

Клинико-генетическая гетерогенность меланомы кожи

Л.Н. ЛЮБЧЕНКО¹, П.А. ЧЕРНЕНКО¹, С.А. ХАТЫРЕВ¹, М.А. ЕМЕЛЬЯНОВА²,
Т.В. НАСЕДКИНА², Е.Е. ПИСАРЕВА³, С.П. КОВАЛЕНКО³, В.А. ШАМАНИН⁴

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, Москва

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва

³Институт молекулярной биологии и биофизики Сибирского Отделения РАМН, Новосибирск

⁴ООО «БиоЛинк», Новосибирск

Меланома кожи (МК) является этиологически гетерогенным заболеванием, развитие которого связано с воздействием как средовых, так и генетических факторов. С использованием сегрегационного анализа и сравнительной геномной гибридизации были выделены наследственные онкологические синдромы, на фоне которых развивается МК, и картированы гены, вовлеченные в наследственный канцерогенез МК. В молекулярный патогенез спорадической МК вовлечены онкогены и гены-супрессоры, входящие в состав различных сигнальных каскадов. Гиперактивация сигнального пути RAS-RAF-MEK-MAPK наблюдается до 90% случаев МК человека, при этом соматические мутации в гене *BRAF* являются определяющими в 50-70% случаев МК.

Ключевые слова: меланома кожи, наследственные онкологические синдромы, соматические мутации гена *BRAF*.

Меланома кожи (МК) является одной из наиболее агрессивных форм солидных злокачественных новообразований. Во всем мире отмечается рост заболеваемости - в 2011 году в развитых странах было диагностировано 166 900 случаев МК [1], а средняя продолжительность жизни при распространенных стадиях не превышает 3-11 месяцев [2].

Результаты фундаментальных исследований, посвященных МК, кардинально изменили понимание молекулярно-генетических механизмов развития заболевания. Полногеномный скрининг показал зависимость последовательных генетических событий - изменений протоонкогенов, генов-супрессоров и микро- (мк) РНК генов от типа и анатомической локализации меланомы, а также определил их ключевую роль в дифференцировке и прогрессии, что позволяет рассматривать структурные и функциональные перестройки в качестве диагностических и/или прогностических маркеров [3, 4]. В результате, классификационная система, основанная на клинических и гистологических критериях первичной опухоли, в настоящее время дополнена молекулярными характеристиками, составляющими диагностическую панель для ДНК-тестирования

с целью индивидуализации лечебных подходов.

Генетические нарушения в процессе злокачественной трансформации представлены амплификацией, делециями, повышением или снижением функциональной регуляции онкогенов или генов-супрессоров. При изучении экспрессионного профиля с использованием биочиповых технологий показано, что 2 602 гена имеют различный уровень экспрессии в неизмененной ткани, нормальных и диспластических невусах, первичной и метастатической меланоме [5], включая гены *BRAF*, *NRAS*, *PERK* (при доброкачественных невусах и МК), *CDKN2A*, *CDK4*, *CCND1*, *AKT* (задействованных в патогенезе диспластических невусов и МК), *KIT*, *ERBB4*, *RB*, *TP53*, *CDH1* (на стадии радиального распространения меланомы), *SPP1*, *CXCL1*, *RAB32*, *CDH1*, *MMP2* (при прорастании опухоли в нижние слои кожи), *MET*, *PTEN*, *APAF1* (при метастатической меланоме).

МК является этиологически гетерогенным заболеванием, его развитие связано с воздействием как средовых, так и генетических факторов. Спорадическая форма МК составляет около 90% всех случаев, тогда как генетически детерминированная или наследственная меланома наблюдается в 5-10% случаев [6].

НАСЛЕДСТВЕННАЯ МЕЛАНОМА КОЖИ

По данным литературы частота МК у близких родственников больных составляет от 8 до 14%. На основании проведенных многочисленных исследований были установлены основные клинические критерии семейной МК [7]:

- ранний возраст возникновения заболевания;
- наличие случаев МК в семейном анамнезе;
- наличие большого количества пигментных невусов на коже;
- первично-множественные очаги поражения МК.

С использованием сегрегационного анализа и сравнительной геномной гибридизации были выделены наследственные онкологические синдромы, на фоне которых развивается МК, и картированы гены, вовлеченные в наследственный канцерогенез МК, такие как *CDKN2A*, *CDK4*, *MC1R*, *PTEN*, *XP* и др. (Табл. 1).

Ген *CDKN2A* (p16/INK4A/CDKN2A/Multi Tumor-Suppressor MTS1/cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) (9p21) (OMIM № 600160). Превалирующее значение в развитии наследственной формы МК принадлежит гену *CDKN2A*, мутации которого наблюдаются, по данным разных авторов, в 20-50% случаев, особенно в семьях с тремя и более случаями МК [9, 10]. МК, ассоциированная с мутациями в гене *CDKN2A*, имеет аутосомно-доминантный тип наследования. Вероятность передачи генетического дефекта в соответствии с законами Менделя составляет 50%. Спектр злокачественных новообразований, наблюдающийся в семьях носителей мутаций гена *CDKN2A*, включает семейную форму МК, рак поджелудочной железы, увеальную меланому, астроцитому и, по некоторым данным, рак молочной железы. Стоит отметить, что мутации в гене *CDKN2A* обнаруживают также и при спорадической МК, однако их частота не превышает 1-2% [11]. Несмотря на наличие гомологии между соматическими и герминальными мутациями гена *CDKN2A* [12], были отмечены популяционные различия по частоте и спектру герминальных мутаций [13]. Goldstein A.M. с соавторами [14] при сравнительном анализе результатов исследований в различных странах мира с учетом количества семей, в каждой из которых было выявлено ≥ 3 больных МК, показали, что мутации гена *CDKN2A* были диагностированы в среднем в 39% семей. Частота мутаций варьировала от 20% в Австралии до 45% в Северной Америке и 57% в Европе, тогда как по данным исследований, проведенных в Польше и Латвии, функционально значимых гер-

минальных мутаций в гене *CDKN2A* выявлено не было [15, 16]. По данным работы, выполненной в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН частота герминальных мутаций в гене *CDKN2A* у больных МК с онкологически отягощенным анамнезом составляет 8,1%, при этом аномальное метилирование промоторного района гена *CDKN2A* отмечено в 24,3% случаев [17].

