 месяцев, так и в сроки более 3 лет (рисунок 11).

В двух случаях метастазы были выявлены в пределах первого года после операции: через 6 и 10 месяцев после энуклеации.

У пациентки М. 72 лет с большой МХ (14,07х18,41 мм) исследование экспрессии микроРНК, проведенное через 3 месяца после энуклеации, свидетельствовало о резком снижении показателей уровня всех микроРНК (рисунок 21): микроРНК-223 в 3,8 раз (на 74%), микроРНК-27b в 3,5 раза (на 71%) и микроРНК-155 в 4,0 раза (на 74%). Нас насторожило то, что несмотря на послеоперационные результаты экспрессии микроРНК в пределах контроля, снижение это происходило в меньшей степени, чем у больных в аналогичные сроки. Спустя еще 3 месяца (6 месяцев после энуклеации) повторное проведение исследования ПЦР продемонстрировало рост показателей: в большей степени микроРНК-27b – в 2 раза, в меньшей микроРНК-223 – в 1,1 раза. Что касается микроРНК-155, то она снизилась незначительно – в 1,06 раза. К этому времени проведена повторная МРТ печени, по результатам которой выявлен одиночный метастаз в печень размерами 6х11 мм.

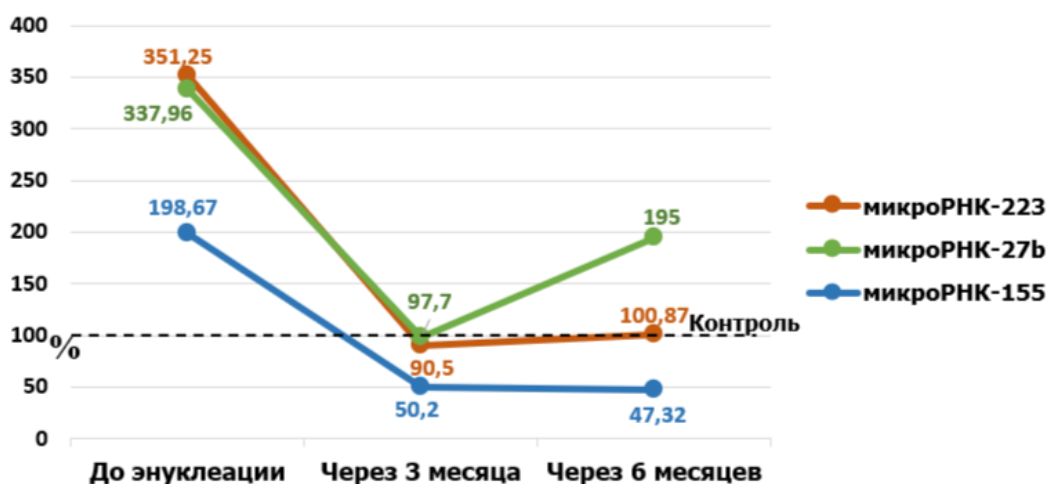


Рисунок 21. Экспрессия микроРНК в плазме крови больной 72 лет, у которой через 6 месяцев после энуклеации выявлен метастаз в печень.

Больному М. 60 лет, с диагнозом МХ (размеры 12,96x13,3 мм) исследование микроРНК было проведено через 3 месяца после энуклеации (рисунок 22). Уровни экспрессии микроРНК в плазме крови данного больного снизились: микроРНК-223 в 2 раза (на 51%), микроРНК-27b в 2,6 раз (на 62%), микроРНК-115 в 4,3 раза (на 77%), однако снижение это происходило в меньшей степени по сравнению с больными в аналогичные сроки, и оставался выше контроля в 2,4 раза (микроРНК-223) и в 3,4 раза (микроРНК-27b). При повторном проведении МРТ через 7 месяцев после исследования (10 месяцев после энуклеации) обнаружены очаги в печени вторичного характера.

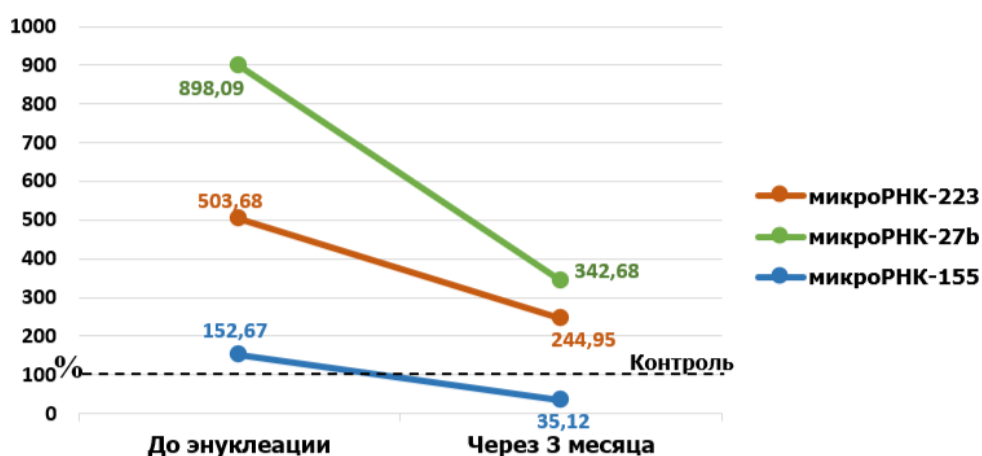


Рисунок 22. Уровень экспрессии микроРНК в плазме крови больного 60 лет с выявленными метастазами в печень через 10 месяцев после энуклеации.

Таким образом, ликвидация опухолевого очага из организма, вероятно, способствует резкому снижению экспрессии микроРНК в плазме крови больных в первые месяцы после операции. Эти два случая объединяет недостаточное снижение экспрессии микроРНК в плазме крови через 3 месяца, что и отличает их от остальной группы больных без выявленных метастазов. Повышение экспрессии микроРНК, в особенности микроРНК-27b, предшествует выявлению метастатических очагов, что может быть использовано в качестве вспомогательного способа раннего выявления скрытого метастазирования у больных МХ после лечения.

В двух случаях у больных 56 и 69 лет повторное исследование было проведено на фоне выявленных через 31 и 45 месяцев после энуклеации метастазов в печень. Показатели экспрессии микроРНК-27b оказались увеличенными в 2,7 и 3,3 раза (соответственно на 173% и 233%) от исходных показателей (рисунок 23). Уровень экспрессии микроРНК-223 в плазме крови одного больного оказался выше в 1,2 раза (на 15%), в то время как у другого больного показатели снизились в 1,8 раз (на 45%), оставаясь всё же в 2 раза выше контрольных значений. Что касается микроРНК-155, то показатели экспрессии снижены в обоих случаях ниже исходных значений в 7,5 и 6,3 раза (на 86% и 84% соответственно).

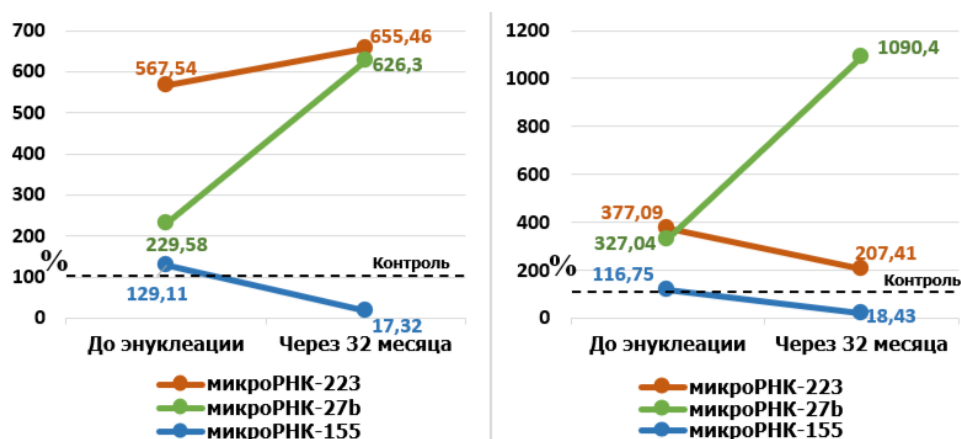


Рисунок 23. Характер экспрессии микроРНК в плазме крови больных на фоне гематогенного метастазирования.

Таким образом, реакция микроРНК в виде повышения уровня экспрессии их в плазме крови и сохранении его на высоком уровне были связаны с метастатическим процессом. Исследованные микроРНК могут быть использованы в качестве биомаркеров прогрессирования опухолевого заболевания.

Двое больных к моменту исследования уровня экспрессии микроРНК в плазме крови получали химиотерапию в течение 7 и 14 месяцев по поводу гематогенного метастазирования МХ после энуклеации глаза с первичной опухолью. Метастазы у данных больных выявлены через 29 и 21 месяц послеэнуклеации (рисунок 24).

