
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ — КЛИНИКЕ

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ *BARD1* И *BRIP1* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ

Л.Мухана¹, А.Аит Аисса¹, А.А.М.Ахмед¹, С.В.Саакян^{2,3},
А.Ю.Цыганков^{2,3}, М.Л.Благонравов¹, М.М.Азова¹

¹ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, РФ; ²ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, Москва, РФ; ³ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И.Евдокимова Минздрава России, Москва, РФ

Учитывая недостаточную изученность наследственной предрасположенности в развитии увеальной меланомы, был проведён анализ встречаемости полиморфизмов *rs1048108*, *rs2229571*, *rs2070094* гена *BARD1* и *rs4986764* гена *BRIP1* у пациентов с увеальной меланомой и стационарным невусом хориоидеи по сравнению со здоровыми добровольцами (контроль). Минорные аллели полиморфных локусов *BRIP1 rs4986764* и *BARD1 rs2070094*, а также гомозиготность по аллелю *T* локуса *BARD1 rs1048108* являются общими генетическими маркерами предрасположенности к увеальной меланоме и стационарному невусу, в то время как гомозиготный генотип *GG* по полиморфизму *BARD1 rs2229571* — специфическим маркером предрасположенности к увеальной меланоме и прогрессирующему невусу хориоидеи. Обнаружен специфический маркер протекции по отношению к увеальной меланоме и прогрессирующему невусу хориоидеи, которым выступает гетерозиготность по полиморфному локусу *BARD1 rs1048108*. Результаты исследования свидетельствуют о целесообразности изучения полиморфизмов гена *BARD1 (rs1048108, rs2229571, rs2070094)* и гена *BRIP1 (rs4986764)* у пациентов с увеальной меланомой и прогрессирующим невусом хориоидеи. Полученные данные могут быть использованы при формировании групп риска, профилактике увеальной меланомы и в дифференциальной диагностике внутриглазных новообразований.

Ключевые слова: *генные полиморфизмы; увеальная меланома; BARD1; BRIP1*

Увеальная меланома (УМ) занимает лидирующее место среди злокачественных внутриглазных новообразований. От общего числа всех злокачественных новообразований глазного яблока на долю УМ приходится около 86% [1,2]. Сложность её клинической диагностики обусловлена необходимостью дифференциации с другими внутриглазными заболеваниями, а отсутствие своевременной диагностики приводит к выявлению заболевания на III-IV стадии [3]. Наиболее изученными при УМ являются цито-

генетические нарушения, которые в опухолевых клетках представлены аномалиями хромосом 1, 3, 6, 8 пар [4]. У 70% больных определяется моносомия хромосомы 3, а в 30% случаев выявляется аллельная делеция короткого плеча хромосомы 1 (1p36), что ассоциировано с экстракслеральной инвазией опухолевого образования [4,5]. Также выявлены разнообразные молекулярно-генетические нарушения, влияющие на ключевые сигнальные пути, в том числе митогенактивируемый протеинкиназный путь (МАРК) [5].

Вместе с тем не меньший интерес представляют герминальные мутации, определяющие генетическую предрасположенность к развитию

Адрес для корреспонденции: dr.loujain.mh@live.ru. Мухана Л.

DOI 10.47056/0365-9615-2023-175-3-386-390

злокачественных новообразований, в частности УМ. Так, известно, что мутации гена *BARD1* (BRCA1-associated RING domain protein1), локализованного в хромосоме 2, ассоциированы с некоторыми видами онкопатологии [6]. *BARD1* способен независимо от гена *BRCA1* инициировать р53-зависимый апоптоз. В ряде семей, отягощённых риском развития РМЖ, были обнаружены мутации гена *BARD1* без наличия мутаций *BRCA1/2*, что позволяет рассматривать его в качестве маркера предрасположенности к развитию данной онкопатологии [7]. Некоторые полиморфизмы гена *BARD1* (*rs17489363*, *rs2229571*, *rs3738888*, *rs3768716*, *rs6435862*, *rs3768707*, *rs17487792*, *rs2229571*, *rs1048108*) ассоциированы с риском развития ряда злокачественных новообразований [8].

Ген *BRIP1* (BRCA1 interacting helicase 1) расположен в хромосоме 17 (17q22-q24), кодирует геликазу, взаимодействующую с *BRCA1* и участвующую в репарации двухцепочечных разрывов ДНК [9]. Мутации в гене используются в качестве потенциального биомаркера прогнозирования выживаемости пациентов с некоторыми видами онкопатологии, так как некоторые варианты гена *BRIP1* связаны с предрасположенностью к некоторым злокачественным новообразованиям [10].