СПОРАДИЧЕСКАЯ МЕЛАНОМА КОЖИ

В молекулярный патогенез спорадической МК вовлечены онкогены и гены-супрессоры, входящие в состав различных сигнальных каскадов (Рис. 1). Наиболее изученным при МК является MAPK-ERK (mitogen-activated protein kinase-extracellular-related kinase) - путь сигнальной трансдукции или центральный пролиферативный путь, регулирующий клеточное деление, дифференцировку и метастазирование [18, 19]. Гиперактивация сигнального пути RAS-RAF-MEK-MAPK наблюдается до 90% случаев МК человека [20], при этом наиболее часто определяются мутации в генах *BRAF* (50-70%) и *NRAS* (15-30%). Другие пути, регуляция которых нарушена при МК, включают гены *KIT*, частота мутаций которого при МК колеблется от 2 до 45%, и *PI3K* (type I phosphatidylinositol-3-kinase), вовлеченных в синтез и метаболизм белка, клеточную дифференцировку и апоптоз, а также ген *TP53* – инициирующий репарацию ДНК и подавляющий неконтролируемый клеточный рост посредством апоптоза.

Показано, что высокий риск развития МК и прогрессия заболевания ассоциированы с герминальными мутациями в генах, кодирующих *CDKN2A*, *CDK4* и *MC1R*, а также с соматическими

Рисунок 1. Основные сигнальные пути, задействованные в канцерогенезе МК.

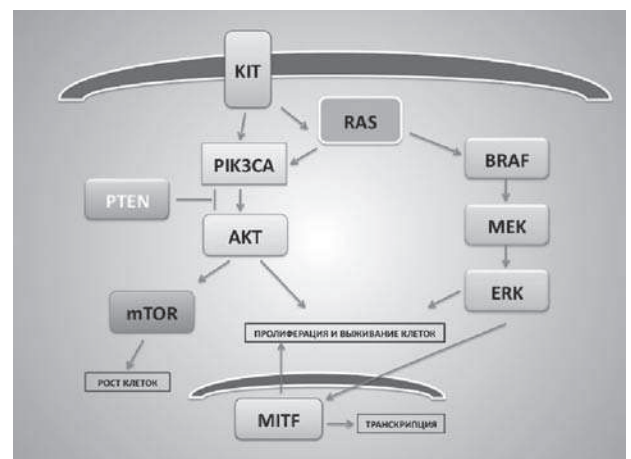


Таблица 1. МК в составе наследственных онкологических синдромов [8].

Синдром	Ген и хромосомная локализация	Описание
Семейная меланома (Familial malignant melanoma). Семейная меланома с наличием/отсутствием диспластических невусов (Включает Синдром диспластических невусов - Dysplastic Nevus Syndrome, Синдром множественных диспластических невусов, ассоциированный с меланомой - Familial Atypical Multiple Mole Melanoma syndrome, а также Синдром Меланома-Астроцитомы -Melanoma–Astrocytoma Syndrome) Номера OMIM: 155600; 155601; 123829; 155755. Тип наследования: Аутосомно-доминантный.	Ген CDKN2A/p16 (9p21). Ген CMM1 (1p36). Ген CDK4 (12q14).	Наличие первично-множественной МК в анамнезе Наличие 2 и более близких родственников с диагнозом МК Наличие рака поджелудочной железы Наличие меланомы и множественных атипичных невусов в личном и семейном анамнезе Известны, по меньшей мере, три гена, ассоциированных с наследственной МК. В семьях с мутациями в этих генах могут быть диагностированы множественные диспластические невусы. Ассоциация данных невусов и семейной меланомы носит название Синдром множественных диспластических невусов, ассоциированный с меланомой (FAMMM-синдром). В семьях,отягощенных наследственной меланомой, также повышен риск развития рака поджелудочной железы. У лиц с Синдромом меланома-астроцитомы наблюдаются структурно-функциональные перестройки в гене CDKN2A, в связи с чем повышен риск развития меланомы и астроцитомы.
Синдром Ли-Фраумени (Li-Fraumeni Syndrome) Номер OMIM: 151623. Тип наследования: Аутосомно-доминантный.	Ген TP53 Примерно у 50% семей с синдромом Ли-Фраумени выявляют мутации в гене TP53 (17p13.1). Большинство мутаций локализуется в 5-8 экзонах гена.	Ассоциирован с развитием остеогенных и мягкотканых сарком (обычно диагностируемых в возрасте до 45 лет), рака молочной железы, меланомы, лейкоза, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, опухоли головного мозга и аденокарциномы рака. Повышен риск возникновения первично-множественных злокачественных новообразований Риск развития МК не определен.
Семейная ретинобластома (Familial Retinoblastoma) Номер OMIM: 180200. Тип наследования: Аутосомно-доминантный.	Ген RB1 Ген RB1 (13q14) состоит из 27 экзонов. Ген RB1 функционирует как регулятор клеточного роста.	Ретинобластома - злокачественная опухоль сетчатки, развивающаяся преимущественно у детей в возрасте до 5 лет Существуют две формы ретинобластомы: односторонняя и двусторонняя. Двусторонняя форма чаще всего носит наследственный характер. Лица с мутациями в гене RB1 имеют предрасположенность к развитию ретинобластомы, а также повышенный риск развития с возрастом других видов опухолей: остеосаркомы, опухолей головного мозга, рака молочной железы и лейкоза. Риск развития меланомы повышен в 50 раз по сравнению с общей популяцией.
Синдром Коудена -синдром множественных гамартром (Cowden Syndrome - Gingival Multiple Hamartoma Syndrome) Номер OMIM: 158350. Тип наследования: Аутосомно-доминантный.	Ген PTEN (10q23) - ген-супрессор опухолевого роста, который кодирует фосфатазу, регулирующую активацию серин/треонин киназ AKT1/2/3 - основных регуляторов клеточной пролиферации.	Синдром Коудена - это редкое аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся множественными гамартомами. У 30% женщин с синдромом Коудена выявляется рак молочной железы. Кроме того, отмечено возникновение других злокачественных новообразований: меланомы, рака щитовидной железы, рака эндометрия и др.

