

Связь клинико-морфологических особенностей и мутационного статуса гена *BRAF* в качестве прогностического фактора у больных меланомой кожи

Кит О.И., Водолажский Д.И., Ефимова И.Ю., Златник Е.Ю., Кочув С.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,
344037, г.Ростов-на-Дону, ул. 14 линия, 63, e-mail: rnoi@list.ru

Меланома кожи — злокачественное заболевание человека с высоким риском метастазирования. В странах с преимущественно белым населением меланома входит в первую десятку наиболее социально значимых категорий опухолей, как в отношении заболеваемости, так и смертности. Оценка ряда морфологических характеристик новообразования имеет существенное значение при определении прогноза течения заболевания и формирования групп риска у больных меланомой кожи. Целью настоящего исследования стало определение ассоциаций между мутационным статусом гена *BRAF* и клинико-морфологическими особенностями меланомы кожи у пациентов Юга России, проходившими плановое лечение в ФГБУ РНИОИ МЗ РФ в 2013—2015 гг. Молекулярно-генетическое исследование экзона 15 гена *BRAF* проведено методами прямого секвенирования по Сэнгеру и RT-PCR у 100 пациентов Юга России с морфологически подтвержденным диагнозом меланома кожи. Установлено, что присутствие мутаций в гене *BRAF* было достоверно связано с увеличением уровня инвазии по Кларку. Также наблюдалось статистически достоверное повышение частоты изъязвления опухоли на 54% у пациентов с наличием активирующих мутаций V600. Обнаружено, что опухоли с активирующими мутациями в гене *BRAF* чаще возникали на участках кожи, подверженных периодической солнечной инсоляции (туловище). Опухоли без мутаций в гене *BRAF* преобладали на участках кожи с хроническим солнечным облучением (голова и шея). Частота соматических мутаций V600 в гене *BRAF* составила 57% (57 из 100 пациентов). В рамках настоящего исследования в гене *BRAF* были выявлены три варианта мутаций с различными частотами встречаемости: p.V600E (88%), p.V600K (10%) и V600K601>E (2%). У пациентов моложе 50 лет частота встречаемости мутаций V600 была достоверно больше, чем в группе пациентов старше 50 лет. Также для пациентов моложе 50 лет было характерно отсутствие мутаций V600K и более высокая частота встречаемости мутаций V600E (в 1,7 раза).

Ключевые слова: меланома кожи, мутации, *BRAF*

Введение

Меланома кожи человека — исключительно агрессивная опухоль с высоким уровнем летальности и высокой склонностью к рецидивам и метастазированию. Составляя структурно не более 10% злокачественных новообразований кожи, меланома ответственна за 80% летальных случаев от онкологических заболеваний [1]. Заболеваемость меланомой составляет менее 2% от общего числа онкозаболеваний: в 2012 г. в мире зарегистрировано 232 130 случаев меланомы из 14,1 млн. вновь выявленных онкологических больных. Рост заболеваемости меланомой отмечен почти во всех странах мира и за 40 лет составил примерно 5% в год [1]. По прогнозу Всемирной организации здравоохранения, заболеваемость меланомой во всем мире в течение ближайших 10 лет вырастет на 25%. В России в 2014 г. зарегистрировано 9493 новых случая меланомы при общем числе новых онкозаболеваний 566 970 [2]. С 2008 по 2014 гг. в России абсолютный прирост заболеваемости меланомой составил 19,1% [2]. В развитие меланомы вовлечены как внешние (в частности, ультрафиолетовое облучение), так и внутренние (генетические) факторы.

В молекулярном патогенезе спорадической меланомы основную роль играют онкогены и гены-супрессо-

ры различных сигнальных каскадов. В 75% случаев меланомы кожи наблюдается гиперактивация сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK. Одним из его ключевых факторов является серин-треониновая киназа, кодируемая геном *BRAF*. Мутации в гене *BRAF* проявляются в 40—80% случаев меланомы кожи. На сегодняшний день известно около 40 соматических мутаций в гене *BRAF* [3]. В 80% случаев выявляется нуклеотидная замена T1799A в экзоне 15 *BRAF*, приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту в 600 кодоне (V600E) [4]. В 20% случаев мутации кодона 600 представлены заменой V600K, значительно реже встречаются замены V600R/D/M [5].

