

DOI: <https://doi.org/10.25276/2410-1257-2021-1-13-16>

МикроРНК-146а – предиктор развития метастазов меланомы хориоидеи

А.Ф. Бровкина^{1, 2}, Н.Д. Цыбикова^{1, 2}¹ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» МЗ РФ, Москва² ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы «Московский офтальмологический центр», Москва

РЕФЕРАТ

МикроРНК (miRNA, miR) регулируют экспрессию генов, принимают участие в регуляции жизни клеток, пролиферации и апоптозе. Публикаций по изучению микроРНК в плазме больных меланомой хориоидеи (МХ) недостаточно, представленные данные противоречивы. Отмечено повышение уровня экспрессии микроРНК-146а в плазме крови у больных раком легкого, пищевода, молочной железы. В настоящем исследовании использована микроРНК-146а в плазме крови больных МХ.

Цель. Определить возможность и достоверность выявления микроРНК-146а в плазме крови больных МХ с учетом локализации опухоли и ее размеров.

Материал и методы. Исследована плазма крови 84 больных, средний возраст которых 63,4±1,2 лет. Группа контроля – 28 человек,

не имеющих опухолевых или хронических аутоиммунных заболеваний, средний возраст – 63,25±1,43 лет. Уровень экспрессии микроРНК-146а определяли методом количественной ПЦР.

Результаты. Показано повышение уровня экспрессии микроРНК-146а, коррелирующее с локализацией и толщиной опухоли. Результаты подтверждены статистическим анализом.

Заключение. МикроРНК-146а, уровень которой увеличивается в плазме крови больных МХ по мере увеличения ее размеров, может быть использована как биомаркер агрессивного течения опухоли в плане гематогенного метастазирования.

Ключевые слова: меланома хориоидеи, микроРНК-146а, биомаркер. ■

Точка зрения. Восток – Запад. 2021;1:13–16.

ABSTRACT

MicroRNA-146a – the predictor of the development of metastases of choroidal melanoma

A.F. Brovkina^{1, 2}, N.D. Tsybikova^{1, 2}¹ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow² Botkin Hospital, Moscow

MicroRNAs (miRNA, miR) – regulate gene expression, take part in the regulation of cell life, proliferation and apoptosis. There are not enough publications on the study of microRNA in the plasma of patients with choroidal melanoma (CM) and the presented data are contradictory. An increase in the level of microRNA-146a in blood plasma was noted in patients with cancer of the lung, esophagus and breast. In the present study, we used microRNA-146a in the blood plasma of patients with CM.

Purpose. To determine the possibility and reliability of detecting microRNA-146a in the blood plasma of patients with CM, taking into account the localization of the tumor and its size.

Material and methods. The blood plasma of 84 patients was studied mean age 63.4±1.2 years. A control group of 28 people who did not have tumor or chronic autoimmune diseases mean age 63.25±1.43 years. The expression level of miRNA-146a was determined by quantitative PCR.

Results. An increase in the level of microRNA-146a was shown, which correlates with the localization and thickness of the tumor. The results were confirmed by statistical analysis.

Conclusion. MicroRNA-146a, which increases in plasma levels in patients with CM as its size increases, can be used as a biomarker of aggressive tumor course in terms of hematogenous metastasis.

Key words: choroidal melanoma, microRNA-146a, biomarkers. ■

Point of View. East – West. 2021;1:13–16.

Малые микроРНК (нити РНК из 17–22 нуклеотидов) способны регулировать до 60% всех генов, кодирующих белок, а

один определенный ген может регулироваться до 400 различными микроРНК (короткоживущие реплики генетической информации) [1]. Они

задействованы в сложных механизмах контроля и патогенеза различных заболеваний [2]. Исследования последних лет показали, что ми-

Таблица 1

**МикроРНК, выделенные из ткани увеальной меланомы
(данные литературы)**

Роль микроРНК – онкогенез	Роль микроРНК – супрессия
miR-21	miR-23a
miR-92a-3p	miR-34a
miR-222	miR-137
miR-367	miR-142-3p
miR-454	miRNA-145
miR-652	miRNA-205
miR-181	MicroRNA-124a
miR-20a	miR-224-5p

кроРНК отвечают за инициацию и прогрессирование увеальной меланомы (УМ), играя роль онкогена или ее супрессора [3-7]. Выделенные микроРНК из ткани УМ после энуклеации представлены в *таблице 1*.