мутациями в протоонкогенах (*BRAF*, *NRAS* и *KIT*) и генах-супрессорах *CDKN2A*, *TP53* и *PTEN* (Табл. 2).

Ген ***BRAF* (V-RAF MURINE SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG B1)**

(**OMIM № 164757**) (**7q34**) был идентифицирован в 1992 году как протоонкоген [31], относится к семейству *RAF* генов (*A-RAF1*, *B-RAF* *RAF1*).

Ген ***BRAF*** расположен на длинном плече 7-ой хромосомы, состоит из 18 экзонов, размером около 190 kb и кодирует серин-треониновую киназу, являющуюся ключевым фактором сигнального пути *RAS-RAF-MEK-MAPK*, активированного при многих типах злокачественных новообразований [21], посредством которого участвует в

Таблица 1. Окончание

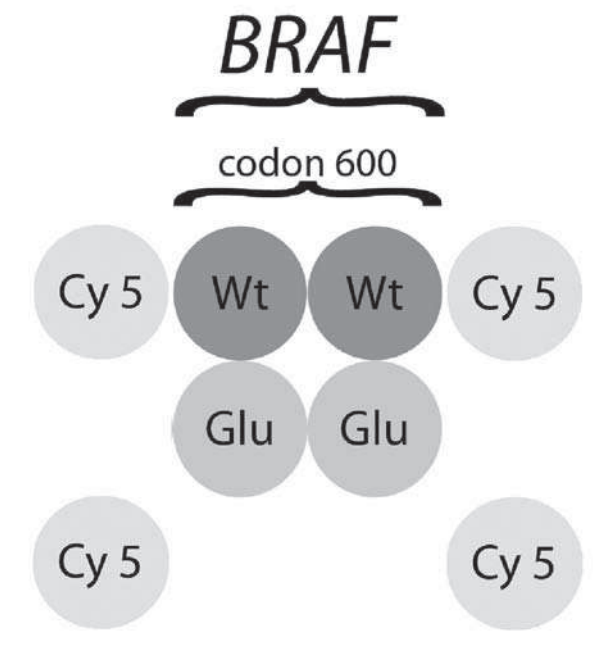
Синдром	Ген и хромосомная локализация	Описание
Пигментная ксеродерма (Xeroderma pigmentosum) и группы Номера OMIM: 278700 (Ген ХРА в группе ХР-А); 133510 (Ген ERCC3 в группе ХР-В); 278720 (Ген ХРС в группе ХР-С); 278730 (Ген ERCC2 в группе ХР-Д); 278740 (Ген ХРЕ в группе ХР-Е); 278760 (ERCC4 в группе ХР-Ф); 278780 (Ген ERCC5 в группе ХР-Г). Тип наследования: Аутосомно-рецессивный.	Гены ХР, отвечающие за репарацию повреждений ДНК, индуцированных УФ-облучением, представляют собой генетически гетерогенную группу. ХР-А (9q34.1); ХР-В (2q21); ХР-С (3p25.1); ХР-Д (19q13.2); ХР-Е (11p12–p11); ХР-Ф (16p13.2–p13.1) и ХР-Г (13q32–q33).	Пигментная ксеродерма - гетерогенная группа редких наследственных заболеваний, обусловленных нарушениями репарации повреждений ДНК, индуцированных УФ-облучением. Характерны повышенная чувствительность к солнечному свету, фотофобия, атипичная пигментация, шелушение, трещины, изъязвление, очаги атрофии, возможно развитие фотодерматита, солнечного кератоза и кератоакантом. Лица с данным заболеванием имеют высокий риск развития злокачественных новообразований кожи, включая меланому - риск повышен в 1000 раз по сравнению с общей популяцией. Также высок риск развития лейкоза, опухолей головного мозга, рака желудка, рака легких, рака молочной железы и рака матки.
Синдром Вернера – Прогерия взрослых (Werner syndrome - “Adult Progeria”) Номер OMIM: 277700. Тип наследования: Аутосомно-рецессивный.	Ген WRN (8p12–p11.2) состоит из 35 экзонов и кодирует белок, состоящий из 1432 аминокислот.	Синдром Вернера - редкое наследственное аутосомно-рецессивное заболевание. Проявляется преждевременным старением кожи, поражением нервной, эндокринной, костной и других систем организма, а также увеличением риска развития злокачественных новообразований, в том числе меланомы, остеосаркомы, других видов сарком и рака щитовидной железы.
Синдром Ваарденбурга (Waardenburg syndrome, WS) Номер OMIM: 193500 (Ген PAX3 в группе WS1,WS3); 277580 (Ген EDNRB в группе WS4A); 613265 (Ген EDN3 в группе WS4B); 613266 (Ген SOX10 в группе WS4C). Тип наследования: Аутосомно-доминантный.	Гены PAX3 (2q36.1); EDNRB (endothelin receptor type B) (13q22.3); EDN3 (endothelin-3) (20q13.32); SOX10 (22q13.1).	Синдром Ваарденбурга – группа генетических заболеваний, характеризующихся сочетанием врожденного тяжелого нарушения слуха по нейросенсорному типу со своеобразным строением лица, связанным с телекантом, смещением слезных точек, а также нарушением пигментации радужной оболочки глаз, волос и кожных покровов. Высокие уровни экспрессии генов PAX3, EDNRB, EDN3, SOX10 наблюдаются при исследовании первичной и метастатической меланомы. Кроме того, структурно-функциональные перестройки этих генов могут быть связаны с увеличением риска заболевания меланомой, поскольку регулируют процессы дифференцировки меланоцитов.
Синдром наследственного рака молочной железы/яичников (Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome). Номер OMIM: 113705; 600185. Тип наследования: Аутосомно-доминантный.	Гены BRCA1 (17q21) и BRCA2 (13q12.3)	Синдром наследственного рака молочной железы/яичников ассоциирован с мутациями в гене <i>BRCA1</i> и/или <i>BRCA2</i>. Женщины-носительницы мутаций имеют высокий риск развития рака молочной железы и рака яичников, а мужчины – рака грудной железы и рака предстательной железы. Кроме того, повышен риск развития меланомы, особенно у лиц с мутациями в гене <i>BRCA2</i>.

