

Молекулярно-генетическая гетерогенность меланомы глаза

Н.Н. Мазуренко, И.В. Цыганова, В.В. Назарова, И.А. Утяшев, К.В. Орлова,
Д.А. Понкратова, Д.В. Мартынков, Л.В. Демидов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Наталья Николаевна Мазуренко ntmazurenko@mail.ru

Введение. Меланома является наиболее распространенной опухолью глаза у взрослых и представлена 2 основными типами: увеальной (УМ) и конъюнктивальной (КМ), которые отличаются по клиническим (частота распространения, локализация, гистология) и генетическим характеристикам.

Цель исследования – сравнительное изучение молекулярно-генетических особенностей опухолей у пациентов с меланомой глаза.

Материалы и методы. С использованием метода секвенирования по Сэнгеру для анализа ДНК, выделенной после микродиссекции срезов опухолевых биопсий, проведено сравнительное изучение молекулярного профиля 78 опухолей глаза, среди них 73 УМ (хориоидеи, цилиарного тела и радужки) и 5 КМ. Исследован следующий спектр мутаций: GNAQ, GNA11, KIT, BRAF, NRAS.

Результаты. Мутации GNAQ и GNA11 выявлены в 81 % (59/73) УМ, соответственно в 42 % (31/73) и 38 % (28/73). В первичной УМ чаще присутствовали мутации GNAQ (63 %), а в метастатической – GNA11 (42 %). Наблюдались различия в распространенности мутаций GNAQ и GNA11 в зависимости от типа клеток УМ. Мутации GNAQ чаще обнаружены в веретенчатых УМ (55 %), а GNA11 – в эпителиоидных УМ (42 %). Не выявлено различий в частоте мутаций GNAQ/GNA11 в зависимости от возраста пациентов (моложе и старше 50 лет), а также в общей выживаемости пациентов УМ с мутациями GNAQ или GNA11. Кроме того, выявлены 3 УМ с мутациями KIT и 2 УМ с мутацией BRAF. В УМ хориоидеи, цилиарного тела и радужки существенных различий в частоте мутаций онкогенов не наблюдалось. Молекулярный профиль КМ отличается от профиля мутаций УМ и сходен с таковым для меланомы кожи: в 3 (60 %) КМ обнаружена мутация BRAF V600E, а в 1 (20 %) – NRAS Q61K.

Заключение. Генетический анализ свидетельствует о гетерогенности меланомы глаза и важен для характеристики и лечения заболевания.

Ключевые слова: увеальная меланома, конъюнктивальная меланома, мутации GNAQ, GNA11, KIT, BRAF, NRAS

Для цитирования: Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В., Назарова В.В. и др. Молекулярно-генетическая гетерогенность меланомы глаза. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(3):51–8.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-51-58

Molecular and genetic diversity in melanoma of eye

N.N. Mazurenko, I.V. Tsyganova, V.V. Nazarova, I.A. Utyashev, K.V. Orlova, D.A. Ponkratova, D.V. Martinkov, L.V. Demidov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. Ocular melanoma is the most common cancer of adult eye and is represented by two main subtypes of uveal (UM) and conjunctival (CM) melanoma with distinct clinical (frequency, localization, histology) and genomic features.

The objective is to compare molecular and genetic characteristics of tumors in patients with melanoma of the eye.

Materials and methods. In this study molecular profiling of 78 tumors including 73 UM (choroidea, ciliar body and iris) and 5 CM, was evaluated. DNA was isolated from tumor cells collected by macrodissection of FEPE sections of tumor biopsies using proteinase K. The following genes were studied by Sanger sequencing: GNAQ, GNA11, KIT, BRAF, NRAS.

Results. Mutations in GNAQ and GNA11 were found in 81 % (59/73) of UM, in 42 % (31/73) and 38 % (28/73) of cases correspondently. GNAQ mutations were more frequent in primary UM (63 %), while GNA11 mutations dominated in metastatic UM (42 %). There was a correlation between frequency of GNAQ/GNA11 mutations and histologic type of UM. GNAQ mutations were identified in 55 % of spindle cell UM, while GNA11 mutations were more frequent in epithelioid cell UM (42 %). There were no differences in frequency of GNAQ/GNA11 mutations in UM of patients of different age (younger and elder 50 years). There was no statistically difference in UM patient outcome with GNAQ or GNA11 mutations. We also detected 3 UM with KIT mutations and 2 UM with BRAF mutations. There was no big difference in frequency of «driver mutations» in UM of choroidea, ciliar body and iris. Molecular profiling of conjunctival melanoma (CM) resembles that of cutaneous melanoma of skin: in 3 (60 %) CM BRAF V600E was identified and in 1 (20 %) – NRAS Q61K.

Conclusion. Genetic analysis reveals wide diversity of melanoma of eye and is important for it characterization and treatment.

Key words: uveal melanoma, conjunctival melanoma, GNAQ, GNA11, KIT, BRAF, NRAS mutations

For citation: Mazurenko N.N., Tsyganova I.V., Nazarova V.V. et al. Molecular and genetic diversity in melanoma of eye. Uspekh molekulynoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2018;5(3):51–8.