В 2008 г. появилось сообщение о возможности использования микроРНК как биомаркера риска метастазирования УМ [8]. Позднее были выделены 11 микроРНК из метастазов УМ [9]. Как оказалось, микроРНК могут быть обнаружены не только в ткани опухоли, но и во многих, легко доступных жидкостях, где они достаточно стабильны, так как имеют период полураспада до 24 часов [10, 11].

Это позволяет рассматривать микроРНК в качестве потенциальных биомаркеров многих заболеваний, в том числе и онкологических [12]. К примеру, недавно показана роль микроРНК-146а в качестве предиктора рака пищевода [13]. Публикации, посвященные изучению микроРНК в плазме крови больных меланомой хориоидеи (МХ), единичны. Важно отметить, что по некоторым микроРНК в публикациях представлены противоречивые результаты. Полагают, что причины подобных расхождений можно объяснить различием образцов опухоли по качеству, отсутствием единой классификации, разными способами обработки образцов опухоли, предшествующим цитотоксическим лечением меланомы, неоднородностью опухоли и недооценкой таких воздействий, как гипоксия, инфекции [14].

ЦЕЛЬ

Определить возможность и достоверность выявления микроРНК-146а в плазме крови больных МХ с учетом локализации опухоли и ее размеров.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали плазму крови 84 больных МХ в возрасте 35–86 лет, в среднем $63,4 \pm 1,2$. Диагноз МХ базировался на результатах офтальмологического обследования, оптической когерентной томографии (ОКТ) и ультразвукового (УЗ) сканирования. С целью исключения гематогенных метастазов все больные прошли обследование органов грудной клетки и брюшной полости методом компьютерной или магнитно-резонансной томографии. С учетом биометрических показателей выявленные МХ были разделены на 3 группы: начальные, средние и большие опухоли.

Материалом для исследования уровня экспрессии микроРНК-146а служила плазма венозной крови, полученная от пациентов МХ. В качестве контроля была использована кровь 28 волонтеров в возрасте 45–78 лет ($63,25 \pm 1,43$), не имеющих опухолевых или хронических аутоиммунных заболеваний.

Плазму крови получали путем центрифугирования в течение 10 минут при ускорении 2000 оборо-

тов в минуту, после чего ее отделяли от клеточного осадка и перенесли в стерильные пробирки объемом 2 мл. Выделение суммарной РНК, включая микроРНК, проводили с использованием реагента Qiazol и набора miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Хильден, Германия). Концентрацию и чистоту полученной РНК оценивали на спектрофотометре для микрообъемов NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Нью-Йорк, США). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MiScript II RT Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендованным протоколом. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени проводилась на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Беркулес, США). Экспрессия микроРНК была нормализована относительно экзогенного контроля cel-miR-39-3p и выражалась в относительных единицах равных $2^{-\Delta Ct}$, где ΔCt – рабочие значения изменения цикла получения продукта относительно внутреннего контроля экспрессии микроРНК cel-miR-39-3p.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью стандартных методов статистической обработки, использовали программное обеспечение Microsoft Office Excel и пакет прикладных программ «Statistica» v.13.0, StatSoft Inc (США). Критический уровень значимости принимали равным 5%, нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе был проверен уровень микроРНК-146а в целом – у всех 84 больных МХ, при среднем значении проминенции МХ $7,21 \pm 0,43$ мм. Полученные данные свидетельствуют о том, что средний показатель уровня экспрессии микроРНК-146а в плазме крови оказался выше показателя контрольной группы на 69% ($p=0,002$).