регуляции процессов пролиферации и дифференцировки клеток.

В 2002 году Davies с соавторами опубликовали данные об идентификации соматических мутаций в гене *BRAF* в клеточных линиях и опухолях различной локализации [32]. Мутации были обнаружены в среднем в 8% случаев. Частота мутаций варьировала в зависимости от локализации злокачественного процесса: при папиллярном раке щитовидной железы соматические мутации были выявлены в 44,2% случаев, при раке толстой кишки — в 15%, при раке яичников — в

10%, а также более чем в половине случаев МК - в 59% клеточных линий и 75% первичных меланом [30]. В последующем было установлено, что соматические мутации гена *BRAF* являются основополагающими в 40-80% случаев МК и в 74-82% - при доброкачественных меланоцитарных невусах [33, 34, 35, 36, 37, 38], что подтверждает участие гена *BRAF* в ранних этапах трансформации меланоцитов. Активирующие мутации *BRAF* наблюдаются чаще при МК, не подверженной хроническому солнечному повреждению (59%), и гораздо реже в случае наличия хронической ин-

Рисунок 2. Схема биочипа.



соляции (11%), при акральной меланоме (23%), меланоме слизистых оболочек (11%) и практически никогда не определяются при увеальной меланоме (<1%) [39].

На сегодняшний день идентифицировано более 40 различных соматических мутаций в гене *BRAF* [39]. В подавляющем большинстве случаев МК диагностируется активирующая точечная мутация в 15 экзоне гена *BRAF*, кодирующего каталитический домен *BRAF*-белка, - мутация *BRAF*

- T1799A, приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту в 600-ом аминокислотном остатке соответствующего полипептида (V600E), частота которой составляет около 80-90% [32]. Кроме того, с частотой до 20% случаев выявляется мутация V600K, приводящая к замене валина на аспарагин [40].

В результате мутации V600E происходит нарушение процессов фосфорилирования, что в свою очередь приводит к конформационным изменениям киназного домена и повышению активности киназ в 10-480 раз по сравнению с продуктом «дикого типа» гена *BRAF*, а также конститутивной активации обеих протенкиназ MEK и MAPK [30, 32, 41].

Другие мутации – G464E, G466V, D594V - снижают каталитическую активность гена *BRAF*, повышая тем самым активацию MER-ERK сигнального пути [42].

В 2011-2012 гг. в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН было выполнено клинико-молекулярное исследование больных МК с определением мутационного статуса гена *BRAF* и его ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками и отдаленными результатами лечения.

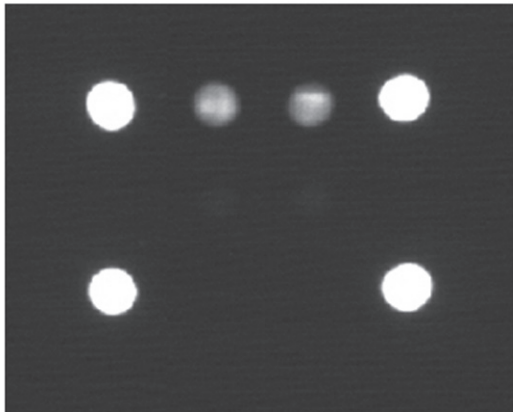
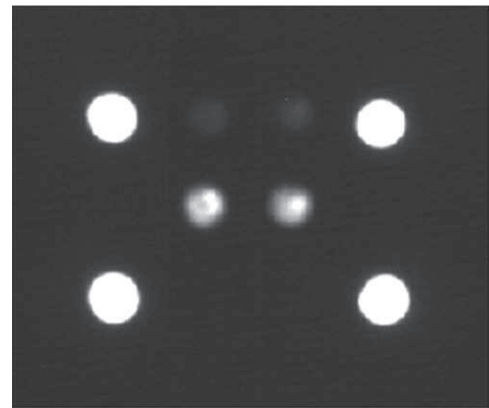
В качестве материала исследования были использованы образцы опухолевой ткани больных МК (n=102) с гистологически верифицированным диагнозом, проходивших обследование и лечение на базе НИИ клинической онкологии РОНЦ с 1989 по 2010 гг. Средний возраст манифестации заболевания составил 55 лет. Медиана наблюдения составила 21,5 месяцев (1 - 232 месяцев).