Введение

Меланома глаза является распространенной опухолью глаза у взрослых и представлена 2 основными типами, которые отличаются по клиническим (частота распространения, локализация, гистология) и генетическим характеристикам [1].

Уvealная меланома (УМ) – наиболее распространенная злокачественная опухоль глаза нейроэктодермального происхождения, заболеваемость которой в мире составляет примерно 7000 человек ежегодно. Частота УМ колеблется от 0,2–0,3 случая на 1 млн населения Африки/Азии до 4–10 случаев на 1 млн белого населения по всему миру [2]. Этот редкий подтип меланомы (3,7–5,0 % всех типов меланомы) возникает в результате злокачественной трансформации меланоцитов сосудистой оболочки глазного яблока (хориоидеи) (>80 %), реснитчатого (цилиарного) тела (6–15 %) или радужки (4–6 %) [3]. Опухоль отличается агрессивным течением: у 50 % пациентов, независимо от метода лечения первичной опухоли, развиваются метастазы, и вследствие этого смертность достигает 53 % в течение 5-летнего периода [4]. УМ метастазирует гематогенным путем, чаще всего в печень (90 %), легкие (25 %), кости (15 %), кожу (10 %) [5, 6]. Медиана продолжительности жизни при метастазах в печени у пациентов с УМ составляет 9 мес, а в группе пациентов с экстрапеченочными проявлениями – 19–28 мес. К факторам неблагоприятного прогноза при УМ относятся возраст больного, размер первичной опухоли, клеточный состав (эпителиоидный или смешанный гистологический тип клеток), экстраокулярный рост, хромосомные изменения (моносомия хромосомы 3 и/или амплификация хромосомы 8) [2, 4].

УМ отличается от меланомы кожи и меланомы слизистых оболочек как по клиническому течению, так и по молекулярно-генетическим свойствам. Основные молекулярные нарушения, характерные для меланомы кожи (мутации *BRAF*, *NRAS*), не участвуют в запуске патологических процессов в УМ. В 60 % случаев УМ отмечают экспрессию тирозинкиназного рецептора *KIT*, чаще всего из-за амплификации гена, тогда как мутации гена *KIT* в УМ редки (9 %) [7].

Специфичными для УМ являются активирующие мутации генов *GNAQ* и *GNA11* (83 %), кодирующих альфа-субъединицы гетеротримерных G-белков G_{α_q} и $G_{\alpha_{11}}$, заякоренных на мембране [8–10]. Вследствие активирующих мутаций блокируется ГТФазная активность альфа-субъединицы и G-белок остается в активном состоянии. В дальнейшем происходит передача сигнала на посредники – аденилатциклазу и фосфолипазу C с последующей активацией протеинкиназ MEK и ERK, что приводит к стимуляции клеточной пролиферации или к активации транскрипции генов клеточного цикла: *CCND1* (cyclin-D1) и *CCTB1* [11]. Активирующие соматические мутации *GNAQ* или *GNA11* являются ранним событием и не связаны с наследственными и семейными случаями УМ [8, 12]. Мутации

GNA11 чаще, чем *GNAQ*, встречаются в метастазирующей меланоме, соответственно в 60 и 20 %, и наличие мутации *GNA11* отрицательно коррелирует со сроками выживаемости пациентов. Таким образом, мутации *GNA11* имеют прогностическое значение, такие опухоли ассоциированы с высоким риском метастазирования и худшим прогнозом, чем меланома с мутацией *GNAQ* [13].

Меланома радужки менее распространена (4–10 %), и в ней, в отличие от меланомы хориоидеи и цилиарного тела, встречаются не только мутации *GNAQ* или *GNA11*, но и мутации *BRAF*, *NRAS*, что объясняют большей экспозицией радужки облучению ультрафиолетом [14, 15]. Таким образом, меланома радужки имеет молекулярный профиль, сравнимый как с меланомой хориоидеи, так и с меланомой кожи, что позволяет рассматривать меланому радужки как отдельный подтип меланомы [15]. Меланома радужки возникает в более молодом возрасте и считается менее агрессивной с более благоприятным прогнозом, чем меланома хориоидеи, тогда как меланома цилиарного тела, наоборот, чаще склонна к метастазированию по сравнению с меланомой хориоидеи [3, 14].

Значительно реже, чем УМ, у 5 % больных меланомой глаза, встречается конъюнктивальная меланома (КМ), у лиц европеоидной расы – с частотой 0,2–0,8 % на 1 млн населения [3, 16]. Она возникает из меланоцитов базального слоя эпителия конъюнктивальной мембраны и сходна с меланомой слизистых оболочек. В отличие от УМ, КМ метастазирует сначала лимфогенным путем, а затем дает метастазы в легкие, печень, мозг [3, 16]. Средняя 10-летняя смертность при КМ составляет 30 %. КМ отличается от УМ по спектру «драйверных» мутаций и содержит мутации *BRAF* и *NRAS*, подобно меланоме кожи [16, 17].