Полученные в ходе исследования данные выявили вариативность изменений уровней экспрессии микроРНК в анализируемых клинических случаях. В частности, в обоих случаях выявлено стойкое повышение уровня экспрессии микроРНК-27b по сравнению с исходными значениями, зарегистрированными до проведения энуклеации: увеличение составило 2,5 и 2,8 раза соответственно. Это может свидетельствовать не только об агрессивности опухолевого процесса, но и неэффективности проводимой терапии гематогенных метастазов МХ.

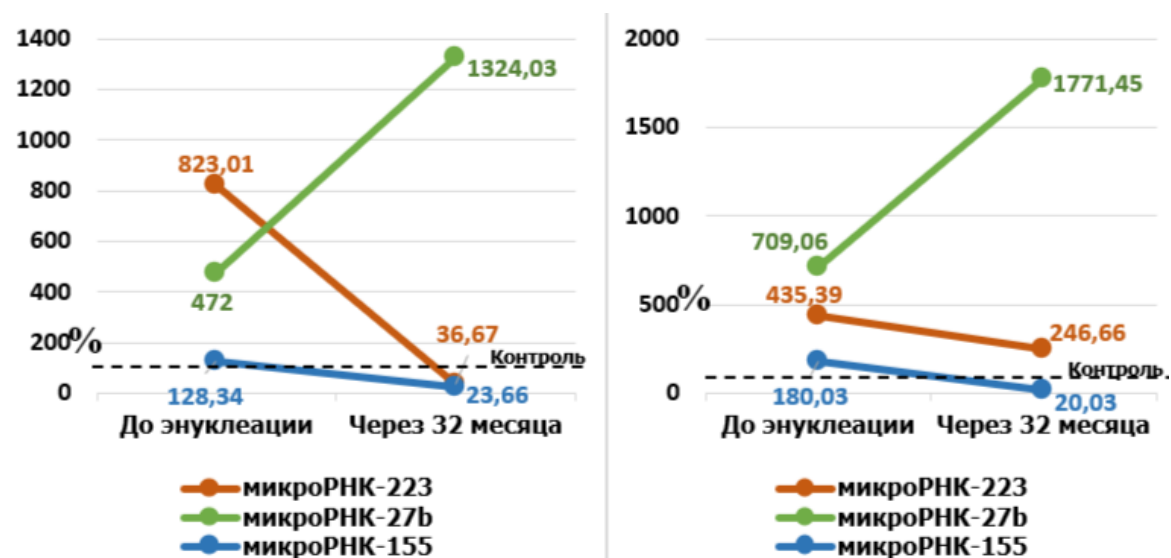


Рисунок 24. Характер экспрессии микроРНК в плазме крови больных МХ на фоне химиотерапии по поводу гематогенного метастазирования.

Что касается микроРНК-223, то показатели её разнородны: у пациента с 7-месячным анамнезом полихимиотерапии по поводу метастазов уровень экспрессии микроРНК-223 снизился ниже контрольных значений. А у пациента с более длительным лечением, и следует сказать малоэффективным (по данным обследования количество и размеры метастазов увеличивались), микроРНК-223 снизилась всего в 1,8 раза. Два случая, конечно, не являются основанием для окончательных выводов, но всё же позволим себе предположить, что приведенные выше наблюдения подтверждают отсутствие эффективной химиотерапии как первичной, так и метастатической МХ [87].

Последнее анализируемое наблюдение касается больного П. 56 лет, наблюдавшегося на протяжении 32 месяцев после энуклеации, при плановом обследовании инструментально подтверждено отсутствие признаков метастазирования опухоли во внутренних органах. Исследование плазмы крови данного больного было проведено спустя 36 месяцев после энуклеации, и оказалось, что уровень экспрессии двух микроРНК (-223, -27b) был значительно повышен (соответственно на 174% и 80%) по сравнению с исходными показателями (рисунок 25). А спустя 8 месяцев при очередном плановом осмотре выявлены множественные метастазы в печень.

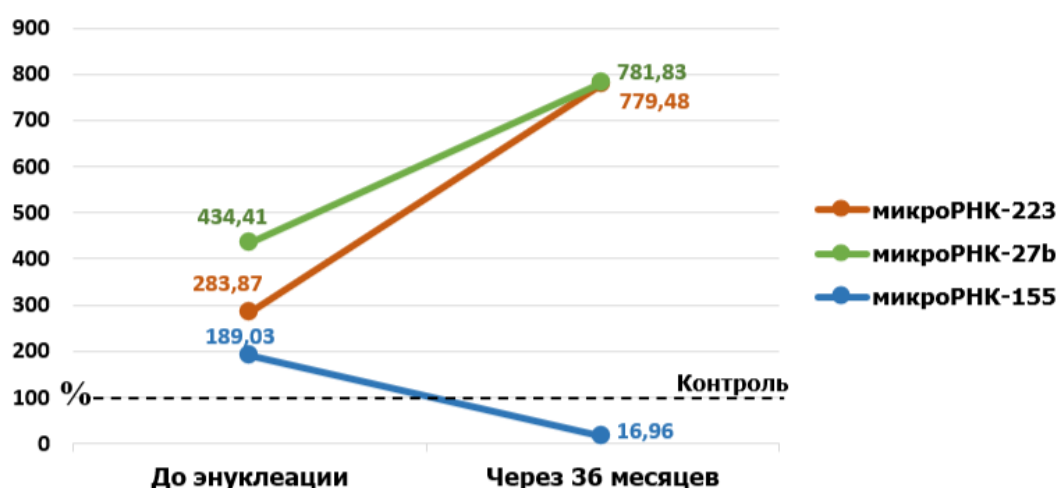


Рисунок 25. Характер экспрессии микроРНК в плазме крови больного П. 56 лет за 8 месяцев до визуализации гематогенных метастазов МХ (КТ, МРТ).

Таким образом, реакция микроРНК в плазме крови в виде повышения экспрессии микроРНК-223 и микроРНК-27b в ответ на развивающиеся гематогенные метастазы предшествовала их клиническому выявлению.

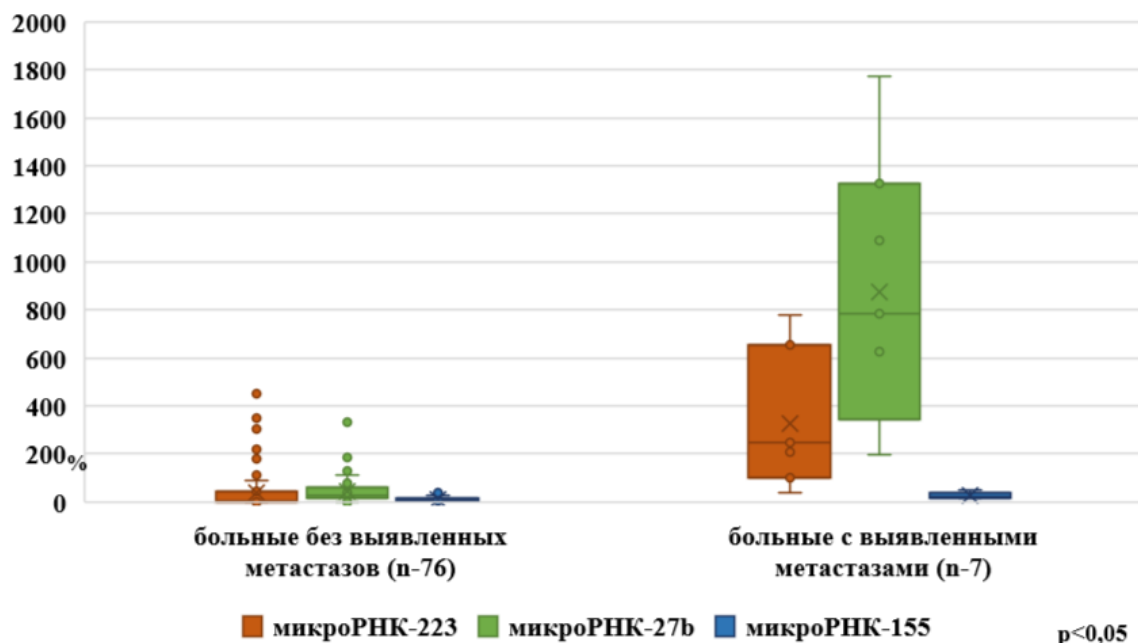


Рисунок 26. Уровень экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 в плазме крови больных МХ, перенесших энуклеацию без выявленных метастазов (n=76) и с выявленными в процессе наблюдения метастазами (n=7).