На втором этапе исследования с учетом локализации опухоли все больные были разделены на 2 группы: преэквадориальная локализация МХ (26 человек) и постэквадориальная (58 человек). При статистически достоверных показателях (соответственно, $p=0,001$ и

Таблица 2

Уровень микроРНК-146а в плазме крови с учетом толщины МХ					
Проминенция МХ (средние показатели) мм	n	Уровень экспрессии микроРНК-146а	Контроль	Сдвиг	Процент увеличения экспрессии
5,03 – 6,92 (6,02±0,17)	16	0,021±0,005	0,013±0,005	+1,61 p=0,017	>61%
7,07 – 10 (8,5±0,25)	17	0,024±0,008	0,013±0,005	+1,85 p=0,015	>84%
10,41 – 17,19 (12,5±0,4)	22	0,030±0,005	0,013±0,005	+2,31 p=0,001	>130%

p=0,010) в группе с преэкваatorialной локализацией МХ увеличение уровня экспрессии микроРНК-146а составило 130% по отношению к контролю, а в группе с постэкваatorialным расположением – 46%. Другими словами, уровень экспрессии микроРНК-146а при расположении МХ до экватора оказался в 2,8 раза выше, чем в группе с постэкваatorialной локализацией.

Известно, что преэкваatorialная локализация МХ – предиктор плохого витального прогноза. В 2016 году появилась работа о роли микроРНК в прогрессировании МХ при увеличении диаметра опухоли [15]. Действительно, многолетний клинический опыт показывает, что как диаметр, так и проминенция МХ усиливают ее агрессивное течение [16, 17].

В связи с этим, на третьем этапе исследования все МХ с учетом их проминенции были подразделены на 3 группы: начальные (h 0,77–2,8 мм), средние (h 3,11–4,99 мм) и большие (h 5,03–17,19 мм). При сравнении с контролем уровень экспрессии микроРНК-146а в группе больных с начальной МХ (n=16) оказался увеличенным всего на 7%, в то время как при средних МХ (n=13) этот показатель достиг 46%, а при больших МХ (n=55) – 92% (достоверность, соответственно, p=0,805; p=0,006; p=0,001). Таким образом, только в группе начальных МХ (h 0,77 – 2,8 мм) показатель увеличения уровня экспрессии микроРНК-146а оказался недостоверным.

С целью подтверждения увеличения уровня экспрессии микроРНК-146а в плазме крови больных МХ по мере увеличения проминен-

ции опухоли группу больших МХ разделили с учетом ее толщины на три подгруппы (табл. 2).

Как следует из таблицы 2, увеличение проминенции опухоли почти на каждые 2 мм приводит к увеличению уровня экспрессии микроРНК-146а практически в 2 раза (61% и 130%), и особенно активизируется микроРНК-146а при проминенции МХ более 10 мм (130%). Полученные результаты роста уровня экспрессии микроРНК-146а на фоне увеличения проминенции МХ дают основание полагать, что эта корреляция – свидетельство возможного метастазирования, не исключено, что на стадии субклинического развития. Подтверждением этому являются имеющиеся публикации [8, 9, 15, 18, 19] и многолетние клинические наблюдения. Так, было доказано, что увеличение проминенции МХ на каждый 1 мм увеличивает риск метастазирования ее на 5% [20]. В то же время известно, что пятилетняя выживаемость больных при меланоме I стадии (начальные МХ) снижается с 96% до 26% при меланоме III стадии (большие МХ) [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доказано увеличение уровня экспрессии микроРНК-146а у больных МХ. В меньшей степени это выражено в группе пациентов с МХ, имеющих проминенцию до 3 мм, более демонстративно – при опухолях толщиной от 7 мм и выше. Есть основание полагать, что дальнейшее накопление опыта, как по использованию микроРНК-146а, так и других микроРНК, принимающих участие в

онкогенезе, на первом этапе позволит более четко определить показателя к локальному лечению хориоидальных меланом.