Ранее при исследовании небольшой выборки пациентов с первичной УМ мы выявили мутации *GNAQ* у 41 % больных (*GNA11* еще не были описаны) и мутации *KIT* – у 11 % пациентов [18].

Цель исследования – сравнительное изучение молекулярно-генетических особенностей опухолей у 78 пациентов с меланомой глаза, из которых у 73 диагностирована УМ.

Материалы и методы

В работу включены данные 78 больных меланомой глаза, обратившихся в РОНЦ (ныне НМИЦ онкологии) им. Н.Н. Блохина по поводу лечения метастазов в 2013–2017 г. Все больные получали первичное лечение (энуклеация, радиотерапия либо лазерное лечение) в различных офтальмологических клиниках.

Для генетического исследования использовали образцы фиксированной удаленной опухоли УМ в парафиновых блоках или биопсии метастатического очага, чаще в печени. Примерно у половины пациентов с метастазами исследованы биопсии метастазов, у остальных – образцы первичных опухолей. Морфологическая

характеристика и гистологическая верификация опухолевой ткани проведены в отделении патологической анатомии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Препараты ДНК получали с помощью протеиназы К (Novagen, США) из опухолевых клеток, собранных в результате макродиссекции депарафинизированных срезов опухолевых биопсий. Анализ мутаций выполняли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами к «горячим точкам» генов *GNAQ* и *GNA11* (экзоны 5 и 4), *KIT* (экзоны 11, 13 и 17), *BRAF* (экзон 15) и *NRAS* (экзоны 2 и 3) [18, 19]. После разделения в агарозном геле ПЦР-продукты выделяли с использованием набора Wizard®PCR Preps DNA Purification System (Promega, США) и секвенировали по Сэнгеру на ABI PRISM 3100-Avant с помощью реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator Vol. 3.1. Все случаи УМ без мутаций повторно исследовали на наличие мутации *BRAF* с использованием ПЦР в реальном времени с плавлением на приборе CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, США).

Результаты

Генетическое исследование проведено с препаратами опухолевой ДНК 78 больных меланомой глаза. Клинические характеристики пациентов представлены в табл. 1. У 73 (94 %) пациентов диагностирована УМ, у 5 (6 %) – меланома конъюнктивы орбиты.

Уvealная меланома. Среди пациентов с УМ у 64 (88 %) диагностирована меланома хориоидеи, у 3 (4 %) – меланома цилиарного тела, у 3 – меланома радужки и у 3 – меланома радужки с признаками поражения цилиарного тела или хориоидеи (смешанная). Важно отметить, что у 2 пациентов меланома хориоидеи была беспигментной.

Большинство пациентов с УМ составили женщины – 48/73 (66 %). Средний возраст постановки первичного диагноза УМ – 53 года (25–78 лет), при этом средний возраст мужчин – 52 года, женщин – 55 лет. Диагноз УМ был поставлен для 13 (18 %) пациентов в возрасте до 40 лет, для 15 (20 %) – в возрасте 41–50 лет и для 13 (18 %) – 51–60 лет. У 27 (37 %) больных появление опухоли отмечено в возрасте 61–70 лет и у 5 человек – старше 70 лет.

Большинство (62/73, 85 %) пациентов с УМ на момент проведения исследования имели метастазы, чаще всего в печени (>80 %), реже в легкие, кости, мягкие ткани головы, кожу. Среднее время появления метастазов после первичного лечения (хирургическая энуклеация, радиотерапия либо лазерное лечение) варьировало от нескольких месяцев до 18 лет.

Всего при генетическом анализе 73 УМ мутации *GNAQ* и *GNA11* выявлены в 81 % (59/73) случаев (табл. 2). Мутации в экзоне 5 гена *GNAQ* обнаружены в 42 % (31/73) случаев УМ: доминировали замены Q209P в 74 % (23/31), а Q209L выявлены в 26 % (8/31). Мутации в кодоне 209 гена *GNA11* обнаружены в 38,4 % (28/73) случаев, причем доминировали замены Q209L (26/28; 93 %), тогда как замены Q209P выявлены

Таблица 1. Клиническая характеристика больных увеальной меланомой (УМ) ($n = 73$)

Table 1. Clinical characteristics of the patients with uveal melanoma (UM) ($n = 73$)

Характеристика Characteristic	<i>n</i>	%
Пол: Sex:		
женский female	48	66
мужской male	25	34
Возраст пациентов, лет: Patient age, years:		
моложе 40 younger than 40	13	18
41–50	15	20
51–60	13	18
61–70	27	37
старше 70 лет older than 70	5	7
Локализация первичной УМ: Localization of primary UM:		
хориоидея choroidea	64	88
цилиарное тело ciliary body	3	4
радужка iris	3	4
смешанная mixed	3	4
Гистологический вариант строения УМ: UM histological type:		
веретенноклеточный spindle cell	18	43
эпителиоидноклеточный epithelioid cell	15	36
смешанный mixed	9	11
неизвестно unknown	31	–
Метастазирование УМ: UM metastases:		
первичная меланома primary melanoma	11	15
метастатическая metastatic	62	85

только в 7 % (2/28) УМ. Любопытно, что мутации в экзоне 4 *GNAQ* и *GNA11* в кодоне 183 не обнаружены, при этом выявлен 1 случай SNP в интроне 4.