Уровень экспрессии микроРНК-27b в группе больных с выявленными метастазами (n=7) в среднем составил $876,0 \pm 558,0\%$ (рисунок 26), что статистически значимо превышало значения у пациентов без признаков метастазирования. Эти данные указывают на то, что повышенная экспрессия микроРНК-27b ассоциирована с наличием метастатического процесса и может рассматриваться как перспективный биомаркер доклинической стадии метастатической болезни МХ.

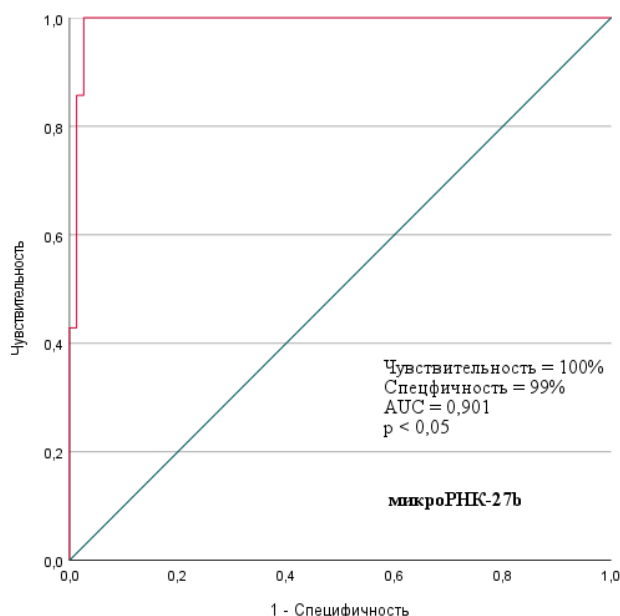


Рисунок 27. ROC-кривая диагностической значимости микроРНК-27b в дифференциации пациентов с выявленными метастазами (n-7) и без (n-76).

Проведённый анализ ROC-кривых (рисунок 27) свидетельствует о высокой диагностической значимости повышения экспрессии микроРНК-27b в плазме крови у пациентов с установленным метастатическим поражением в процессе наблюдения (AUC=0,901; чувствительность — 100%; специфичность — 99%; $p < 0,05$).

В заключении, следует отметить, что реакция микроРНК возникает как на фоне гематогенного метастазирования, так и предшествует его клинико-инструментальному выявлению. Исследование следует проводить в сроки не более 12 месяцев.

Заключение

В ходе исследования впервые доказано, что динамика уровня экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b² и микроРНК-155 в плазме крови пациентов может служить объективным критерием оценки эффективности брахитерапии и энуклеации, а также предиктором скрытого метастазирования.

Доказано, что в группе больных, получивших брахитерапию, имеется постепенное снижение уровня экспрессии микроРНК по мере регресса опухоли и замещения её постлучевым ретиносклеральным рубцом: у больных начальными МХ отмечено снижение уровня экспрессии микроРНК-223 на 15%, микроРНК-27b – на 15%, микроРНК-155 – на 23% в первые 18 месяцев после БТ, оставаясь выше контрольного уровня, а в отдаленные сроки (38,0±5,67 месяцев) на фоне сформировавшегося рубца показатели экспрессии микроРНК плазмы крови больных оказались ниже контрольных значений.

Что касается больных средними МХ, то спустя 12,88±1,81 месяцев после БТ выявлено снижение экспрессии в плазме крови микроРНК-223 на 13%, микроРНК-27b – на 23%, микроРНК-155 – на 11%, что практически соответствует показателям больных с начальными МХ. В отдаленные сроки наблюдения за больными после БТ (38,0±5,67 месяцев) снижение уровня экспрессии микроРНК-223 в плазме крови было на 59%, микроРНК-27b – на 41%, а микроРНК-155 – на 73% от исходных показателей, что оказалось ниже контрольных значений. Таким образом, низкие показатели экспрессии исследуемых микроРНК в сроки от 3 лет и выше после брахитерапии при формировании ретиносклерального рубца и отсутствии признаков гематогенного метастазирования опухоли у больных свидетельствуют о положительном эффекте брахитерапии.

Энуклеация, как метод лечения МХ, в последние годы подвергается критическому пересмотру. Наряду со сторонниками, есть и исследователи, высказывающие противоположное мнение, утверждающие не только отсутствие

² патент №2828566 14.10.2024

эффекта, но и активизацию метастазирования после энуклеации [10, 19]. Нами исследован уровень экспрессии микроРНК плазмы крови 83 больных при максимальных сроках наблюдения 60 месяцев. Важно, что энуклеация была проведена только при больших опухолях, которые сами по себе уже являются фактором риска наличия метастазов [122]. И у этих пациентов отмечено снижение уровня экспрессии всех исследованных микроРНК ниже контроля как через 3 месяца (микроРНК-223 в 19,0 раз, микроРНК-27b в 8 раз и микроРНК-155 в 16,9 раз), так и в более отдаленные сроки после энуклеации (32-60 месяцев): экспрессия микроРНК-223 уменьшалась в 5,9 раз, микроРНК-27b — в 7 раз, а микроРНК-155 — в 13 раз, что коррелировало с положительной динамикой клинического состояния пациентов.

Особое значение имеет выявление связи между повышением уровня экспрессии микроРНК-27b и развитием метастатической болезни. Установлено, что рост экспрессии этой молекулы предшествует визуализации метастазов инструментальными методами (МРТ, КТ) на 8-16 месяцев, что позволяет считать её высокочувствительным (100%) и специфичным (87%) биомаркером.

Микроокружение опухоли как фактор агрессивности её роста привлекает внимание последние 30 лет [51]. Была проведена корреляция уровня экспрессии микроРНК-155 с наличием лимфоидного микроокружения опухоли у 18 больных МХ. Доказано, что повышенная экспрессия её в плазме крови ассоциирована с наличием и степенью лимфоидной инфильтрации в микроокружении МХ, что, как известно, при МХ является фактором высокого риска метастазирования и плохого витального прогноза в отличие от опухолей других локализаций.

Резюмируя изложенное, позволим себе заключить, что микроРНК-223, микроРНК-27b и микроРНК-155, циркулирующие в плазме периферической крови, могут служить объективным критерием не только наличия МХ, но и оценки эффективности проведенного лечения этой опухоли.

Напротив, устойчиво высокий уровень экспрессии исследованных микроРНК, в частности микроРНК-27b, в исходный период наблюдения может указывать на наличие скрытого метастатического процесса, что обосновывает целесообразность рассмотрения возможности профилактического терапевтического вмешательства в данной группе пациентов.

Выводы

1. Доказано снижение уровня экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 в плазме крови больных меланомой хориоидеи после брахитерапии в раннем и отдаленном периоде ($p < 0,05$). Установлено уменьшение степени снижения уровня экспрессии микроРНК в плазме крови по мере увеличения размеров опухоли ($p < 0,05$).

2. Установлено сохранение высоких показателей экспрессии исследуемых микроРНК в плазме крови больных МХ, превышающих контрольные показатели в 2-4 раза, отсутствие полного регресса опухолевого узла в процессе наблюдения за больными в течение $31,9 \pm 18,51$ месяцев, что свидетельствует о малой эффективности брахитерапии при больших МХ.

3. Доказано значительное снижение уровня экспрессии микроРНК-223 (в 19,0 раз), микроРНК-27b (в 8 раз) и микроРНК-155 (в 16,9 раз) ($p < 0,05$) в плазме крови больных большой меланомой хориоидеи после энуклеации в ранние сроки (3-12 месяцев). В отдаленные сроки (32-60 месяцев) снижение тех же микроРНК соответственно в 5,9 раз, 7 раз и 13 раз после проведенного лечения.

4. Доказано повышение уровня экспрессии циркулирующей в плазме крови микроРНК-27b как на фоне явной метастатической болезни, так и скрытого метастазирования после проведенного локального лечения (брахитерапия и энуклеация) (чувствительность 100%, специфичность 99%; $p < 0,05$).

5. Выявленная корреляция повышенной экспрессии микроРНК-155 в плазме крови больного с лимфоидной инфильтрацией МХ и её микроокружения ($p = 0,02$) может служить показателем агрессивности опухоли, что подтверждается развитием гематогенных метастазов у 11% больных.

Практические рекомендации

1. Для своевременного выявления метастатического процесса на доклиническом этапе целесообразно проводить определение уровня экспрессии микроРНК-27b до начала планируемого лечения, а в последующем — выполнять контрольные измерения с периодичностью 1–2 раза в год в рамках диспансерного наблюдения за пациентами.
2. Для подтверждения эффективности проводимой брахитерапии меланомы хориоидеи можно рекомендовать анализ экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b в плазме крови больных МХ после проведенной брахитерапии в сроки от 24 месяцев при условии клинически доказанной регрессии опухоли.
3. Для оценки эффективности энуклеации, как метода лечения больших меланом хориоидеи, возможно проведение анализа экспрессии микроРНК-223, микроРНК-27b, микроРНК-155 в плазме крови оперированных больных начиная с 3 месяцев после операции.