Таблица 2. Основные генетические изменения при МК [по данным 10, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30].

Группа генов	Ген	Частота изменений (%)	Характер изменений
Онкогены	<i>NRAS</i>	15-30	Активирующие мутации, наиболее частая мутация Q61R
	<i>BRAF</i>	50-70	Конститутивная активация, наиболее частая мутация V600E
	<i>c-KIT</i>	5-30	Активирующие мутации и амплификация
	<i>PIK3CA</i>	2-9	Активирующие мутации
	<i>AKT</i>	43-70	Гиперэкспрессия или активация
Супрессоры опухолевого роста	<i>CDKN2A</i>	20-50	Делеции, мутации, потеря гетерозиготности и гиперметилирование промотора
	<i>PTEN</i>	10-30	Инактивация
	<i>APAF-1</i>	40	Инактивация
	<i>TP53</i>	5-25	Мутация или инактивация
Другие	<i>Циклин D1</i>	6-44	Амплификация или гиперэкспрессия
	<i>MITF</i>	10-20	Амплификация

Рисунок 3. Гибридизационная картина образцов МК.

а) Образец не содержит мутаций (WT)

б) Образец содержит мутацию V600E в гене *BRAF*

Соматические мутации гена *BRAF* определялись в ДНК, выделенной со срезов парафиновых блоков 102 образцов опухолевой ткани больных МК. Анализ наличия мутации V600E в гене *BRAF* проводили с использованием биологических микрочипов, позволяющих определять наиболее часто встречающуюся мутацию V600E в кодоне 600 гена *BRAF* (Рис. 2, 3). Кроме того, детекция мутации гена *BRAF* (V600E) в 56 образцах была выполнена с использованием другой молекулярно-генетической методики - аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, RT-ПЦР. С использованием обоих методов (биологических микрочипов и аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени) было протестировано 56 образцов. При

этом расхождение в результатах было выявлено в 3-х образцах, соответственно результаты исследования совпали для 53 из 56 образцов (94,6%) (Рис. 4, 5). Образцы, по которым было выявлено расхождение результатов, были повторно исследованы методом биологических микрочипов с выделением ДНК и последующим ресеквенированием. В спорных образцах мутация V600E гена *BRAF* была повторно подтверждена, что свидетельствует о высокой специфичности и чувствительности метода биочипов. Расхождение результатов может быть связано с различной чувствительностью методик, а также с генетической гетерогенностью самой опухолевой ткани, что в свою очередь было продемонстрировано в работе Yancovitz M. с соавторами (2012) на боль-

Рисунок 4. Секвенирование образцов МК.

Сиквенс образца дикого типа

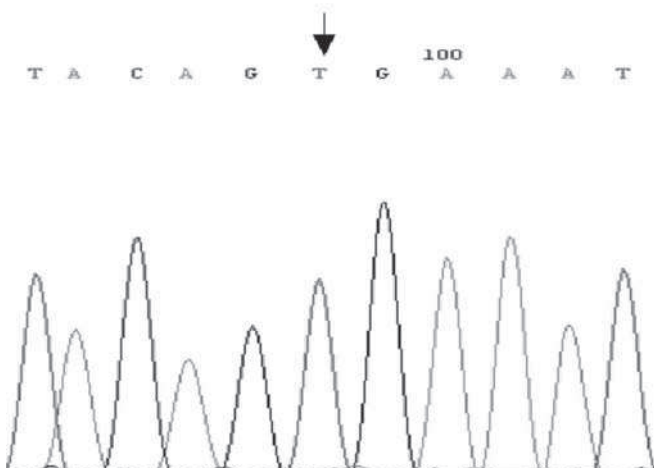
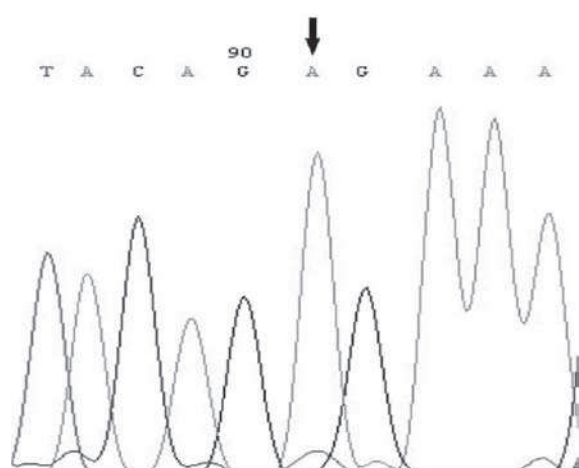
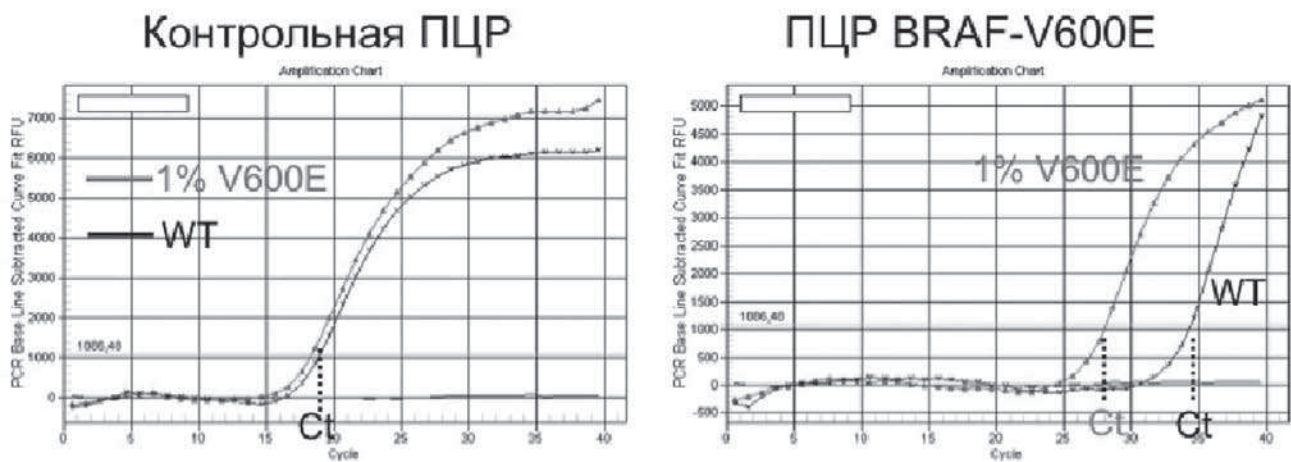
Сиквенс образца с мутацией V600E в гене *BRAF*