Имеются различия в частоте мутаций *GNAQ* и *GNA11* в первичной и метастатической УМ. В первичной УМ мутации *GNAQ* выявлены в 7 (63 %), а *GNA11* – в 2 (18 %) из 11 случаев. Еще в одной первичной УМ обнаружена мутация *KIT* и в одной первичной УМ мутации не выявлены. Если же взять только случаи метастатической УМ, мутации *GNAQ* выявлены в 39 % (24/62), а *GNA11* – в 42 % (26/62) УМ. Частота мутаций *GNAQ* и *GNA11* не различалась в возрастных группах моложе и старше 50 лет.

Таблица 2. Результаты анализа мутаций в увеальной и конъюнктивной меланоме

Table 2. Results of mutation analysis in uveal and conjunctival melanoma

Меланома глаза Melanoma of the eye	Число больных, n Number of patients, n	Мутации генов Gene mutations					
		<i>GNAQ</i>	<i>GNA11</i>	<i>KIT</i>	<i>BRAF</i>	<i>NRAS</i>	<i>WT</i>
Увеальная: Uveal:	73	31	28	3	2	—	9
хориоидеи choroidea	64	28	24	2	2	—	8
цилиарного тела ciliary body	3	1	2	—	—	—	—
радужки iris	3	1	1	—	—	—	1
смешанная mixed	3	1	1	1	—	—	—
Конъюнктивная Conjunctival	5	0	0	0	3	1	1

Примечание. *WT* — дикий тип тестируемых генов.

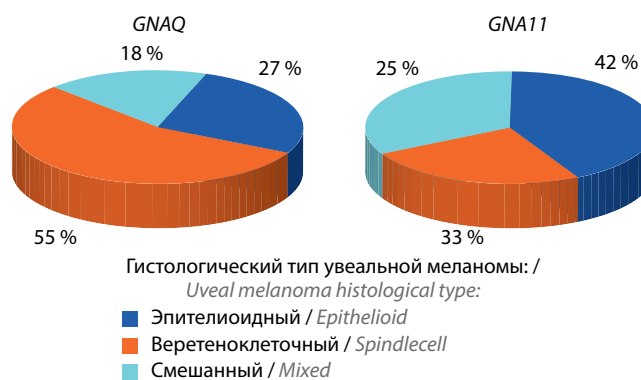
Note. *WT* — wild type of the tested genes.

При сравнении УМ разной локализации существенных различий в частоте мутаций онкогенов не обнаружено. Мутации *GNAQ* выявлены в 28 % случаев меланомы хориоидеи и в 33 % случаев меланомы цилиарного тела, радужки и смешанной УМ. Мутации *GNA11* обнаружены в 24 % случаев меланомы хориоидеи и в 33 % случаев меланомы радужки и смешанной УМ, а также в 2 (66 %) из 3 случаев меланомы цилиарного тела. Среди образцов меланомы радужки выявлены опухоли с мутациями *GNAQ*, *GNA11* или *KIT* и образцы с диким типом исследованных генов (см. табл. 2).

Мутации в экзоне 11 *KIT* выявлены в 3 случаях УМ у больных в возрасте до 50 лет: у 2 пациенток: в веретеночеточной (*del557-559WKV>C*) и эпителиоидной (*Q556H*) меланоме хориоидеи. У обеих пациенток метастазы развились соответственно через 6 и 7 лет, общая выживаемость составила 6 лет 4 мес и 9 лет соответственно. Кроме того, мутация в экзоне 11 гена *KIT* (*K558N*) выявлена у пациентки 38 лет в первичной меланоме радужки с начальными признаками инвазии цилиарного тела и склеры.

Мутации *BRAF* обнаружены в 2 случаях УМ: у пациентки 58 лет с разрастанием пигментной эпителиоидной меланомы хориоидеи задней стенки глазного яблока с прорастанием склеры и врастанием в прилежащие мягкие ткани (*BRAF V600E*). Мутация в экзоне 15 гена *BRAF* также обнаружена у пациента 56 лет с диссеминированной меланомой хориоидеи правого глаза с метастазами в печени при использовании ПЦП в реальном времени с плавлением, тогда как при использовании менее чувствительного метода секвенирования по Сэнгеру эта мутация не обнаружена. Во всех остальных случаях перепроверка данных секвенирования по Сэнгеру методом ПЦП с плавлением подтвердила полученные ранее результаты.