Список литературы

1. Авакян К. В., Саакян С. В., Амирян А. Г., Асланиди И. П., Мухортова О. В. Возможности современных инструментальных методов исследования в визуализации метастатических очагов у больных увеальной меланомой // Голова и шея. – 2017. – № 3. – С. 11–16.
2. Бровкина А. Ф. Локальное лечение меланом хориоидеи: возможности и ограничения // Вестник офтальмологии. – 2018. – Т. 134. – № 4. – С. 52–60.
3. Бровкина А. Ф., Цыбикова Н. Д. МикроРНК в уточнённой диагностике меланомы хориоидеи // Acta Biomedica Scientifica. – 2021. – Т. 6. – № 6-1. – С. 65–73.
4. Бровкина А. Ф., Цыбикова Н. Д. МикроРНК — биомаркер агрессивности меланомы хориоидеи // Российский офтальмологический журнал. – 2022. – Т. 15. – № 1. – С. 7–12.
5. Бровкина А. Ф., Вальский В. В., Гусев Г. А. Офтальмоонкология: руководство для врачей. – М.: Медицина, 2002. – 424 с. – (Руководство для врачей). – ISBN 5-225-04157-4.
6. Бровкина А. Ф., Зарубей Г. Д., Вальский В. В. Критерии эффективности брахитерапии увеальных меланом, осложнения, их профилактика // Вестник офтальмологии. — 1997. — Т. 113. — № 3. — С. 14–16.
7. Бровкина А. Ф., Яровая Г. А., Цыбикова Н. Д. МикроРНК в офтальмологии // Офтальмология. — 2021. — Т. 18, № 2. — С. 188–197.
8. Водолажский Д. И., Нехаева Т. Л., Балдуева И. А. Циркулирующие опухолевые клетки в онкологии // Сибирский онкологический журнал. – 2022. – Т. 21. — № 3. – С. 117–125.
9. Еремеева Е. Р., Сетдикова Г. Р., Гришина Е. Е., Ким И. Д., Шикина В. Е. Анализ лимфоидной инфильтрации при увеальной меланоме // Злокачественные опухоли. — 2022. — Т. 12. — № 3S1. — С. 188.
10. Коробов Е. Н., Яровой А. А., Горшков И. М., Голубева О. В., Клеянкина С. С. Эндорезекция меланомы хориоидеи после брахитерапии Ru-106 как

- альтернатива энуклеации глаза // Практическая медицина (ПМ). — 2018. — Т. 16. — № 3. — С. 93-96.
11. Морозов В. И. Гематофтальмический барьер: структурно-функциональные особенности // Российский офтальмологический журнал. — 2017. — Т. 10, № 4. — С. 68–72.
 12. Саакян С. В., Ширина Т. В. Анализ метастазирования и выживаемости больных увеальной меланомой // Опухоли головы и шеи. — 2012. — № 2. — С. 53–57.
 13. Саакян С. В., Амирян А. Г., Вальский В. В., Миронова И. С., Цыганков А. Ю. Причины энуклеации после брахитерапии увеальных меланом // Российский офтальмологический журнал. — 2016. — Т. 9. — № 4. — С. 46–51.
 14. Саакян С. В., Амирян А. Г., Цыганков А. Ю., Хлгатын М. Р. Выживаемость больных увеальной меланомой в отдаленные сроки наблюдения в сопоставлении с клинико-гемодинамическими и морфологическими характеристиками опухоли // Российский офтальмологический журнал. — 2022. — Т. 15. — № 2. — С. 85–91.
 15. Саакян С. В., Захарова Г. П., Мякошина Е. Б. Клеточное микроокружение увеальной меланомы: клинико-морфологические корреляции и предикторы неблагоприятного прогноза // Молекулярная медицина. — 2020. — Т. 18. — № 3. — С. 27–33.
 16. Стоюхина А. С., Чесалин И. П. Выживаемость больных меланомой хориоидеи больших размеров // Вестник офтальмологии. — 2014. — Т. 130. — № 4. — С. 39–44.
 17. Шаманова А. Ю., Казачков Е. Л., Панова И. Е., Важенин А. В., Шамаева Т. Н., Алымов Е. А. Особенности лимфоцитарного микроокружения в метастазирующей увеальной меланоме // Уральский медицинский журнал. — 2021. — Т. 20. — № 2. — С. 36–42.
 18. Шепкалова В. М., Хорасанян-Тадэ А. А., Дислер О. Н. Внутриглазные опухоли: атлас. — М.: Медицина, 1965. — 232 с.

19. Яровой А. А., Магарамов Д. А. Меланома хориоидеи стадии T2 высотой более 6,0 мм: органосохраняющее лечение с использованием брахитерапии и транспупиллярной термотерапии или энуклеация? Анализ выживаемости // Вестник офтальмологии. — 2011. — Т. 127. — № 1. — С. 43–46.
20. Achberger S., Aldrich W., Tubbs R., Crabb J. W., Singh A. D., Triozzi P. L. Circulating immune cell and microRNA in patients with uveal melanoma developing metastatic disease // *Molecular Immunology*. — 2014. — Vol. 58. - № 2. — P. 182–186.
21. Albert D. M. The ocular melanoma story. LIII Edward Jackson memorial lecture: Part II // *American Journal of Ophthalmology*. — 1997. — Vol. 123. — № 6. — P. 729–741.
22. Alunni-Fabbroni M., Majunke L., Trapp E. K., Tzschaschel M., Mahner S., Fasching P. A., Fehm T., Schneeweiss A., Beck T., Lorenz R., Friedl T. W. P., Janni W., Rack B. Whole blood microRNAs as potential biomarkers in post-operative early breast cancer patients // *BMC Cancer*. — 2018. — Vol. 18. — P. 1–12.
23. Ardekani A. M., Naeini M. M. The role of microRNAs in human diseases // *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. — 2010. — Vol. 2. — № 4. — P. 161.
24. Ashworth T. R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death // *Australian Medical Journal*. — 1869. — Vol. 14. — P. 146.
25. Aughton K., Kalirai H., Coupland S. E. MicroRNAs and uveal melanoma: understanding the diverse role of these small molecular regulators // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2020. — Vol. 21. — № 16. — Art. 5648.
26. Augsburger J. J., Correa Z. M., Shaikh A. H. Effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma // *American Journal of Ophthalmology*. — 2009. — Vol. 148. — P. 119–127.
27. Augsburger J. J., Gamel J. W., Shields J. A., Markoe A. M., Brady L. W. Post-irradiation regression of choroidal melanomas as a risk factor for death from metastatic disease // *Ophthalmology*. — 1987. — Vol. 94. — № 9. — P. 1173–1177.

28. Aushev V. N., Zborovskaya I. B., Laktionov K. K., Girard N., Cros M.-P., Herceg Z., Krutovskikh V. Comparisons of microRNA patterns in plasma before and after tumor removal reveal new biomarkers of lung squamous cell carcinoma // *PLoS ONE*. — 2013. — Vol. 8. — № 10. — Art. e78649.
29. Azimi F., Scolyer R. A., Rumcheva P., Moncrieff M., Murali R., McCarthy S. W., Saw R. P., Thompson J. F. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma // *Journal of Clinical Oncology*. — 2012. — Vol. 30. — P. 2678–2683.
30. Barker C. A., Francis J. H., Cohen G. N., Marr B. P., Wolden S. L., McCormick B., Abramson D. H. 106Ru plaque brachytherapy for uveal melanoma: factors associated with local tumor recurrence // *Brachytherapy*. — 2014. — Vol. 13. — № 6. — P. 584–590.
31. Bellerive C., Ouellet E., Kamaya A., Singh A. D. Liver imaging techniques: recognition of uveal melanoma metastases // *Ocular Oncology and Pathology*. — 2018. — Vol. 4. — № 4. — P. 254–260.
32. Bove R., Char D. H. Nondiagnosed uveal melanomas // *Ophthalmology*. — 2004. — Vol. 111. — № 3. — P. 554–557.
33. Bronkhorst I. H. G., Jager M. J. Uveal melanoma: the inflammatory microenvironment // *Journal of Innate Immunity*. — 2012. — Vol. 4. — № 5–6. — P. 454–462.
34. Buonanno F., Conson M., de Almeida Ribeiro C., Oliviero C., Itta F., Liuzzi R., Pacelli R., Cella L., Clemente S. Local tumor control and treatment related toxicity after plaque brachytherapy for uveal melanoma: a systematic review and a data pooled analysis // *Radiotherapy and Oncology*. — 2022. — Vol. 166. — P. 15–25.
35. Cai S., Pataillot-Meakin T., Shibakawa A., Ren R., Bevan C. L., Ladame S., Ivanov A. P., Edel J. B. Single-molecule amplification-free multiplexed detection of circulating microRNA cancer biomarkers from serum // *Nature Communications*. — 2021. — Vol. 12. — № 1. — Art. 3515.
36. Calin G. A., Dumitru C. D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce

- C. M. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2002. — Vol. 99. — № 24. — P. 15524–15529.
37. Carvajal R. D., Sacco J. J., Jager M. J., Eschelman D. J., Olofsson Bagge R., Harbour J. W., Chieng N. D., Patel S. P., Joshua A. M., Piperno-Neumann S. Advances in the clinical management of uveal melanoma // *Nature Reviews Clinical Oncology*. — 2023. — Vol. 20. — № 2. — P. 99–115.
 38. Cavallo F., De Giovanni C., Nanni P., Forni G., Lollini P.-L. 2011: the immune hallmarks of cancer // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. — 2011. — Vol. 60. — P. 319–326.
 39. Cellini F., Morganti A. G., Genovesi D., Silvestris N., Valentini V. Role of microRNA in response to ionizing radiations: evidences and potential impact on clinical practice for radiotherapy // *Molecules*. — 2014. — Vol. 19. — № 4. — P. 5379–5401.
 40. Chong Z.X., Yeap S.K., Ho W.Y. Role of miRNAs in regulating responses to radiotherapy in human breast cancer // *International Journal of Radiation Biology*. — 2021. — Vol. 97. — № 3. — P. 289–301.
 41. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Assessment of metastatic disease status at death in 435 patients with large choroidal melanoma in the Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS): COMS report no. 15 // *Archives of Ophthalmology*. — 2001. — Vol. 119. — P. 670–676.
 42. Cookson V.J., Bentley M.A., Hogan B.V., Horgan K., Hayward B.E., Hazelwood L.D., Hughes T.A. Circulating microRNA profiles reflect the presence of breast tumours but not the profiles of microRNAs within the tumours // *Cellular Oncology*. — 2012. — Vol. 35. — P. 301–308.
 43. Cristofanilli M., Budd G.T., Ellis M.J., Stopeck A., Matera J., Miller M.C., Reuben J.M., Doyle G.V., Allard W.J., Terstappen L.W.M.M., Hayes D.F. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer // *New England Journal of Medicine*. — 2004. — Vol. 351. — № 8. — P. 781–791.

44. Croci D.O., Zacarías Fluck M.F., Rico M.J., Matar P., Rabinovich G.A., Scharovsky O.G. Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. — 2007. — Vol. 56. — P. 1687–1700.
45. Damato B. Detection of uveal melanoma by optometrists in the United Kingdom // *Ophthalmic and Physiological Optics*. — 2001. — Vol. 21. — № 3. — P. 268–271.
46. Damato B. Treatment of primary intraocular melanoma // *Expert Review of Anti-cancer Therapy*. — 2006. — Vol. 6. — № 4. — P. 493–506.
47. de Lange M.J., Nell R.J., van der Velden P.A. Scientific and clinical implications of genetic and cellular heterogeneity in uveal melanoma // *Molecular Biomedicine*. — 2021. — Vol. 2. — № 1. — Art. 25.
48. Diener-West M., Reynolds S.M., Agugliaro D.J., Caldwell R., Cumming K., Earle J.D., Hawkins B.S., Hayman J.A., Jaiyesimi I., Jampol L.M., Kirkwood J.M., Koh W.J., Robertson D.M., Shaw J.M., Straatsma B.R., Thoma J. Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report No. 26 // *Archives of Ophthalmology*. — 2005. — Vol. 123. — № 12. — P. 1639–1643.
49. Dogrusöz M., Bagger M., van Duinen S.G., Kroes W.G., Ruivenkamp C.A.L., Böhringer S., Andersen K.K., Luyten G.P.M., Kiilgaard J.F., Jager M.J. The prognostic value of AJCC staging in uveal melanoma is enhanced by adding chromosome 3 and 8q status // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. — 2017. — Vol. 58. — № 2. — P. 833–842.
50. Drabarek W., van Riet J., Nguyen J. Q. N., Smit K. N., van Poppelen N. M., Jansen R., Medico-Salsench E., Vaarwater J., Magielsen F. J., Brands T., Eussen B., van den Bosch T. P. P., Verdijk R. M., Naus N. C., Paridaens D., de Klein A., Brosens E., van de Werken H. J. G., Kilic E. Identification of early-onset metastasis in SF3B1 mutated uveal melanoma // *Cancers*. — 2022. — Vol. 14. — № 3. — Art. 846.

51. Durante M.A., Rodriguez D.A., Kurtenbach S., Kuznetsov J.N., Sanchez M.I., Decatur C.L., Harbour J.W. Single-cell analysis reveals new evolutionary complexity in uveal melanoma // *Nature Communications*. — 2020. — Vol. 11. — № 1. — Art. 496.
52. Durie F.H., Campbell A.M., Lee W.R., Damato B.E. Analysis of lymphocytic infiltration in uveal melanoma // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. — 1990. — Vol. 31. — № 10. — P. 2106–2110.
53. Egan K.M., Ryan L.M., Gragoudas E.S. Survival implications of enucleation after definitive radiotherapy for choroidal melanoma: an example of regression on time-dependent co-variates // *Archives of Ophthalmology*. — 1998. — Vol. 116. — № 3. — P. 366–370.
54. Eskelin S., Pyrhönen S., Hahka-Kemppinen M., Tuomaala S., Kivelä T. A prognostic model and staging for metastatic uveal melanoma // *Cancer*. — 2003. — Vol. 97. — № 2. — P. 465–475.
55. Eskelin, S., Pyrhönen, S., Summanen, P., Hahka-Kemppinen, M., & Kivelä, T. Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: tumor progression before and after treatment // *Ophthalmology*. — 2000. — Vol. 107. — № 8. — P. 1443–1449.
56. Esplugas R., Arenas M., Serra N., Bellés M., Bonet M., Gascón M., Vallvé J.-C., Linares V. Effect of radiotherapy on the expression of cardiovascular disease-related miRNA-146a, -155, -221 and -222 in blood of women with breast cancer // *PLoS ONE*. — 2019. — Vol. 14. — № 5. — Art. e0217443.
57. Fang Z., Tang J., Bai Y., Lin H., You H., Jin H., Zhang, Z. Y. Plasma levels of microRNA-24, microRNA-320a, and microRNA-423-5p are potential biomarkers for colorectal carcinoma // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. — 2015. — Vol. 34. — Art. 86.
58. Filipów S., Łaczmański Ł. Blood circulating miRNAs as cancer biomarkers for diagnosis and surgical treatment response // *Frontiers in Genetics*. — 2019. — Vol. 10. — P. 169.

59. Freton A., Chin K.J., Raut R., Tena L.B., Kivelä T., Finger P.T. Initial PET/CT staging for choroidal melanoma: AJCC correlation and second nonocular primaries in 333 patients // *European Journal of Ophthalmology*. — 2012. — Vol. 22. — № 2. — P. 236–243.
60. Furdova A., Slezak P., Chorvath M., Waczulikova I., Sramka M., Kralik G. No differences in outcome between radical surgical treatment (enucleation) and stereotactic radiosurgery in patients with posterior uveal melanoma // *Neoplasma*. — 2010. — Vol. 57. — № 4. — P. 377–381.
61. Gasparini P., Lovat F., Fassan M., Casadei L., Cascione L., Jacob N.K., Carasi S., Palmieri D., Costinean S., Shapiro C. L., Huebner K., Croce C. M. Protective role of miR-155 in breast cancer through RAD51 targeting impairs homologous recombination after irradiation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2014. — Vol. 111. — № 12. — P. 4536–4541.
62. Gautron A., Migault M., Bachelot L., Corre S., Galibert M.D., Gilot D. Human TYRP1: Two functions for a single gene? // *Pigment Cell & Melanoma Research*. — 2021. — Vol. 34. — № 5. — P. 836–852.
63. Gencia I., Baderca F., Avram S., Gogulescu A., Marcu A., Seclaman E., Marian C., Solovan C. A preliminary study of microRNA expression in different types of primary melanoma // *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. — 2020. — Vol. 20. — № 2. — P. 197–208.
64. He M., Xu Z., Ding T., Kuang D.-M., Zheng L. MicroRNA-155 regulates inflammatory cytokine production in tumor-associated macrophages via targeting C/EBP β // *Cellular & Molecular Immunology*. — 2009. — Vol. 6. — № 5. — P. 343–352.
65. Heng J.S., Perzia B.M., Sinard J.H., Pointdujour-Lim R. Local recurrence of uveal melanoma and concomitant brain metastases associated with an activating telomerase promoter mutation seven years after secondary enucleation // *Am. J. Ophthalmol. Case Rep.* — 2022. — Vol. 27. — Art. 101607.