Несмотря на достижения последних лет, остаётся крайне сложной проблема предиктивной диагностики УМ, что связано прежде всего с недостаточной изученностью факторов, определяющих генетическую предрасположенность к её развитию. Эффективная персонализированная терапия УМ в настоящее время отсутствует, что приводит к прогрессированию заболевания и неизбежным фатальным исходам [11].

Цель данной работы — изучить встречаемость полиморфизмов *rs1048108*, *rs2229571*, *rs2070094* гена *BARD1*, а также полиморфизма *rs4986764* гена *BRIP1* у пациентов с УМ и проанализировать их возможную ассоциацию с данной патологией.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинические данные. В исследовании приняли участие 126 добровольцев, давших письменное информированное согласие: 65 пациентов (17 мужчин и 48 женщин) с новообразованиями хориоидеи, средний возраст — 49.6±15.2 года; 61 человек (15 мужчин и 46 женщин) без внутриглазных новообразований, средний возраст — 38.72±11.13 года (контрольная группа). Критерии исключения из исследования: нали-

чие соматического заболевания в состоянии суб- и декомпенсации, иные онкологические заболевания.

Во всех случаях проводили комплексное клиничко-инструментальное обследование, включавшее стандартные офтальмологические (визометрия, периметрия, тонометрия, биомикроскопия, офтальмоскопия) и специальные (эхография, оптическая когерентная томография, в том числе в ангиографическом режиме) методы исследования. В зависимости от характера патологического процесса по данным клиничко-инструментальных исследований все пациенты были разделены на две группы: опытную (пациенты с УМ и прогрессирующим невусом хориоидеи, $N=42$) и группу риска (пациенты со стационарным невусом хориоидеи, $N=23$).

В опытную группу вошли пациенты в возрасте 56.3±9.8 года. Во всех случаях по данным офтальмоскопии, эхографии, а также оптической когерентной томографии (при размерах опухоли менее 2 мм) определяли наличие прогрессирующего внутриглазного меланоцитарного новообразования. Меланомы хориоидеи стадии T1-T3 составляли 83.3% ($N=35$), прогрессирующие невусы хориоидеи — 16.7% ($N=7$). В группу риска вошли пациенты в возрасте 47.5±7.9 года. Во всех случаях определялось наличие стационарного невуса хориоидеи без признаков прогрессии в течение 2 лет наблюдений.

Выделение ДНК и генотипирование. Генетическую ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием реагентов компании "Синтол". Генотипирование по полиморфизмам генов *BARD1* (*rs1048108*, *rs2229571*, *rs2070094*) и *BRIP1* (*rs4986764*) осуществлялось методом ПЦР с последующей рестрикцией ДНК (табл. 1). Для разделения полученных фрагментов выполнялся электрофорез в агарозном геле.

Статистический анализ. Использовали язык программирования R. Для сравнения частот генов и генотипов в изучаемых группах применяли критерий χ^2 и точный критерий Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Рассчитывали отношение шансов (ОШ) и 95% доверительный интервал (95%ДИ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полиморфные варианты гена *BARD1* и гена *BRIP1* в исследуемых группах представлены в таблице 2. При изучении распределения генотипов по полиморфизму *rs4986764* гена *BRIP1* между пациентами и контрольной группой выявлены значимые различия. Так, гомозиготы

Таблица 1. Условия генотипирования

Генный полиморфизм	Праймер	T _{отж} , °C	Рестриктаза	Длина фрагментов ДНК, п.н.
<i>BARD1</i> rs2229571 (<i>Arg378Ser</i>)	F: 5'-AAGTTGGTGGTACATCAGGGCG-3' R: 5'-ATTGGGCAACAGCTTCATTGCT-3'	56	AspLEI	GG: 146 GC: 147, 122, 22 CC: 124, 22
<i>BARD1</i> rs1048108 (<i>Pro24Ser</i>)	F: 5'-CGGGACGATGCCGGATAA-3' R: 5'-CGGAAGGAGGAAACCGGAAGA-3'	57	AspLEI	CC: 109, 76, 46, 26, 5 CT: 122, 109, 76, 46, 26, 5 TT: 122, 109, 26, 5
<i>BARD1</i> rs2070094 (<i>Val50Met</i>)	F: 5'-ATTATTGCTCCAGCATAAGGCA-3' R: 5'-GGAAAAGTAAACAGCTTGACTATATGCA-3'	53	Zsp21	GG: 112 GA: 112, 90, 22 AA: 90, 22.
<i>BRIP1</i> rs4986764 (<i>C>T</i>)	F: 5'-AAGTGACCTCTTTAAAGTACAGTAGC-3' R: 5'-TTAGGACACTGTAGTTCCTGGA-3'	54	AluI	CC: 121 CT: 121, 97, 24 TT: 97, 24