По гистологической картине случаи УМ разделяются на веретеночеточные (43 %), эпителиоидные (35 %) и со смешанным типом клеток (21 %). При сопоставлении УМ с различной гистологической картиной обнаружены различия в частоте мутаций *GNAQ* и *GNA11* (см. рисунок). Мутации *GNAQ* выявлены в 55 % случаев УМ с веретеночеточным фенотипом, в 27 % — с эпителиоидным и в 18 % — со смешанным фенотипом. Мутации *GNA11* чаще присутствовали в эпителиоидных (42 %), чем в веретеночеточных УМ (33 %) и в УМ со смешанным фенотипом (21 %). Таким образом, мутации *GNAQ* чаще присутствовали у пациентов с веретеночеточной УМ, а *GNA11* — с эпителиоидной УМ. Следует отметить, что, по данным литературы, последние характеризуются худшей выживаемостью [4]. Однако при анализе общей выживаемости пациентов с УМ в зависимости от наличия мутаций в генах *GNAQ* и *GNA11* достоверных различий нами не выявлено.



Частота мутаций генов *GNAQ* и *GNA11* в различных типах клеток увеальной меланомы (n = 42)

Mutation rates for the *GNAQ* and *GNA11* genes in various cell types of uveal melanoma (n = 42)

Меланома конъюнктивы. КМ обнаружена только у 5 пациентов (из них 4 женщины) в возрасте 33–68 лет (средний возраст 52,2 года). Средний возраст постановки диагноза – 42 года. У 1 пациентки 39 лет диагностирован рецидив КМ, причем первичная меланома была выявлена в возрасте 21 года. Другая пациентка 33 лет с метастазами КМ заболела в 31 год. У 3 пациентов обнаружены метастазы КМ в печени, у 1 пациента – в головном мозге. При генетическом анализе у 3 из 5 пациентов с КМ обнаружена мутация *BRAF V600E* (60 %), у 1 – *NRAS Q61K* (20 %). У 1 пациентки не удалось выявить ни одной из исследованных мутаций ни в первичной КМ, ни в метастазе в печени.

Обсуждение

УМ – наиболее распространенная опухоль глаза у взрослых, которая метастазирует более чем в 50 % случаев после удаления или лечения первичной опухоли, однако эффективного лечения этого заболевания сегодня нет [1–4, 21]. Установлено, что на ранних стадиях заболевания в 83 % случаев УМ возникают активирующие мутации в генах *GNAQ* и *GNA11*, которые играют важную роль в развитии УМ [8–10].

В настоящей работе проведен генетический анализ опухолевой ДНК у 73 пациентов с УМ (наиболее крупная выборка в России). Важно отметить более ранний возраст пациентов (средний возраст 53 года), преимущественно женщин, по сравнению с западными странами (>60–70 лет), где большинство больных – мужчины [22]. Профиль мутаций в целом соответствует данным литературы [8–10]. У половины пациентов с метастатической УМ мы исследовали биопсии метастазов в печени, а у остальных – первичные опухоли. У нас не было возможности сравнить мутации в первичной опухоли и метастазе пациентов с УМ, поэтому мы допускаем, что данные по первичной опухоли и метастазу совпадают. Как показали результаты специальных исследований, имеется 100 % совпадение в наличии мутаций *GNAQ* и *GNA11* в первичной опухоли и метастазе УМ [23].

Мутации *GNAQ/GNA11* нами выявлены в 81 % случаев УМ: в 83 % случаев первичной и в 80 % – метастатической УМ. Мутации *GNAQ* обнаружены в 63 % случаев первичной и в 39 % метастатической УМ, тогда как мутации *GNA11* – в 18 % первичной и в 42 % метастатической УМ. Частота мутаций *GNAQ* и *GNA11* не различалась в опухолях у пациентов моложе и старше 50 лет. Выявлены различия в частоте мутаций генов в зависимости от гистологического типа клеток: мутации *GNAQ* обнаружены в 55 % веретенчатых УМ, мутации *GNA11* чаще (42 %) выявлялись в эпителиоидных опухолях. По данным аналогичных исследований, эпителиоидный тип клеток является признаком неблагоприятного прогноза [2–4]. Однако при анализе общей выживаемости в зависимости от наличия мутации в генах *GNAQ* и *GNA11* достоверных различий в анализируемой выборке не наблюдалось. Кроме *GNAQ* и *GNA11* в 3 случаях УМ выявлены мутации *KIT*, в 2 – *BRAF*.

При сравнении УМ разной локализации существенных различий в частоте мутаций онкогенов при меланоме хориоидеи, цилиарного тела и радужки не обнаружено, хотя некоторые авторы утверждают, что в меланоме цилиарного тела не встречается мутация *GNAQ* [22]. В нашем исследовании в 2 меланоме цилиарного тела выявлена мутация *GNA11*, и в 1 – *GNAQ*. Таким образом, мутация *GNA11* обнаружена в 66 % случаев меланомы цилиарного тела, что коррелирует с данными о высокой экспрессии *GNA11* в меланоме цилиарного тела и плохом прогнозе этого варианта УМ [14], однако выборка этого типа меланом у нас недостаточна для подобных выводов.