66. Hu J., Huang S., Liu X., Zhang Y., Wei S., Hu X. miR-155: an important role in inflammation response // *Journal of Immunology Research*. — 2022. — Vol. 2022. — Art. 7437281.
67. Huo D., Clayton W. M., Yoshimatsu T. F., Chen J., Olopade O. I. Identification of a circulating microRNA signature to distinguish recurrence in breast cancer patients // *Oncotarget*. — 2016. — Vol. 7. — № 34. — P. 55231–55244.
68. Hussen B.M., Hidayat H.J., Salihi A., Sabir D.K., Taheri M., Ghafouri-Fard S. MicroRNA: A signature for cancer progression // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. — 2021. — Vol. 138. — Art. 111528.
69. Jensen O. A. Malignant melanomas of the human uvea: recent follow-up of cases in Denmark, 1943–1952 // *Acta Ophthalmologica*. — 1970. — Vol. 48. — № 6. — P. 1113–1128.
70. Jung E. J., Santarpia L., Kim J., Esteva F. J., Moretti E., Buzdar A. U., Di Leo A., Le X.-F., Bast R. C. Jr., Park S.-T., Pusztai L., Calin G. A. Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients // *Cancer*. — 2012. — Vol. 118. — № 10. — P. 2603–2614.
71. Kaliki S., Shields C. L., Shields J. A. Uveal melanoma: estimating prognosis // *Indian Journal of Ophthalmology*. — 2015. — Vol. 63. — № 2. — P. 93–102.
72. Karami Fath M., Azami J., Masoudi A., Mosaddeghi Heris R., Rahmani E., Alavi F., Tarhriz, V. Exosome-based strategies for diagnosis and therapy of glioma cancer // *Cancer Cell International*. — 2022. — Vol. 22. — № 1. — Art. 262.
73. Kariuki D., Asam K., Aouizerat B.E., Lewis K.A., Florez J.C., Flowers E. Review of databases for experimentally validated human microRNA–mRNA interactions // *Database*. — 2023. — Vol. 2023. — Art. baad014.
74. Kędzierska M., Bańkosz M. Role of proteins in oncology: advances in cancer diagnosis, prognosis, and targeted therapy—A narrative review // *Journal of Clinical Medicine*. — 2024. — Vol. 13. — № 23. — Art. 7131.
75. Ko M.A., Zehong G., Virtanen C., Guindi M., Waddell T.K., Keshavjee S., Darling G. E. MicroRNA expression profiling of esophageal cancer before and after

- induction chemoradiotherapy // *The Annals of Thoracic Surgery*. — 2012. — Vol. 94. — № 4. — P. 1094–1103.
76. Kong W., He L., Richards E.J., Challa S., Xu C.X., Permuth-Wey J., Lancaster J. M., Coppola D., Sellers T. A., Djeu J. Y., Cheng J. Q. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer // *Oncogene*. — 2014. — Vol. 33. — № 6. — P. 679–689.
 77. Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function // *Nucleic Acids Research*. — 2019. — Vol. 47. — № D1. — P. D155–D162.
 78. Krishna Y., McCarthy C., Kalirai H., Coupland S.E. Inflammatory cell infiltrates in advanced metastatic uveal melanoma // *Human Pathology*. — 2017. — Vol. 66. — P. 159-166.
 79. Kujala E., Kivelä T. Tumor, node, metastasis classification of malignant ciliary body and choroidal melanoma evaluation of the 6th edition and future directions // *Ophthalmology*. — 2005. — Vol. 112. — P. 1135–1144.
 80. Kwon H. J., Ko J. S., Kim M., Lee C. S., Lee S. C. Prognosis of choroidal melanoma and the result of ruthenium brachytherapy combined with transpupillary thermotherapy in Korean patients // *British Journal of Ophthalmology*. — 2013. — Vol. 97. — № 5. — P. 653–658.
 81. Lagouros E., Salomao D., Thorland E., Hodge D.O., Vile R., Pulido J.S. Infiltrative T regulatory cells in enucleated uveal melanomas // *Transactions of the American Ophthalmological Society*. — 2009. — Vol. 107. — P. 223.
 82. Lane A. M., Kim I. K., Gragoudas E. S. Survival rates in patients after treatment for metastasis from uveal melanoma // *JAMA Ophthalmology*. — 2018. — Vol. 136. — № 9. — P. 981–986.
 83. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The C-elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 // *Cell*. — 1993. — Vol. 75. — № 5. — P. 843–854.

84. Leidinger P., Galata V., Backes C., Stähler C., Rheinheimer S., Huwer H., Messee E., Keller A. Longitudinal study on circulating miRNAs in patients after lung cancer resection // *Oncotarget*. — 2015. — Vol. 6. — № 18. — P. 16674–16691.
85. Leidinger P., Keller A., Backes C., Huwer H., Meese E. MicroRNA expression changes after lung cancer resection: a follow-up study // *RNA Biology*. — 2012. — Vol. 9. — № 6. — P. 900–910.
86. Li W., Wang Y., Zhang Q., Tang L., Liu X., Dai Y., Yuan K. MicroRNA-486 as a biomarker for early diagnosis and recurrence of non-small cell lung cancer // *PLoS ONE*. — 2015. — Vol. 10. — № 8. — Art. e0134220.
87. Lorenzo D., Piulats J.M., Ochoa M., Arias L., Gutiérrez C., Català J., Caminal J. Clinical predictors of survival in metastatic uveal melanoma // *Japanese Journal of Ophthalmology*. — 2019. — Vol. 63. — P. 197–209.
88. Luo J.T., Yang Y.H., Liu Y.M., Li Y., Wei W.B. Clinical characteristics and prognostic factors of 1 166 patients with uveal melanoma // *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. — 2022. — Vol. 58. — № 7. — P. 529–534.
89. Madhavan D., Peng C., Wallwiener M., Zucknick M., Nees J., Schott S., Rudolph A., Riethdorf S., Trumpp A., Pantel K., Sohn C., Chang-Claude J., Schneeweiss A., Burwinkel B. Circulating miRNAs with prognostic value in metastatic breast cancer and for early detection of metastasis // *Carcinogenesis*. — 2016. — Vol. 37. — № 5. — P. 461–470.
90. Mäkitie T., Summanen P., Tarkkanen A., Kivelä T. Tumor-infiltrating macrophages (CD68+ cells) and prognosis in malignant uveal melanoma // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. — 2001. — Vol. 42. — № 7. — P. 1414–1421.
91. Markiewicz A., Skórkiewicz K., Bogdał A., Medoń D., Świder M., Korab-Chrzanowska E., Kowal J., Dębicka-Kumela M., Romanowska-Dixon B. Ophthalmic applicator displacement as a method of treating large diffuse uveal melanomas // *Journal of Contemporary Brachytherapy*. — 2023. — Vol. 15. — № 3. — P. 184–190.

92. Marshall E., Romaniuk C., Ghaneh P., Wong H., McKay M., Chopra M., Coupland S.E., Damato B.E. MRI in the detection of hepatic metastases from high-risk uveal melanoma: a prospective study in 188 patients // *British Journal of Ophthalmology*. — 2013. — Vol. 97. — № 2. — P. 159-163.
93. McLean I.W., Foster W.D., Zimmerman L.E., Gamel J.W. Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology // *American Journal of Ophthalmology*. — 1983. — Vol. 96. — № 4. — P. 502–509.
94. McLean I.W., Saraiva V.S., Burnier M.N. Jr. Pathological and prognostic features of uveal melanomas // *Canadian Journal of Ophthalmology*. — 2004. — Vol. 39. — № 4. — P. 343–350.
95. Menicacci C., Al-Jamal R.T., De Francesco S., Barchitta M., Girolamo M., Di Maggio A., Hadjistilianou T. Very late orbital recurrence of choroidal melanoma four decades post enucleation // *European Journal of Ophthalmology*. — 2022. — Vol. 32. — № 4. — P. NP88–NP93.
96. Miller M.C., Doyle G.V., Terstappen L.W.M.M. Significance of circulating tumor cells detected by the CellSearch system in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer // *Journal of Oncology*. — 2010. — Vol. 2010. — Art. 617421.
97. Mitchell P. S., Parkin R. K., Kroh E. M., Fritz B. R., Wyman S. K., Pogosova-Agadjanyan E. L., Peterson A., Noteboom J., O'Briant K. C., Allen A., Lin D. W., Urban N., Drescher C. W., Knudsen B. S., Stirewalt D. L., Gentleman R., Vessella R. L., Nelson P. S., Martin D. B., Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2008. — Vol. 105. — № 30. — P. 10513–10518.
98. Moertl S., Mutschelknaus L., Heider T., Atkinson M.J. MicroRNAs as novel elements in personalized radiotherapy // *Translational Cancer Research*. — 2016. — Vol. 5, Suppl. 6.