ЛИТЕРАТУРА

- Vienberg S., Geiger J., Madsen S., Dalgaard L.T. MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiol. (Oxf)*. 2017; 219(2): 346-361. doi:10.1111/apha.12681
- Friedman R.C., Farh K.K., Burge C.B., Bartel D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19: 92–105. doi:10.1101/gr.082701.108
- Yan D., Zhou X., Chen X. et al. MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2009; 50: 1559–1565. doi: 10.1167/iovs.08-2681
- Zhou J., Jiang J., Wang S., Xia X. Oncogenic role of microRNA20a in human uveal melanoma. *Mol. Med. Rep*. 2016; 14:1560–1566. doi: 10.3892/mmr.2016.5433
- Peng J., Liu H., Liu C. MiR-155 Promotes Uveal Melanoma Cell Proliferation and Invasion by Regulating NDFIP1 Expression. *Technol. Cancer Res. Treat*. 2017;16:1160–1167. doi:10.1177/1533034617737923
- Amaro A., Croce M., Ferrini S. et al. Potential Onco-Suppressive Role of miR122 and miR144 in Uveal Melanoma through ADAM10 and C-Met Inhibition. *Cancers(Basel)*. 2020; 12: 1468(1-16). doi:10.3390/cancers12061468
- Hou Q., Han S., Yang L. et al. The Interplay of MicroRNA-34a, LGR4, EMT-Associated Factors, and MMP2 in Regulating Uveal Melanoma Cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2019; 60:4503–4510. doi: 10.1167/iovs.18-26477
- 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 Res*. 2008; 18: 184–190. doi: 0.1097/CMR.0b013e3282feac6
- Radhakrishnan A., Badhrinarayanan N., Biswas J., Krishnakumar S. Analysis of chromosomal aberration (1, 3, and 8) and

association of microRNAs in uveal melanoma. *Mol. Vis.* 2009;15:2146–2154.

10. Gilad S., Meiri E., Yogev Y. et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE.* 2008; 3(9):e3148(1-7). doi: 10.1371/journal.pone.0003148

11. Kosaka N., Iguchi H., Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* 2010; 101(10):2087–2092. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x

12. Bande M.F., Santiago M., Mera P. et al. ME20-S as a Potential Biomarker for the Evaluation of Uveal Melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2015; 56(12): 7007–7011. doi: 10.1167/iovs.15-17183

13. Nariman-Saleh-Fam Z., Mansoori Y., Saadatian Z. et al. Dysregulated Expression of miR-146a and Its Associated Immune Effectors in Peripheral Blood Mononuclear

Cells of Esophageal Carcinoma Patients. *Immunol. Invest.* 2020; 2:1-11. doi:10.1080/08820139.2020.1828454

14. Rodríguez M.F.B., Fernandez M.B., Baameiro N. L. et al. Blood Biomarkers of Uveal Melanoma: Current Perspectives. *Clin. Ophthalmol.* 2020; 14:157–169. doi:10.2147/OPTH.S199064

15. Cheng G., He J., Zhang L. et al. HIC1 modulates uveal melanoma progression by activating lncRNA-numb. *Tumour Biol.* 2016; 37(9):12779–12789. doi: 10.1007/s13277-016-5243-3

16. Бровкина А.Ф. Современные аспекты лечения меланом хориоидеи: проблемы, дискуссионные вопросы. *Вестник офтальмологии.* 2006; (1):13-15

17. AJCC Ophthalmic Oncology Task Force International Validation of the American Joint Committee on Cancer's 7th

Edition Classification of Uveal Melanoma. *JAMA. Ophthalmol.* 2015; 133:376–383. doi:10.1001/jamaophthalmol.2014.5395

18. Achberger S., Aldrich W., Tubbs R. et al. Circulating immune cell and microRNA in patients with uveal melanoma developing metastatic disease. *Mol. Immunol.* 2014; 58(2):182-186. doi: 10.1016/j.molimm.2013.11.018

19. Russo A., Caltabiano R., Longo A. et al. Increased Levels of miRNA-146a in Serum and Histologic Samples of Patients with Uveal Melanoma. *Front Pharmacol.* 2016; 15(7):424(1-6). doi: 10.3389/fphar.2016.00424.

20. Shields C.L., Manalac J., Das C. et al. Choroidal melanoma: clinical features, classification, and top 10 pseudomelanomas. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 2014; 25(3): 177-185. doi: 10.1097/ICU.0000000000000041



УФИМСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЛАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ



Устройство «УФалинк»

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2009/05489

Устройство предназначено
для УФ кроссликинга роговицы при:

- кератоконусе I-II стадии
- ятрогенных кератэктазиях
- пеллюцидной краевой дегенерации
- кератомалиции различного генеза
- буллезной кератопатии в терминальной стадии
- язвах роговицы
- некоторых видах кератитов

450008, г. Уфа, ул. Пушкина, 90 тел. +7 (347) 272-08-52 e-mail: niimarketing@yandex.ru www.ufaeyeinstitute.ru