Мутации *GNAQ* встречались чаще в первичной, а *GNA11* – в метастатической УМ, что подтверждает данные литературы. Так, мутации *GNAQ* выявлены в 45–50 % случаев первичной УМ, в 22 % метастатической УМ [9], а мутации *GNA11* найдены в 32 % случаев первичной УМ и в 57 % метастатической УМ [10]. Поскольку мутации *GNA11* встречались в метастатической УМ чаще, чем *GNAQ*, и наличие мутации коррелировало с выживанием пациентов, авторы сделали вывод о том, что мутации *GNA11* имеют прогностическое значение, такие опухоли ассоциированы с высоким риском метастазирования и худшим прогнозом, чем меланома с мутацией *GNAQ* [13]. По другим данным, общая выживаемость пациентов с УМ хуже при наличии мутации *GNAQ* [24]. Последующие исследования показали, что гены *GNAQ* и *GNA11* не имеют существенного прогностического значения для пациентов с УМ, тогда как существует группа генов *BSE* (*BAP1*, *SF3B1* и *EIF1AX*), мутации в которых несут риск метастазирования УМ и имеют прогностическое значение [2, 20].

По разным данным, частота мутаций генов *GNAQ* и *GNA11* в УМ достигает в популяции европеоидов 64,4–88,0 % [22, 24]. Фактически Gq-сигнальный путь активирован в 100 % случаев УМ, его активация является иницирующей для УМ, необходима, но недостаточна для трансформации клеток [26], аналогично тому, как для образования меланомы кожи недостаточно мутации *BRAF*. Недавно в УМ, не содержащей мутации *GNA11* и *GNAQ*, обнаружены инактивирующие мутации других генов Gq-сигнального пути: *CYSLTR2* и *PLCB4* [25, 26]. После того как *CYSLTR2* активирует белки Ga/q11, происходит обмен ГДФ на ГТФ, что приводит к связыванию Ga/q11 с фосфолипазой C β и к активации PLC β -пути с последовательным высвобождением ионов Ca. Мутантные *GNAQ* и *GNA11* через протеинкиназу C могут активировать MAP-киназный путь [20]. В связи с этим в течение ряда лет проводились исследования по использованию ингибиторов MEK – селуметиниба и траметиниба – для лечения УМ [1, 21], однако надежды на использование этих препаратов таргетной терапии не оправдались. Хотя в 95 % метастазов УМ экспрессируется рецептор KIT, известно, что ингибиторы тирозинкиназ эффективны

только в клетках с мутантным *KIT*. Тем не менее попытки лечения УМ с мутациями *KIT* ингибиторами тирозинкиназ (иматиниб, сунитиниб) также не увенчались успехом, так как эффект был слишком краткосрочным [27, 28].

Любопытно, что активирующие соматические мутации генов *GNAQ/GNA11* затрагивают кодон Q209 экзона 5 (замены глутамина на лейцин Q209L – 51 % или пролин Q209P – 47 %) [9, 10, 13]. В нашем исследовании в гене *GNAQ* доминировала мутация Q209P (74 %), а в гене *GNA11* – Q209L (93 %), и общее число замен в *GNAQ/GNA11* Q209L (34/59; 58 %) значительно превышает число замен Q209P (25/59; 42 %). В связи с этим мы обратили внимание на только что появившееся пилотное сообщение американских исследователей, согласно которому при лечении больных УМ с метастазами в печени паклитаксолом обнаружены различия в реакции на лечение в зависимости от типа мутации *GNAQ* [29]. Ответ на лечение отмечен у пациента с метастазом УМ в печени и мутацией *GNAQ* Q209P, но не у 2 других пациентов с мутацией *GNAQ* Q209L или пациента с мутацией *KIT*. Можно предположить, что, поскольку пролин существенно изменяет угол аминокислотной цепи (на 120°), замена может влиять на свойства белка GNAQ. Хотя это только первое единичное наблюдение и оно требует дальнейшего подтверждения, авторы полагают, что мутация *GNAQ* Q209P может быть предиктивным маркером чувствительности метастатической УМ к паклитакселу и другим таксанам [29]. Кстати, в нашей работе практически все замены глутамина на пролин выявлены в гене *GNAQ*.

Особый интерес представляет изучение группы пациентов с редкой КМ, которая отличалась ранним средним возрастом возникновения опухоли (42 года). Так, у 2 пациенток опухоли возникли в 21 и 31 год. Четыре из 5 пациентов были женщины, средний возраст – 52 года. Метастазы (в печени, головном мозге) обнаружены у всех, за исключением пациентки с рецидивом КМ. Профиль мутаций онкогенов соответствовал другим опубликованным данным: в 3 (60 %) КМ выявлена мутация *BRAF V600E*, а в 1 (20 %) – *NRAS Q61K* [17, 30]. У 1 пациентки мутации отсутствовали как в первичной КМ, так и в метастазе в печени. По данным литературы, в таких случаях может иметь место активация MAP-киназного пути за счет мутации *NFI* [30]. Интересно, что для КМ не характерны мутации *KIT*. Есть основания полагать, что пациентам с КМ может помочь комбинированная таргетная терапия ингибиторами *BRAF* и *MEK* [31].