99. Monnot G.C., Martinez-Usatorre A., Lanitis E., Lopes S.F., Cheng W.C., Ho P.C., Romero P. miR-155 overexpression in OT-1 CD8+ T cells improves anti-tumor activity against low-affinity tumor antigen // *Molecular Therapy - Oncolytics*. — 2020. — Vol. 16. — P. 111–123.
100. Mougiakakos D., Johansson C.C., Trocme E., All-Ericsson C., Economou M.A., Larsson O., Seregard S., Kiessling R. Intratumoral forkhead box P3-positive regulatory T cells predict poor survival in cyclooxygenase-2-positive uveal melanoma // *Cancer*. — 2010. — Vol. 116. — № 9. — P. 2224–2233.
101. Narasimhaiah D., Legrand C., Damotte D., Remark R., Munda M., De Potter P., Coulie P.G., Vikkula M., Godfraind C. DNA alteration-based classification of uveal melanoma gives better prognostic stratification than immune infiltration, which has a neutral effect in high-risk group // *Cancer Medicine*. — 2019. — Vol. 8. — № 6. — P. 3036–3046.
102. Neophytou C. M., Kyriakou T. C., Papageorgis P. Mechanisms of metastatic tumor dormancy and implications for cancer therapy // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019. — Vol. 20. — № 24. — Art. 6158.
103. Ohuchida K., Mizumoto K., Kayashima T., Fujita H., Moriyama T., Ohtsuka T. , Ueda J., Nagai E., Hashizume M., Tanaka M. MicroRNA expression as a predictive marker for gemcitabine response after surgical resection of pancreatic cancer // *Annals of Surgical Oncology*. — 2011. — Vol. 18. — № 8. — P. 2381–2387.
104. Park S.Y., Nam J.S. The force awakens: metastatic dormant cancer cells // *Experimental & Molecular Medicine*. — 2020. — Vol. 52. — № 4. — P. 569–581.
105. Peng J., Liu H., Liu C. MiR-155 promotes uveal melanoma cell proliferation and invasion by regulating NDFIP1 expression // *Technology in Cancer Research & Treatment*. — 2017. — Vol. 16. — № 6. — P. 1160–1167.
106. Peng Y., Croce C.M. The role of MicroRNAs in human cancer // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. — 2016. — Vol. 1. — Art. 15004.
107. Perri P., Fiorica F., D'Angelo S. , Lamberti G., Parmeggiani F., Martini A., Carpentieri F., Colosimo C., Micucci M., Perazzini L., De Gugliemo E., Berretta M.,

- Sebastiani A., Cartei F. Ruthenium-106 eye plaque brachytherapy in the conservative treatment of uveal melanoma: a mono-institutional experience // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. — 2012. — Vol. 16. — № 14. — P. 1919–1924.
108. Petrović N., Stanojković T.P., Nikitović M. MicroRNAs in prostate cancer following radiotherapy: Towards predicting response to radiation treatment // *Current Medicinal Chemistry*. — 2022. — Vol. 29. — № 9. — P. 1543-1560.
 109. Piao Y., Jung S.-N., Lim M. A., Oh C., Jin Y. L., Kim H. J., Nguyen Q. K., Chang J. W., Won H.-R., Koo B. S. A circulating microRNA panel as a novel dynamic monitor for oral squamous cell carcinoma // *Scientific Reports*. — 2023. — Vol. 13. — № 1. — Art. 2000.
 110. Rantala E.S., Hernberg M.M., Piperno-Neumann S., Grossniklaus H.E., Kivelä T.T. Metastatic uveal melanoma: The final frontier // *Progress in Retinal and Eye Research*. — 2022. — Vol. 90. — Art. 101041.
 111. Reichstein D., Karan K. Plaque brachytherapy for posterior uveal melanoma in 2018: improved techniques and expanded indications // *Current Opinion in Ophthalmology*. — 2018. — Vol. 29. — № 3. — P. 191–198.
 112. Rodriguez-Vidal, C., Fernandez-Diaz, D., Fernandez-Marta, B., Lago-Baameiro, N., Pardo, M., Silva, P., Paniagua, L., Blanco-Teijeiro, M.J., Piñeiro, A., Bande, M. Treatment of metastatic uveal melanoma: systematic review // *Cancers*. — 2020. — Vol. 12. — № 9. — P. 2557.
 113. Rosignolo F., Sponziello M., Giacomelli L., Russo D., Pecce V., Biffoni M., Bel-lantone R., Lombardi C. P., Lamartina L., Grani G., Durante C., Filetti S., Verrienti A. Identification of thyroid-associated serum microRNA profiles and their potential use in thyroid cancer follow-up // *Journal of the Endocrine Society*. — 2017. — Vol. 1. — № 1. — P. 3–13.
 114. Rossi E., Croce M., Reggiani F., Schinzari G., Ambrosio M., Gangemi R., Tortora G., Pfeffer U., Amaro A. Uveal Melanoma Metastasis // *Cancers*. — 2021. — Vol. 13. — № 22. — Art. 5684.

115. Russo A., Caltabiano R., Longo A., Avitabile T., Franco L.M., Bonfiglio V., Puzzo L., Reibaldi M. Increased levels of miRNA-146a in serum and histologic samples of patients with uveal melanoma // *Frontiers in Pharmacology*. – 2016. – Vol. 7. – Art. 424.
116. Scannell O., O'Neill V., Dunne M., Baily C., Salih A., Cunningham M., Horgan N. Quality of life in uveal melanoma patients in Ireland: a single-centre survey // *Ocular Oncology and Pathology*. — 2020. — Vol. 6. — № 2. — P. 99–106.
117. Semenova E., Finger P.T. Palladium-103 radiation therapy for small choroidal melanoma // *Ophthalmology*. — 2013. — Vol. 120. — № 11. — P. 2353–2357.
118. Servois V., Mariani P., Malhaire C., Petras S., Piperno-Neumann S., Plancher C., Levy-Gabriel C., Lumbroso-Le Rouic L., Desjardins L., Salmon R.J. Preoperative staging of liver metastases from uveal melanoma by magnetic resonance imaging (MRI) and fluorodeoxyglucose-positron emission tomography (FDG-PET) // *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. — 2010. — Vol. 36. — № 2. — P. 189-194.
119. Shain A.H., Bagger M.M., Yu R., Chang D., Liu S., Vemula S., Weier J.F., Wadt K., Heegaard S., Bastian B.C., Kiilgaard J.F. The genetic evolution of metastatic uveal melanoma // *Nature Genetics*. - 2019. - Vol. 51. – № 7. - P. 1123-1130.
120. Shenouda S.K., Alahari S.K. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? // *Cancer and Metastasis Reviews*. – 2009. – Vol. 28. – P. 369–378.
121. Shields C. L., Kaliki S., Furuta M., Fulco E., Alarcon C., Shields J. A. American Joint Committee on Cancer classification of posterior uveal melanoma (tumor size category) predicts prognosis in 7731 patients // *Ophthalmology*. – 2013. – Vol. 120. – № 10. – P. 2066–2071.
122. Shields C.L., Furuta M., Thangappan A., Nagori S., Mashayekhi A., Lally D.R., Kelly C.C., Rudich D.S., Nagori A.V., Wakade O.A., Mehta S., Forte L., Long A., Dellacava E.F., Kaplan B., Shields J.A. Metastasis of uveal melanoma millimeter-by-millimeter in 8033 consecutive eyes // *Archives of Ophthalmology*. — 2009. — Vol. 127. – № 8. — P. 989-998.

123. Simpson E.R., Gallie B.L., Saakyan S., Amiryan A., Finger P.T., Chin K.J., Seregard S., Fili M., Wilson M., Haik B., Caminal J.M., Catala J., Pelayes D.E., Folgar M.A., Jager M.J., Dogrusöz M., Singh A., Schachat A., Suzuki S., Aihara Y. International Validation of the American Joint Committee on Cancer's 7th Edition Classification of Uveal Melanoma // *JAMA Ophthalmology*. — 2015. — Vol. 133. — № 4. — P. 376-383.
124. Singh A. D. Uveal melanoma: implications of tumor doubling time // *Ophthalmology*. — 2001. — Vol. 108. — № 5. — P. 829-830.
125. Singh A.D., Binkley E.M., Wrenn J.M., Bena J.F., Hinz C., Boldt H.C. Predicted vs observed metastasis-free survival in individuals with uveal melanoma // *JAMA Ophthalmology*. — 2022. — Vol. 140. — № 9. — P. 847–854.
126. Singh A.D., Medina C.A., Singh N., Aronow M.E., Biscotti C.V., Triozzi P.L. Fine-needle aspiration biopsy of uveal melanoma: outcomes and complications // *British Journal of Ophthalmology*. — 2016. — Vol. 100. — № 4. — P. 456–462.
127. Singh A.D., Topham A. Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973–1997 // *Ophthalmology*. — 2003. — Vol. 110, № 5. — P. 956–961.
128. Singh N., Seregard S., Singh A.D. Uveal melanoma: Epidemiologic aspects // *Clinical Ophthalmic Oncology: Uveal Tumors* / ed. by B. E. Damato, A. D. Singh. — 3rd ed. — Cham: Springer, 2019. — P. 53–69.
129. Singh P., Singh A. Choroidal melanoma // *Oman Journal of Ophthalmology*. — 2012. — Vol. 5. — № 1. — P. 3–9.
130. Smit K. N., Jager M. J., de Klein A., Kiliç E. Uveal melanoma: Towards a molecular understanding // *Progress in Retinal and Eye Research*. — 2020. — Vol. 75. — P. 100800.
131. Sochor M., Basova P., Pesta M., Dusilkova N., Bartos J., Burda P., Pospisil V., Stopka T. Oncogenic microRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum // *BMC Cancer*. — 2014. — Vol. 14. — Art. 448.