Рисунок 5. Детекция мутации V600E гена *BRAF* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени.

10 нг ДНК в реакцию

WT – ДНК человека без мутации *BRAF*

Положительный стандарт (красная линия) – нормальная ДНК человека без мутации *BRAF* с добавлением 1% ДНК-копий *BRAF* V600E.

Контроль без ДНК (вода) – голубая линия. Уровень фона – зеленая линия.

шом клиническом материале МК (112 опухолевых образцов от 73 больных МК) [43].

Метод детекции соматической мутации V600E гена *BRAF* с использованием биочипов был валидирован в Лаборатории молекулярной диагностики (руководитель лаборатории – Professor Dr. Dieter Zimmermann) Института клинической патологии (директор – Professor and Chairman Holger Moch) Университетского госпиталя г. Цюриха, Швейцария (Institute of Surgical Pathology at the University Hospital in Zürich, Switzerland) путем автоматического секвенирования 15 экзона гена *BRAF*. Расхождения результатов выявлено не было, что подтверждает 100%-ную чувствительность и специфичность обеих методик.

Для выявления клиничко-молекулярных ассоциаций была выполнена статистическая обработка данных с использованием программы GraphPad Prism v.4.0, пакета программ Statistical Package for the Social Sciences software program (version 15.0; SPSS Inc. Chicago, IL). Выживаемость была проанализирована в соответствии с методом Каплана-Мейера и сравнивалась по лог-ранг тесту.

Частота соматической мутации V600E гена *BRAF* составила 49% (50/102 пациентов), что согласуется с данными, полученными ранее в

исследованиях Brose MS, 2002; Gorden A, 2003; James MR, 2006 и др. [33, 34, 35, 36, 37, 38].

Для изучения клинических характеристик МК в зависимости от статуса гена *BRAF* больные были разделены на 2 группы: с мутацией гена *BRAF* - mt *BRAF* (n=50) и без мутации - wt *BRAF* (n=52). Возраст манифестации МК был достоверно ниже в группе пациентов с мутацией гена *BRAF* (p=0,002). Разница в возрасте больных МК, составившая 10 лет, статистически значимо зависела от мутационного статуса гена *BRAF*. При этом больных моложе 50 лет было достоверно больше в группе с наличием мутации гена *BRAF* (p=0,001), аналогичные данные были получены и в других исследованиях. В работе Liu W с соавторами было показано, что мутация гена *BRAF* V600E чаще встречается у пациентов в возрасте ≤ 50 лет по сравнению с пациентами старше 50 лет (p=0,001) [44]. В исследовании Shinozaki M с соавторами наиболее часто мутации гена *BRAF* наблюдались у больных в возрасте ≤ 60 лет (p=0,001), при этом частота мутаций превышала 50% у пациентов моложе 40 лет. Тогда как в возрастной группе пациентов 70 лет и старше частота мутаций не превышала 10% [38].

В настоящем исследовании в группе с мутацией гена *BRAF* чаще встречались женщины (p=0,1), аналогичные данные были получены в

работе Shinozaki M с соавторами ($p=0,09$) [38].

Отягощение семейного анамнеза случаями МК чаще наблюдалось в группе с мутацией гена *BRAF* ($p=0,6$), хотя в исследовании Liu W с соавторами [44] такой взаимосвязи выявлено не было ($p=0,4$). Однако эти данные не достигли статистической значимости.

При оценке размера первичной опухоли показатель T1 достоверно чаще наблюдался в группе без мутации (15,4%) по сравнению с группой *mt BRAF* (2%) ($p=0,03$), что может говорить в пользу высокой скорости удвоения *BRAF*-ассоциированной МК. В этой же группе пациентов (*mt BRAF*) достоверно чаще встречалась толщина опухоли ≥ 1 мм ($p=0,05$), что является определяющим, поскольку толщина опухоли по Бреслоу признана одним из наиболее точных прогностических факторов на ранних стадиях развития МК [45]. Наличие мутации гена *BRAF* было ассоциировано с тенденцией к более частому возникновению изъязвления по сравнению с группой *wt BRAF* ($p=0,07$), в связи с чем частота развития местных рецидивов и поражения регионарных лимфатических узлов была достоверно выше в группе больных с мутацией гена *BRAF* по сравнению с группой *wt BRAF* ($p=0,01$). Поверхностно-распространяющаяся форма МК была характерна для группы без *BRAF*-мутаций ($p=0,1$). Аналогичные данные были представлены в работе Pacheco I с соавторами [46], тогда как в исследовании Liu W с соавторами мутация V600E гена *BRAF* достоверно чаще определялась при поверхностно-распространяющейся МК ($p=0,055$) [44]. Описанные различия в клинических характеристиках МК подтверждают неблагоприятную прогностическую значимость наличия мутации гена *BRAF*.