Оценка ряда морфологических характеристик новообразования имеет существенное значение при определении прогноза у больных меланомой кожи. Отмечается корреляция глубины инвазии опухолей по Кларку с послеоперационной выживаемостью [6]. Толщина опухоли по Бреслоу и изъязвление являются наиболее мощными прогностическими факторами в отношении выживаемости больных с локализованной I и II стадиями меланомы [7—9].

В связи с этим большой интерес представляет изучение связи клинико-морфологических особенностей меланомы кожи и мутационного статуса гена *BRAF*.

Цель настоящего исследования заключалась в определении ассоциаций между мутационным статусом гена *BRAF* и клинико-морфологическими особенностями меланомы кожи в качестве прогностического фактора у пациентов Юга России.

Материалы и методы

В исследовании участвовали 100 пациентов Юга России и Северного Кавказа: 50 мужчин в возрасте от 7 до 83 лет (медиана 56,5) и 50 женщин в возрасте от 24 до 80 лет (медиана 51) с морфологически подтвержденным диагнозом *меланома кожи*. Для молекулярно-генетического исследования использовали 3 мкм срезы парафиновых блоков меланомы (FFPE), содержащие не менее 20% опухолевых клеток. Экстракция ДНК состояла из стандартной процедуры депарафинирования в орто-ксилоле, лизиса в 2% SDS-буфере в присутствии протеиназы К и дополнительной очистки от ингибиторов на колонках QIAamp® DNA FFPE TissueKit (QIAGEN, Germany). Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) концентрацию ДНК нормализовывали до величины 2 нг/мкл. ПЦР для наработки ампликона экзона 15 гена *BRAF* проводилась с использованием пары праймеров 5'-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATGAGA-3' и 5'-AACTCAGCAGCATCTCAGGG-3'. Амплификация проводилась на программируемом термоциклере Maxy Gene Gradient (Axugen, USA) по программе, включавшей: первичную денатурацию при 95°C — 5 мин и 40 циклов в режиме: денатурация — 95°C — 15 с, отжиг — 66°C — 15 с, синтез при 72°C — 20 с и заключительная элонгация 72°C — 30 мин. Секвенирующая амплификация проводилась по стандартному протоколу с использованием набора ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit. Ver 3.1 на термоциклере Maxy Gene Gradient (Axugen, USA) по следующей программе: первичная денатурация при 96°C — 1 мин и 30 циклов в режиме денатурация — 96°C — 10 с, отжиг — 50°C — 5 с, синтез при 72°C — 4 мин [10]. Прямое секвенирование исследуемых ампликонов по методу Сэнгера проводили с использованием генетического анализатора ABI Prism 3500 («Life Technologies», USA).

Скрининг мутации V600E в гене *BRAF* в 100 исследуемых препаратах суммарной ДНК опухолей определяли параллельно методом Real-Time PCR (RT-PCR). Для этого были использованы термоциклер CFX96 Touch™ Real-Time PCR System (Bio-Rad, USA) и набор реагентов «Real-Time-PCR-BRAF-V600E» («Биолинк», Россия).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни, точного критерия Фишера и произвольных таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 с учетом поправки Бонферрони на множественность сравнений. Исследование проведено с соблюдением принципов ICH GCP.

Результаты и обсуждение

Для изучения мутационного статуса гена *BRAF* в зависимости от клинико-морфологических характеристик меланомы кожи больные были разделены на 2 группы: с наличием мутаций в гене *BRAF* — *mtBRAF* (n = 57) и без мутаций — *wtBRAF* (n = 43). В результате проведенного исследования была определена общая частота проявления активирующих мутаций V600 в гене *BRAF*, которая составила 57% (57/100 пациентов).

Статистически достоверных различий между значениями медиан возраста для пациентов групп *mtBRAF* и *wtBRAF* в нашем исследовании не выявлено ($p > 0,05$) (табл. 1, 2). Также характеристиками, статистически достоверно не связанными с наличием мутаций в гене *BRAF*, оказались: пол пациентов, гистологические варианты меланомы, наличие метастазов в лимфоузлы, клинические варианты меланомы кожи и толщина опухоли по Бреслоу ($p > 0,05$).

Клинико-морфологическими характеристиками, статистически достоверно связанными с наличием мутаций в гене *BRAF*, оказались локализация опухоли и уровень инвазии по Кларку (табл. 1, 2).