132. Stark M.S., Gray E.S., Isaacs T., Chen F.K., Millward M., McEvoy A., Zaenker P., Ziman M., Soyer H.P., Glasson W.J., Warrier S.K., Stark A.L., Rolfe O.J., Palmer J.M., Hayward N.K. A panel of circulating microRNAs detects uveal melanoma with high precision // *Translational Vision Science & Technology*. – 2019. – Vol. 8. – № 6. — Art. 12.
133. Sun Y., Wang M., Lin G., Sun S., Li X., Qi J., Li J. Serum MicroRNA-155 as a Potential Biomarker to Track Disease in Breast Cancer // *PLOS ONE*. - 2012. - Vol. 7. – № 10. — Art. e47003.
134. Thomsen C.B., Andersen R.F., Jensen L.H., Jakobsen A., Hansen T.F. The Clinical Impact of MicroRNA-21 in Low Rectal Cancer Treated with High-Dose Chemoradiotherapy in the Organ Preserving Setting // *Gastrointestinal Disorders*. — 2020. — Vol. 2. – № 4. — P. 378-384.
135. Tili E., Croce C.M., Michaille J.J. miR-155: On the Crosstalk Between Inflammation and Cancer // *International Reviews of Immunology*. — 2009. — Vol. 28. – № 5. — P. 264–284.
136. Tomimaru Y., Eguchi H., Nagano H., Wada H., Kobayashi S., Marubashi S., Tanemura M., Tomokuni A., Takemasa I., Umeshita K., Kanto T., Doki Y., Mori M. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma // *Journal of Hepatology*. - 2012. - Vol. 56. – № 1. - P. 167–175.
137. Triozzi P.L., Achberger S., Aldrich W., Crabb J.W., Saunthararajah Y., Singh A.D. Association of tumor and plasma microRNA expression with tumor monosomy-3 in patients with uveal melanoma // *Clinical Epigenetics*. – 2016. – Vol. 8. – № 1. – Art. 80.
138. Triozzi P.L., Achberger S., Aldrich W., Singh A.D., Grane R., Borden E.C. The association of blood angioregulatory microRNA levels with circulating endothelial cells and angiogenic proteins in patients receiving dacarbazine and interferon // *Journal of Translational Medicine*. — 2012. — Vol. 10. — P. 1-7.
139. Uzuner E., Ulu G.T., Gürler S.B., Baran Y. The role of MiRNA in cancer: pathogenesis, diagnosis, and treatment // *miRNomics: MicroRNA Biology and*

- Computational Analysis / Ed. by M. Yousef, J. Allmer. — New York: Humana Press, 2022. — P. 375–422.
140. Van Roosbroeck K., Fanini F., Setoyama T., Ivan C., Rodriguez-Aguayo C., Fuentes-Mattei E., Xiao L., Vannini I., Redis R. S., D'Abundo L., Zhang X., Nicoloso M. S., Rossi S., Gonzalez-Villasana V., Rupaimoole R., Ferracin M., Morabito F., Neri A., Ruvolo P. P., Ruvolo V. R., Pecot C. V., Amadori D., Abruzzo L., Calin S., Wang X., You M. J., Ferrajoli A., Orlowski R., Plunkett W., Lichtenberg T. M., Davuluri R. V., Berindan-Neagoe I., Negrini M., Wistuba I. I., Kantarjian H. M., Sood A. K., Lopez-Berestein G., Keating M. J., Fabbri M., Calin G. A. Combining Anti-Mir-155 with Chemotherapy for the Treatment of Lung Cancers // *Clinical Cancer Research*. — 2017. — Vol. 23. — № 11. — P. 2891–2904.
 141. Virgili G., Gatta G., Ciccolallo L., Capocaccia R., Biggeri A., Crocetti E., Lutz J.-M., Paci E. Incidence of uveal melanoma in Europe // *Ophthalmology*. — 2007. — Vol. 114. — № 12. — P. 2309–2315.
 142. Wang H., Tan Z., Hu H., Liu H., Wu T., Zheng C., Tu, J. microRNA-21 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting LZTFL1 // *BMC Cancer*. — 2019. — Vol. 19. — P. 1–13.
 143. Wang R., Tahiri H., Yang C., Landreville S., Callejo S., Hardy P. MiR-181a-5p inhibits uveal melanoma development by targeting GNAQ and AKT3 // *American Journal of Cancer Research*. — 2023. — Vol. 13. — № 1. — P. 293.
 144. Wang Y., Yin W., Lin Y., Yin K., Zhou L., Du Y., Yan T., Lu J. Downregulated circulating microRNAs after surgery: potential noninvasive biomarkers for diagnosis and prognosis of early breast cancer // *Cell Death Discovery*. — 2018. — Vol. 4. — № 1. — P. 87.
 145. Williams S.C.P. Circulating tumor cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2013. — Vol. 110. — № 13. — P. 4861.

146. Worley L.A., Long M.D., Onken M.D., Harbour J.W. Micro-RNAs associated with metastasis in uveal melanoma identified by multiplexed microarray profiling // *Melanoma Research*. — 2008. — Vol. 18. — № 3. — P. 184-190.
147. Wróblewska J.P., Lach M.S., Ustaszewski A., Kulcenty K., Ibbs M., Jagiełło I., Suchorska W.M., Marszałek A. The potential role of selected miRNA in uveal melanoma primary tumors as early biomarkers of disease progression // *Genes*. — 2020. — Vol. 11. — № 3. — P. 271.
148. Xu L.T., Funchain P., Tarhini A.A., Singh A.D. Uveal melanoma: metastases // *Clinical Ophthalmic Oncology: Uveal Tumors* / ed. by B. E. Damato, A. D. Singh. — 3rd ed. — Cham: Springer, 2019. — P. 317–329.
149. Yan D., Shen H., Chen X., Yao S., Wang J., Hu D.N. MicroRNA-199a* inhibits uveal melanoma cell proliferation by targeting c-Met // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. — 2011. — Vol. 52. — № 14. — P. 1445–1445.
150. Yang C., Wang R., Hardy P. Potential of miRNA-based nanotherapeutics for uveal melanoma // *Cancers*. — 2021. — Vol. 13. — № 20. — P. 5192.
151. Yang C., Wang Y., Hardy P. Emerging roles of microRNAs and their implications in uveal melanoma // *Cellular and Molecular Life Sciences*. — 2021. — Vol. 78. — № 2. — P. 545–559.
152. Yeşiltaş Y. S., Zabor E. C., Wrenn J., Oakey Z., Singh A. D. Surveillance for metastasis in high-risk uveal melanoma patients: standard versus enhanced protocols // *Cancers*. — 2023. — Vol. 15. — № 20. — P. 5025.
153. Yin R., Guo L., Zhang W., Zheng J. The pleiotropic effects of miRNAs on tumor angiogenesis // *Journal of Cellular Biochemistry*. — 2015. — Vol. 116. — № 9. — P. 1807–1815.
154. Zedan A.H., Hansen T.F., Assenholt J., Madsen J.S., Osther P.J.S. Circulating miRNAs in localized/locally advanced prostate cancer patients after radical prostatectomy and radiotherapy // *The Prostate*. — 2019. — Vol. 79. — № 4. — P. 425–432.

155. Zhang J., Cheng C., Yuan X., He J.T., Pan Q.H., Sun F.Y. microRNA-155 acts as an oncogene by targeting the tumor protein 53-induced nuclear protein 1 in esophageal squamous cell carcinoma // International Journal of Clinical and Experimental Pathology. — 2014. — Vol. 7. — № 2. — P. 602–610.
156. Zimmerman L.E., Mclean I.W. An evaluation of enucleation in the management of uveal melanomas // American Journal of Ophthalmology. — 1979. — Vol. 87. — №6. — P. 741–760.