Заключение

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о молекулярной гетерогенности меланомы глаза. Несомненно, что всем пациентам с УМ или КМ необходимо проводить генетические исследования для характеристики процесса и выбора терапии. Уже сегодня выявление мутаций *BRAF* или *KIT* позволяет надеяться на возможность применения соответствующей таргетной терапии. Мутации *GNAQ/GNA11* не имеют существенного прогностического значения, но, возможно, могут иметь предиктивное значение, например по чувствительности к таксанам. Надеемся, что дальнейшие исследования дадут ответ на этот вопрос.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mazurenko N. N. Молекулярно-генетические факторы и маркеры меланомы. В кн.: Молекулярно-генетические маркеры опухолей. Ред.: Н.Е. Кушлинский, Н.Н. Мазуренко, М.В. Немцова. М.: РАМН, 2016. Pp. 85–128. [Mazurenko N. N. Molecular and genetic factors and markers of melanoma. In: Molecular and genetic tumor markers. Eds.: N. E. Kushlinsky, N. N. Mazurenko, M. V. Nemtsov. Moscow: RAMN, 2016. P. 85–128. (In Russ.)].
- Helgadottir H., Höiom V. The genetics of uveal melanoma: current insights. *Appl Clin Genet* 2016;9:147–55. DOI: 10.2147/TACG.S69210. PMID: 27660484.
- Jovanovic P., Mihajlovic M., Djordjevic-Jocic J. et al. Ocular melanoma: an overview of the current status. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6(7):1230–44. PMID: 23826405.
- Singh A. D., Turell M. E., Topham A. K. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology* 2011;118(9):1881–5. DOI: 10.1016/j.jophtha.2011.01.040. PMID: 21704381.
- The 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. *Arch Ophthalmol* 2001;119(5):670–6. DOI: 10.1001/archophth.119.5.670.
- Coupland S. E., Lake S. L., Zeschneck M., Damato B. E. Molecular pathology of uveal melanoma. *Eye (Lond)* 2013;27(2):230–42. DOI: 10.1038/eye.2012.255. PMID: 23222563.
- Wallander M. L., Layfield L. J., Emerson L. L. et al. *KIT* mutations in ocular melanoma: frequency and anatomic distribution. *Mod Pathol* 2011;24(8):1031–5. DOI: 10.1038/modpathol.2011.57. PMID: 21478825.
- Onken M. D., Worley L. A., Long M. D. et al. Oncogenic mutations in *GNAQ* occur early in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(12):5230–4. DOI: 10.1167/iiov.08-2145. PMID: 18719078.
- Van Raamsdonk C. D., Bezrookove V., Green G. et al. Frequent somatic mutations of *GNAQ* in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* 2009;457(7229):599–602. DOI: 10.1038/nature07586. PMID: 19078957.
- Van Raamsdonk C. D., Griewank K. G., Crosby M. B. et al. Mutations in *GNA11* in uveal melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(23):2191–9. DOI: 10.1056/NEJMoa1000584. PMID: 21083380.
- Gaudi S., Messina J. L. Molecular bases of cutaneous and uveal melanomas. *Pathol Res Int* 2011;2011:159421. DOI: 10.4061/2011/159421. PMID: 21876842.
- Hawkes J. E., Campbell J., Garvin D. et al. Lack of *GNAQ* and *GNA11* germ-line mutations in familial melanoma pedigrees with uveal melanoma or blue nevi. *Front Oncol* 2013;3:160.