Для статистической проверки гипотез применялся анализ произвольных таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 с учетом поправки Бонферрони на множественность сравнений. В связи с этим критический уровень значимости p составил: $0,05/4 = 0,0125$ для каждой из таблиц. Следовательно, статистически значимыми остаются локализация опухоли и уровень инвазии по Кларку. Так, в группе пациентов с *mtBRAF*, IV—V уровень инвазии по Кларку наблюдался на 28% чаще, чем в группе с *wtBRAF*. Эта морфологическая характеристика признана одним из наиболее существенных прогностических факторов на ранних стадиях развития меланомы кожи [7—9, 11]. Анализируя особенности мутационного статуса гена *BRAF* в зависимости от локализации меланомы, мы обнаружили, что опухоли с активирующими мутациями в гене *BRAF* чаще возникали на участках кожи, подверженных периодической солнечной инсоляции (туловище). Тогда как опухоли с *wtBRAF* преобладали на участках кожи с хроническим солнечным облучением (голова и шея). Подобные результаты хорошо согласуются с исследованиями, проведенными ранее [1—3]. Полученные данные наглядно демонстрируют, что наличие мутаций в гене *BRAF* является прогностически неблагоприятным фактором.

Особый интерес представляет изменение структуры мутационного статуса гена *BRAF* в различных возрастных группах пациентов с меланомой кожи (рис. 1). Так, в возрастной группе до 50 лет количество пациентов с мутациями V600 (67%) статистически достоверно больше, чем в группе пациентов старше 50 лет (49%, $p = 0,0185$). Аналогичные данные были получены и в других исследованиях [13—15]. Также для группы пациентов моложе 50 лет характерно отсутствие мутаций V600K. Обращает на себя внимание факт значительного уменьшения (в 1,7 раза) мутаций V600E в возрастной группе пациентов старше 50 лет по сравнению с возрастной группой до 50 лет.

Согласно исследованию, проведенному Menzies A. et al. (2012), в группе пациентов с *mtBRAF* частота не V600E генотипов (в том числе и V600K) также возрастала с увеличением возраста. Так, не V600E мутации

встречались у <20% пациентов моложе 50 лет и у >40% пациентов старше 70 лет. Медиана возраста пациентов с мутациями V600E составила 53 года, а с V600K — 61 год [16]. В настоящем исследовании медиана возраста

Таблица 1

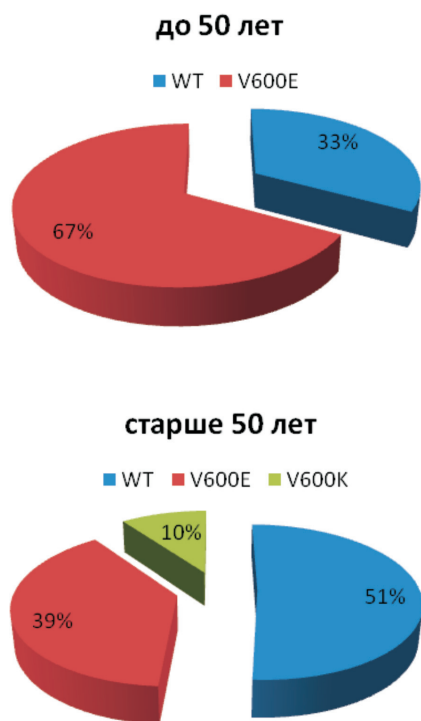
**Клинико-морфологические характеристики меланомы кожи
в зависимости от мутационного статуса гена *BRAF***

Характеристики	wt <i>BRAF</i> (n = 43) 43%		mt <i>BRAF</i> (n = 57) 57%		p
	Абс.	%	Абс.	%	
1. Пол					p = 0,5445
Женский	20	40	30	60	
Мужской	23	46	27	54	
2. Возраст					p = 0,0791
Медиана	60		50		
Диапазон	7–78		28–83		
3. Локализация					p = 0,0077
Конечности	14	47	16	53	
Туловище	9	24	28	76	
Голова и шея	12	60	8	40	
Акральная	4	67	2	33	
4. Гистологические варианты					p>0,05
Поверхностно-распространенная	5	45	6	55	
Узловая	26	44	33	56	
Эпителиоидно-клеточная	8	38	13	62	
Веретенноклеточная	3	43	4	57	
Лентигинозная	1		1		