CC значительно чаще встречались в контрольной группе (59%) по сравнению с опытной (28.6%, $p=0.002$) и с группой риска (26.1%, $p=0.004$), в то время как для частоты гетерозигот CT наблюдалась противоположная картина: 41% против 61.9% ($p=0.002$) и 65.2% ($p=0.04$) соответственно. Следует отметить, что минорные гомозиготы TT среди здоровых добровольцев обнаружены не были. Аллель T достоверно реже определяли в контрольной группе (20%) по сравнению с опытной (40.4%, $p=0.003$) и группой риска (41.3%, $p=0.002$), следовательно его можно рассматривать в качестве генетического маркера предрасположенности к новообразованиям органа зрения (УМ: ОШ=2.667; 95%ДИ 1.417-5.020; стационарный невус: ОШ=2.780; 95%ДИ 1.478-5.227).

Согласно данным некоторых исследователей, полиморфизм rs4986764 *BRIP1* связан со снижением риска развития рака шейки матки у европейцев и китайцев ($p<0.05$) [10]. В единственном исследовании показано, что экстремально редкий минорный вариант в гене *BRIP1* (rs374334794) ассоциирован с риском развития как кожной, так и увеальной меланомы [12], иные работы по ассоциации гена *BRIP1* с УМ отсутствуют.

В настоящее время имеется гораздо больше публикаций, посвященных гену *BARD1*. Так, выявлена ассоциативная связь полиморфизмов rs1048108 и rs2229571 гена *BARD1* с РМЖ и нейробластомой [7,8,13]. В рамках данного исследования анализ распределения генотипов по полиморфизму rs1048108 гена *BARD1* показал значимо более высокую встречаемость минорного генотипа TT среди пациентов с УМ (31%, $p=0.0001$) и со стационарным невусом (21.7%, $p=0.012$) по сравнению с контрольной группой (4.9%), в то время как в контрольной группе преобладает гетерозиготный генотип. Обращает на себя внимание низкая частота (7.1%) гетерозигот в опытной группе. Возможно, генотип TT служит маркером предрасположенности к новообразованиям органа зрения и особенно к УМ (ОШ=8.536; 95%ДИ 3.159-23.069), а генотип CT — специфическим маркером протекции по отношению к УМ и прогрессирующему невусу хориоидеи (ОШ=0.064; 95%ДИ 0.027-0.152). Частоты аллелей в группах достоверно не различались. Ранее была показана значимая связь наличия циркулирующей опухолевой ДНК (цодНК) (онкогены GNAQ/GNA11) и генотипа CC гена *ABCB1* с риском развития начальной меланомы хориоидеи и невусов хориоидеи [14]. Полученные нами результаты дополняют воз-

можную дифференциально-диагностическую панель для пациентов данной категории.

Изучение распределения генотипов по полиморфизму *rs2229571 BARD1* выявило достоверно более высокую частоту гомозигот *GG* в опытной группе (21.4%) по сравнению с контрольной 1.6% ($p=0.0001$). В группе риска встречаемость данного генотипа также была повышена, но различия не достигали статистической значимости (13%, $p=0.091$). Среди здоровых добровольцев преобладали гетерозиготы (63.9%). Полученные результаты свидетельствуют об ассоциации гомозиготного генотипа *GG* с развитием УМ и прогрессирующего невуса хориоидеи (ОШ=13.025; 95%ДИ 2.964-57.242). Частоты аллелей в исследованных группах не различались.

Анализ частот генотипов и аллелей по полиморфизму *rs2070094 BARD1* показал, что в контрольной группе преобладают гомозиготы *GG* (83.6%) при полном отсутствии минорных гомозигот *AA*; значимо различались и частоты аллелей в группах пациентов по сравнению с контролем ($p=0.01$ и $p=0.032$ соответственно). Таким образом, можно полагать, что наличие аллеля *A* в генотипе является маркером предрасположенности к внутриглазным новообразованиям (УМ: ОШ=7.048; 95%ДИ 3.081-16.126;

стационарный невус: ОШ=6.192; 95%ДИ 2.697-14.217).

Полученные нами данные, несмотря на отсутствие в литературе сведений об ассоциации исследуемых полиморфизмов гена *BARD1* и риска развития УМ, согласуются с результатами работы [15]. Исследователи показали, что *BAP1*-ассоциированные белковые комплексы (*FOXK2*, *ASXL1*, *BARD1*, *BRCA1*) могут быть непосредственно связаны с патогенезом УМ.