- DOI: 10.3389/fonc.2013.00160.
PMID: 23825798.
13. Griewank K.G., van de Nes J., Schilling B. et al. Genetic and clinicopathologic analysis of metastatic uveal melanoma. *Mod Pathol* 2014;27(2):175–83. DOI: 10.1038/modpathol.2013.138. PMID: 23887304.
 14. Scholz S.L., Möller I., Reis H. et al. Frequent GNAQ, GNA11, and EIF1AX mutations in iris melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(9):3464–70. DOI: 10.1167/iovs.17–21838. PMID: 28700778.
 15. van Poppelen N.M., Vaarwater J., Mudhar H.S. et al. Genetic background of iris melanomas and iris melanocytic tumors of uncertain malignant potential. *Ophthalmology* 2018;125(6):904–12. DOI: 10.1016/j.ophtha.2017.12.022. PMID: 29371009.
 16. Wong J.R., Nanji A.A., Galor A., Karp C.L. Management of conjunctival malignant melanoma: a review and update. *Expert Rev Ophthalmol* 2014;9(3):185–204. DOI: 10.1586/17469899.2014.921119. PMID: 25580155.
 17. Griewank K.G., Westkemper H., Murali R. et al. Conjunctival melanomas harbor BRAF and NRAS mutations and copy number changes similar to cutaneous and mucosal melanomas. *Clin Cancer Res* 2013;19(12):3143–52. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0163. PMID: 23633454.
 18. Ковчина К.И., Беляков И.С., Лихванцева В.Г. и др. Мутации в генах KIT, GNAQ, BRAF и RAS у больных увеальной меланомой. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи 2011;(3):48–52. [Kovchina K.I., Belyakov I.S., Likhvantseva V.G. et al. KIT, GNAQ, BRAF and RAS oncogene mutations in patients with uveal cancer. *Sarkomy kostey, myagkikh tkaney i opukholi kozhi = Bone and Soft Tissue Sarcomas, Tumors of the Skin* 2011;(3):48–52. (In Russ.)].
 19. Mazurenko N.N., Tsyganova I.V., Lushnikova A.A. et al. Spectrum of oncogene mutations is different in melanoma subtypes. *Mol Biol (Mosk)* 2015;49(6):1022–9. DOI: 10.7868/S0026898415060166. PMID: 26710785.
 20. Decatur C.L., Ong E., Garg N. et al. Driver mutations in uveal melanoma: associations with gene expression profile and patient outcomes. *JAMA Ophthalmol* 2016;134(7):728–33. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2016.0903. PMID: 27123562.
 21. Lee S.H., Kim J.E., Jang H.S. et al. Genetic alterations among Korean melanoma patients showing tumor heterogeneity: a comparison between primary tumors and corresponding metastatic lesions. *Cancer Res Treat* 2018. DOI: 10.4143/crt.2017.535. PMID: 29361821.
 22. Schneider B., Riedel K., Zhivov A. et al. Frequent and Yet Unreported GNAQ and GNA11 Mutations are Found in Uveal Melanomas. *Pathol Oncol Res* 2017. DOI: 10.1007/s12253-017-0371-7. PMID: 29209985.
 23. Field M.G., Michael A., Durante M.A. et al. Punctuated evolution of canonical genomic aberrations in uveal melanoma. *Nat Commun* 2018;9(1):116. DOI: 10.1038/s41467-017-02428-w. PMID: 29317634.
 24. Chua V., Aplin A.E. Novel therapeutic strategies and targets in advanced uveal melanoma. *Curr Opin Oncol* 2018;30(2):134–41. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000425. PMID: 29206651.
 25. Moore A.R., Ceraudo E., Sher J.J. et al. Recurrent activating mutations of G-protein-coupled receptor *CYSLTR2* in uveal melanoma. *Nat Genet* 2016;48(6):675–80. DOI: 10.1038/ng.3549. PMID: 27089179.
 26. Field M.G., Durante M.A., Anbunathan H. et al. Punctuated evolution of canonical genomic aberrations in uveal melanoma. *Nat Commun* 2018;9(1):116. DOI: 10.1038/s41467-017-02428-w. PMID: 29317634.
 27. Mahipal A., Tjani L., Chan K. et al. A pilot study of sunitinib malate in patients with metastatic uveal melanoma. *Melanoma Res* 2012;22(6):440–6. DOI: 10.1097/CMR.0b013e328358b373. PMID: 23114504.
 28. Maio M., Danielli R., Chiarion-Sileni V. et al. Efficacy and safety of ipilimumab in patients with pre-treated, uveal melanoma. *Ann Oncol* 2013;24(11):2911–5. DOI: 10.1093/annonc/mdt376. PMID: 24067719.
 29. Abdel Karim N., Eldessouki I., Taftaf A. et al. GNQ-209P Mutation in metastatic uveal melanoma and treatment outcome. *Case Rep Oncol Med* 2018;2018:4256365. DOI: 10.1155/2018/4256365. PMID: 29850322.
 30. Scholz S.L., Cosgarea I., Süßkind D. et al. NF1 mutations in conjunctival melanoma. *Br J Cancer* 2018;118(9):1243–7. DOI: 10.1038/s41416-018-0046-5. PMID: 29559732.
 31. Mor J.M., Heindl L.M. Systemic BRAF/MEK inhibitors as a potential treatment option in metastatic conjunctival melanoma. *Ocul Oncol Pathol* 2017;3(2):133–41. DOI: 10.1159/000452473. PMID: 28868285.

Вклад авторов

Н.Н. Мазуренко: дизайн исследования, анализ результатов, написание статьи;

И.В. Цыганова, Д.А. Понкратова: получение результатов исследования;

В.В. Назарова: сбор и обработка материала, анализ результатов;

И.А. Утяшев, К.В. Орлова: сбор материала;

Д.А. Мартынков: получение материала;

Л.В. Демидов: концепция исследования.

Authors' contributions

N.N. Mazurenko: developing the research design, analysis of the data, article writing;

I.V. Tsyganova, D.A. Ponkratova: study results generation;

V.V. Nazarova: material collection and processing, analysis of the data;

I.A. Utyashev, K.V. Orlova: material collection;

D.V. Martinkov: receipt material;

L.V. Demidov: study concept.

ORCID авторов/ORCID of authors

Н.Н. Мазуренко/N.N. Mazurenko: <https://orcid.org/0000-0003-4767-6983>

В.В. Назарова/V.V. Nazarova: <https://orcid.org/0000-0003-0532-6061>

И.А. Утяшев/I.A. Utyashev: <https://orcid.org/0000-0003-3474-5273>

К.А. Орлова/K.V. Orlova: <https://orcid.org/0000-0002-0442-5917>

Д.А. Понкратова/D.A. Ponkratova: <https://orcid.org/0000-0002-9048-4410>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 20.07.2018. **Принята к публикации:** 14.08.2018.

Article received: 20.07.2018. **Accepted for publication:** 14.08.2018.