В нашей работе не было выявлено статистически достоверного влияния мутации на локализацию первичного опухолевого очага, хотя расположение очагов на туловище было выявлено чаще при наличии мутации гена *BRAF*, а на конечностях и голове, доступных для воздействия солнечных лучей, мутация чаще отсутствовала ($p=0,6$). В работе Maldonado JL с соавторами было показано, что трансверсия T>A, связанная с мутацией V600E, не является результатом УФ-индуцированного повреждения ДНК [36]. В исследовании Bauer J с соавторами было продемонстрировано, что меланомы, ассоциированные с мутацией в гене *BRAF*, развиваются в молодом возрасте при суммарно низких дозах воздействия УФ-лучей [47]. Curtin с соавторами более детально изучили данную взаимосвязь [3]. Оказалось, что большинство образцов МК с

отсутствием хронического солнечного повреждения (средние уровни УФ-экспозиции) имели мутации в генах *BRAF* или *NRAS* (59% и 22% соответственно). Общая частота мутаций этих генов была значительно ниже в опухолях кожи с наличием хронического солнечного повреждения или расположенных на участках, не подвергающихся воздействию солнечных лучей. Это свидетельствует о том, что мутация гена *BRAF* не связана с влиянием УФ-излучения и чаще наблюдается в группе МК со средними (промежуточными) показателями солнечной экспозиции.

При оценке отдаленных результатов лечения в работе Ugurel S с соавторами было показано снижение медианы выживаемости у больных *BRAF*-ассоциированной МК — 8,0 месяцев по сравнению 11,8 месяцами у пациентов-носителей гена *BRAF* «дикого типа» ($p = 0,055$) [48]. В исследовании Shinozaki M с соавторами [49] наличие мутаций гена *BRAF* было связано со значительным снижением показателей общей выживаемости ($p=0,04$). Исследование Jovanovic B. с соавторами [50] подтвердило, что наличие *mt BRAF* и изъязвления в образцах МК значительно снижало выживаемость ($p=0,001$). Частота *BRAF*-мутаций была в два раза выше в группе пациентов с выживаемостью менее 5 лет.

В исследовании, проведенном в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН при анализе отдаленных результатов лечения больных МК в зависимости от мутационного статуса гена *BRAF* показано, что продолжительность жизни в группе пациентов с наличием мутации была ниже на 27 месяцев, чем в группе без мутации (медианы продолжительности жизни при *mt BRAF* - 40 месяцев против *wt BRAF* - 67 месяцев). Как и в представленных выше работах в нашем исследовании наличие мутации гена *BRAF* было связано с неблагоприятным прогнозом, однако полученные результаты не достигли статистической значимости ($p=0,6$).

При анализе безрецидивной и беспрогрессивной выживаемости были выявлены аналогичные показатели: наличие мутации было ассоциировано со снижением времени до развития местного рецидива и прогрессирования ($p=0,5$ и $p=0,6$ соответственно).

Полученные данные подчеркивают, что наличие мутации гена *BRAF* является прогностически неблагоприятным фактором, однако изменения только этого гена не являются ведущим фактором, предсказывающим исход заболевания, но без сомнения могут дополнять другие генетические перестройки, часто наблюдаемые при МК.