Таким образом, нами установлено, что минорные аллели полиморфных локусов *BRIP1 rs4986764* и *BARD1 rs2070094*, а также гомозиготность по аллелю *T* локуса *BARD1 rs1048108* являются общими генетическими маркерами предрасположенности к УМ, прогрессирующему и стационарному невусу хориоидеи, в то время как гомозиготный генотип *GG* по полиморфизму *BARD1 rs2229571* — специфическим маркером предрасположенности к УМ и прогрессирующему невусу хориоидеи. Также нами обнаружен специфический маркер протекции по отношению к УМ и прогрессирующему невусу хориоидеи, которым выступает гетерозиготность по полиморфному локусу *BARD1 rs1048108*.

Результаты исследования свидетельствуют о целесообразности изучения полиморфизмов

Таблица 2. Частоты (%) генотипов и аллелей полиморфизмов *rs1048108*, *rs2229571*, *rs2070094* гена *BARD1* и полиморфизма *rs4986764* гена *BRIP1* в исследуемых группах

Полиморфизм	Генотипы и аллели	Опытная группа (N=42)	Группа риска (N=23)	Контрольная группа (N=61)
<i>BRIP1 rs4986764 (C>T)</i>	CC	28.6*	26.1*	59.0
	CT	61.9*	65.2*	41.0
	TT	9.5*	8.7*	0.0
	C	59.6	58.7	79.5
	T	40.4*	41.3*	20.5
<i>BARD1 rs1048108 (Pro24Ser)</i>	CC	61.9	47.8	41.0
	CT	7.1*	30.4*	54.1
	TT	31.0*	21.7*	4.9
	C	65.5	63.0	68.1
	T	34.5	37.0	31.9
<i>BARD1 rs2229571 (Arg378Ser)</i>	CC	38.1	30.4	34.4
	CG	40.5*	56.5	63.9
	GG	21.4*	13.0	1.6
	C	58.4	58.8	66.4
	G	41.6	41.2	33.6
<i>BARD1 rs2070094 (Val50Met)</i>	GG	31.0*	39.1*	83.6
	GA	61.9*	52.5*	16.4
	AA	7.1	8.7	0.0
	G	62.0	65.4	91.8
	A	38.0*	34.6*	8.2

Примечание. * $p \leq 0.05$ по сравнению с контрольной группой.