ЛИТЕРАТУРА

- 1) Woodman SE, Lazar AJ, Aldape KD, et al. New strategies in melanoma: molecular testing in advanced disease. *Clin Cancer Res*. 2012 Mar 1;18(5):1195-200. Epub 2012 Jan 24.
- 2) Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol*. 2009 Jan-Feb;27(1):3-9. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009 Jul-Aug;59(4):225-49. Epub 2009 May 27.
- 3) Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005 Nov 17;353(20):2135-47.
- 4) McCannel TA, Burgess BL, Rao NP, et al. Identification of candidate tumor oncogenes by integrative molecular analysis of choroidal melanoma fine-needle aspiration biopsy specimens. *Arch Ophthalmol*. 2010 Sep;128(9):1170-7.
- 5) Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D, et al. The gene expression signatures of melanoma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 26;102(17):6092-7. Epub 2005 Apr 15.
- 6) Berking C., Bosserhoff A.K. Malignant Melanoma // Hereditary tumors / Allgayer H., Rehder H., Fulda S. – WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KgaA, 2009 – P. 411-420
- 7) Kopf AW, Hellman LJ, Rogers GS, et al. Familial malignant melanoma. *JAMA*. 1986 Oct 10;256(14):1915-9.
- 8) Lindor NM, Greene MH. The concise handbook of family cancer syndromes. Mayo Familial Cancer Program. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Jul 15;90(14):1039-71.
- 9) Kefford RF, Newton Bishop JA, Bergman W, et al. Counseling and DNA testing for individuals perceived to be genetically predisposed to melanoma: A consensus statement of the Melanoma Genetics Consortium. *J Clin Oncol*. 1999 Oct;17(10):3245-51.
- 10) Puig S, Malvehy J, Badenas C, et al. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol*. 2005 May 1;23(13):3043-51.
- 11) Somoano B, Niendorf KB, Tsao H. Hereditary cancer syndromes of the skin. *Clin Dermatol* 2005;23 – P. 85–106
- 12) Murphy JA, Barrantes-Reynolds R, Kocherlakota R, et al. The CDKN2A database: Integrating allelic variants with evolution, structure, function, and disease association. *Hum Mutat*. 2004 Oct;24(4):296-304.
- 13) Hayward N.K. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene*. 2003 May 19;22(20) – P. 3053-62].
- 14) Goldstein A.M., Chan M., Harland M., et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents *J Med Genet* 2007;44:99–10
- 15) Debniak T, van de Wetering T, Scott R, et al. Low prevalence of CDKN2A/ARF mutations among early-onset cancers of breast, pancreas and malignant melanoma in Poland. *Eur J Cancer Prev*. 2008 Oct;17(5):389-91.
- 16) Пьянова Д., Озола А., Вейналде Р., и др. Мутации в генах восприимчивости меланомы в Латвии. Тезисы Евразийского форума по меланоме и опухолям кожи. 22-23 июля 2011 г. Стр. 31
- 17) Черненко П.А., Казубская Т.П., Михайловский А.В., и др. Генетические и эпигенетические изменения гена CDKN2A у больных меланомой кожи. Тезисы Евразийского форума по меланоме и опухолям кожи. 22-23 июля 2011 г. Стр. 28
- 18) Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med*. 2006 Jul 6;355(1):51-65.
- 19) Berger MF, Garraway LA. Applications of genomics in melanoma oncogene discovery. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Jun;23(3):397-414, vii.
- 20) Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, et al. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res* Dec;2002 8(12):3728–33.
- 21) Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):851-72
- 22) Bauer J, Curtin JA, Pinkel D, et al. Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations. *J Invest Dermatol*. 2007 Jan;127(1):179-82. Epub 2006 Aug 3.
- 23) Houben R, Becker JC, Kappel A, et al. Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. *J Carcinog*. 2004 Mar 26;3(1):6.
- 24) Stahl JM, Cheung M, Sharma A, et al. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res*. 2003 Jun 1;63(11):2881-90.
- 25) Karbowniczek M, Spittle CS, Morrison T, et al. mTOR is activated in the majority of malignant melanomas. *J Invest Dermatol*. 2008 Apr;128(4):980-7. Epub 2007 Oct 4
- 26) Curtin JA, Busam K, Pinkel D, et al. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*. 2006 Sep 10;24(26):4340-6. Epub 2006 Aug 14
- 27) Stahl JM, Sharma A, Cheung M, et al. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res*. 2004 Oct 1;64(19):7002-10
- 28) Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*. 2005 Jul 7;436(7047):117-22.
- 29) Akslen LA, Monstad SE, Larsen B, et al. Frequent mutations of the p53 gene in cutaneous melanoma of the nodular type. *Int J Cancer*. 1998 Feb 20;79(1):91-5
- 30) Kong Y, Kumar SM, Xu X. Molecular pathogenesis of sporadic melanoma and melanoma-initiating cells. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Dec;134(12):1740-9

- 31) Eychène A, Barnier JV, Apiou F, et al. Chromosomal assignment of two human B-raf(Rmil) proto-oncogene loci: B-raf-1 encoding the p94Braf/Rmil and B-raf-2, a processed pseudogene. *Oncogene*. 1992 Aug;7(8):1657-60
- 32) Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417:949–954.
- 33) Brose MS, Volpe P, Feldman M, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* Dec 1;2002 62(23):6997–7000.
- 34) Gorden A, Osman I, Gai W, et al. Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Res* Jul 15;2003 63(14):3955–7
- 35) James MR, Dumeni T, Stark MS, et al. Rapid screening of 4000 individuals for germ-line variations in the BRAF gene. *Clin Chem*. 2006 Sep;52(9):1675-8. Epub 2006 Jul 27
- 36) Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* Dec 17;2003 95(24):1878–90
- 37) Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* Jan;2003 33(1):19–20
- 38) Shinozaki M, Fujimoto A, Morton DL, et al. Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas. *Clin Cancer Res* Mar 1;2004 10(5):1753–7
- 39) Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*. 2010 Oct 14;29(41):5545-55. Epub 2010 Aug 9.
- 40) Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 1;29(10):1239-46. Epub 2011 Feb 22.
- 41) Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004; 116:855–867
- 42) Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell*. 2010 Jan 22;140(2):209-21.
- 43) Yancovitz M, Litterman A, Yoon J, et al. Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma. *PLoS One*. 2012;7(1):e29336. Epub 2012 Jan 3.
- 44) Liu W, Kelly JW, Trivett M, et al. Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF(T1799A(V600E)) mutation in primary melanoma. *J Invest Dermatol*. 2007 Apr;127(4):900-5
- 45) Elder, D.E., Van Belle, P., Elenitsas, R., et al. Neoplastic progression and prognosis in melanoma. *Semin. Cutan. Med. Surg.*, 15: 336–348, 1996.
- 46) Pacheco I, Buzea C, Tron V. Towards new therapeutic approaches for malignant melanoma. *Expert Rev Mol Med*. 2011 Nov 1;13:e33.
- 47) Bauer J, Büttner P, Murali R, et al. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011 Apr;24(2):345-51
- 48) Ugurel S, Thirumaran RK, Bloethner S, et al. B-RAF and N-RAS mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis. *PLoS One*. 2007 Feb 21;2(2):e236
- 49) Shinozaki M, O'Day SJ, Kitago M, et al. Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 1;13(7):2068-74
- 50) Jovanovic B, Kröckel D, Linden D, et al. Lack of cytoplasmic ERK activation is an independent adverse prognostic factor in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*. 2008 Nov;128(11):2696-704. Epub 2008 May 29.