гена *BARD1* (*rs1048108*, *rs2229571*, *rs2070094*) и гена *BRIP1* (*rs4986764*) у пациентов с УМ и прогрессирующим невусом хориоидеи. Полученные данные могут быть использованы при формировании групп риска, профилактике УМ, а также в дифференциальной диагностике внутриглазных новообразований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гришина Е.Е., Лернер М.Ю., Гемджян Э.Г. Эпидемиология увеальной меланомы в г. Москве // Альманах клин. мед. 2017. Т. 45, № 4. С. 321-325. doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-4-321-325
2. Tsygankov A.Iu., Amiryan A.G., Saakyan S.V. The role of pathologic and molecular genetic factors in development of uveal melanoma extrabulbar growth // *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016. Vol. 8, N 2. P. 76. doi: 10.17691/stm2016.8.2.11
3. Cunha Rola A., Taktak A., Eleuteri A., Kalirai H., Heimann H., Hussain R., Bonnett L.J., Hill C.J., Traynor M., Jager M.J., Marinkovic M., Luyten G.P.M., Dogrusöz M., Kilic E., de Klein A., Smit K., van Poppele N.M., Damato B.E., Afshar A., Guthoff R.F., Scheef B.O., Kakkassery V., Saakyan S., Tsygankov A., Mosci C., Ligorio P., Viaggi S., Le Guin C.H.D., Bornfeld N., Bechrakis N.E., Coupland S.E. Multicenter external validation of the liverpool uveal melanoma prognosticator online: An OOG Collaborative Study // *Cancers (Basel)*. 2020. Vol. 12, N 2. ID 477. doi: 10.3390/cancers12020477
4. Ewens K.G., Kanetsky P.A., Richards-Yutz J., Al-Dahmash S., De Luca M.C., Bianciotto C.G., Shields C.L., Ganguly A. Genomic profile of 320 uveal melanoma cases: chromosome 8p-loss and metastatic outcome // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013. Vol. 54, N 8. P. 5721-5729. doi: 10.1167/iovs.13-12195
5. Kalirai H., Tsygankov A.I., Thornton S., Saakyan S.V., Coupland S.E. Genetics of uveal melanoma // *Intraocular tumors* / Ed. V.Khetan. Singapore, 2020. P. 81-91. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0395-5_7
6. Norquist B.M., Harrell M.I., Brady M.F., Walsh T., Lee M.K., Gulsuner S., Bernardis S.S., Casadei S., Yi Q., Burger R.A., Chan J.K., Davidson S.A., Mannel R.S., DiSilvestro P.A., Lankes H.A., Ramirez N.C., King M.C., Swisher E.M., Birrer M.J. Inherited mutations in women with ovarian carcinoma // *JAMA Oncol.* 2016. Vol. 2, N 4. P. 482-490. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.5495
7. Liu H., Zhang H., Sun X., He Y., Li J., Guo X. A cross-sectional study of associations between nonsynonymous mutations of the *BARD1* gene and breast cancer in Han Chinese women // *Asia Pac. J. Public Health.* 2013. Vol. 25, N 4, Suppl. P. 8S-14S. doi: 10.1177/1010539513497220
8. Shi J., Yu Y., Jin Y., Lu J., Zhang J., Wang H., Han W., Chu P., Tai J., Chen F., Ren H., Guo Y., Ni X. Functional Polymorphisms in *BARD1* association with neuroblastoma in a regional Han Chinese population // *J. Cancer.* 2019. Vol. 10, N 10. P. 2153-2160. doi: 10.7150/jca.26719
9. Cantor S.B., Guillemette S. Hereditary breast cancer and the *BRCA1*-associated *FANCF/BACH1/BRIP1* // *Future Oncol.* 2011. Vol. 7, N 2. P. 253-261. doi: 10.2217/fon.10.191
10. Liu D., Zheng Y., Wang M., Deng Y., Lin S., Zhou L., Yang P., Dai C., Xu P., Hao Q., Song D., Kang H., Dai Z. Four common polymorphisms of *BRIP1* (*rs2048718*, *rs4988344*, *rs4986764*, and *rs6504074*) and cancer risk: evidence from 13,716 cancer patients and 15,590 cancer-free controls // *Aging (Albany NY)*. 2018. Vol. 10, N 2. P. 266-277. doi: 10.18632/aging.101388
11. Branisteanu D.C., Bogdanici C.M., Branisteanu D.E., Maranduca M.A., Zemba M., Balta F., Branisteanu C.I., Moraru A.D. Uveal melanoma diagnosis and current treatment options (Review) // *Exp. Ther. Med.* 2021. Vol. 22, N 6. P. 1428. doi: 10.3892/etm.2021.10863
12. Tuominen R., Engström P.G., Helgadottir H., Eriksson H., Unneberg P., Kjellqvist S., Yang M., Lindén D., Edsgård D., Hansson J., Höiom V. The role of germline alterations in the DNA damage response genes *BRIP1* and *BRCA2* in melanoma susceptibility // *Genes Chromosomes Cancer.* 2016. Vol. 55, N 7. P. 601-611. doi: 10.1002/gcc.22363
13. Huo X., Hu Z., Zhai X., Wang Y., Wang S., Wang X., Qin J., Chen W., Jin G., Liu J., Gao J., Wei Q., Wang X., Shen H. Common non-synonymous polymorphisms in the *BRCA1* Associated RING Domain (*BARD1*) gene are associated with breast cancer susceptibility: a case-control analysis // *Breast Cancer Res. Treat.* 2007. Vol. 102, N 3. P. 329-337. doi: 10.1007/s10549-006-9332-7
14. Саакян С.В., Цыганков А.Ю., Мякошина Е.Б., Бурденный А.М., Логинов В.И., Хлгатын М.Р. Ассоциация клиничко-инструментальных и молекулярно-генетических предикторов с риском развития и опухолевой прогрессии меланоцитарных внутриглазных новообразований // *Рос. офтальмол. журн.* 2020. Т. 13, № 4. С. 24-32. doi: 10.21516/2072-0076-2020-13-4-24-32
15. Sharma A., Biswas A., Liu H., Sen S., Paruchuri A., Katsonis P., Lichtarge O., Chand Dakal T., Maulik U., Gromiha M.M., Bandyopadhyay S., Ludwig M., Holz F.G., Loeffler K.U., Herwig-Carl M.C. Mutational landscape of the *BAP1* locus reveals an intrinsic control to regulate the miRNA network and the binding of protein complexes in uveal melanoma // *Cancers (Basel)*. 2019. Vol. 11, N 10. ID 1600. doi: 10.3390/cancers11101600