Таблица 2

Характеристики стадирования опухоли, относящиеся к TNM классификации

Характеристики	wt <i>BRAF</i> (n = 43) 43%		mt <i>BRAF</i> (n = 57) 57%		p
	Абс.	%	Абс.	%	
1. Толщина по Бреслоу, мм					p>0,05
0,01–1,0	5	50	5	50	
1,01–2,0	13	50	13	50	
2,01–4,0	11	39	17	61	
>4	14	39	22	61	
2. Уровень инвазии по Кларку					p = 0,0088
II	10	77	3	23	
III	19	37	33	63	
IV–V	8	36	14	64	
3. Изъязвление					p = 0,0297
Присутствует	5	23	17	77	
Отсутствует	38	49	40	51	
4. Наличие метастазов в лимфоузлы					p = 0,7209
Да	3	50	3	50	
Нет	40	43	54	57	

Рис. 1. Возрастные особенности структуры мутаций гена *BRAF*.

пациентов с мутациями V600E — 49 лет, а с V600K — 73 года ($p = 0,000426$). Эти данные позволяют предположить, что этиология мутаций V600E отличается от этиологии мутаций V600K меланомы кожи [16].

При исследовании мутационного статуса гена *BRAF* в объединенной группе мужчин и женщин с меланомой кожи были обнаружены следующие мутации:

- p.V600E (88%), характеризующаяся нуклеотидной заменой Т на А в положении 1799, в результате чего происходит замена аминокислоты валина на глутаминовую кислоту в положении 600;

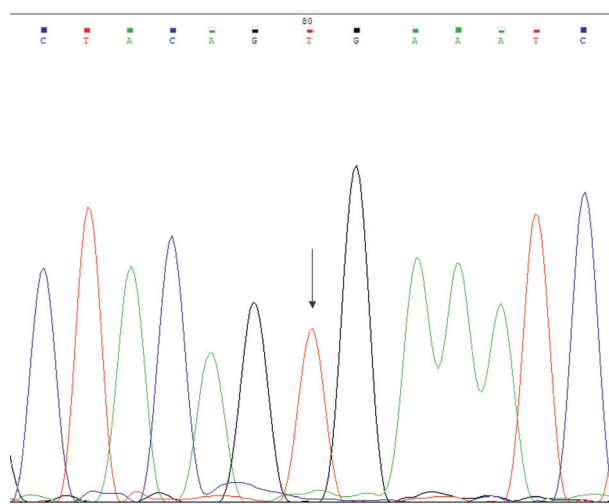
- мутация p.V600K (10% от общего количества мутаций), характеризующаяся заменой двух нуклеотидов GT на AA в положении 1798—1799 и приводящая к замене аминокислоты валина на аминокислоту аспарагин в положении 600;

- мутация p.V600 K601>E (2% от общего количества мутаций), характеризующаяся делецией трех нуклеотидов TGA в положении 1799—1801.

Необходимо отметить, что при выборе метода идентификации мутаций в экзоне 15 гена *BRAF* важно учесть, что метод Real-timePCR обладает более высокой чувствительностью, чем секвенирование по Сэнгеру. Однако, используя наборы для выявления мутации V600E методом Real-timePCR, можно пропустить другие замены в данной точке. Поэтому для выявления «не V600E» мутаций необходимо использовать или наборы, определяющие секвенирование по Сэнгеру экзона 15 гена *BRAF*. Особенно актуальным это становится для группы пациентов старше 50 лет, так как частота V600K генотипов увеличивается с возрастом. Все это является немаловажным при решении вопроса о назначении таргетной терапии больным, имеющим активирующие мутации V600.

Заключение

1. При проведении молекулярно-генетического скрининга мутаций в экзоне 15 гена *BRAF* (прямое секвенирование ДНК по Сэнгеру и RT-ПЦР) у 100 больных Юга России с меланомой кожи общая частота проявления соматических мутаций V600 в гене *BRAF* составила 57%. Нами установлены три варианта мутаций в экзоне 15 гена *BRAF*: p.V600E, p.V600K и V600K601>E. Мутация V600 K601>E впервые диагностирована у пациента популяции Юга России. Частоты проявления мутаций V600 в гене *BRAF* составили: p.V600E — 88%, p.V600K — 10% и K601>E — 2% случаев от всего количества мутаций.

Рис. 2. Сиквенс образца дикого типа гена *BRAF*. Стрелкой указана замена нуклеотида Т на А.

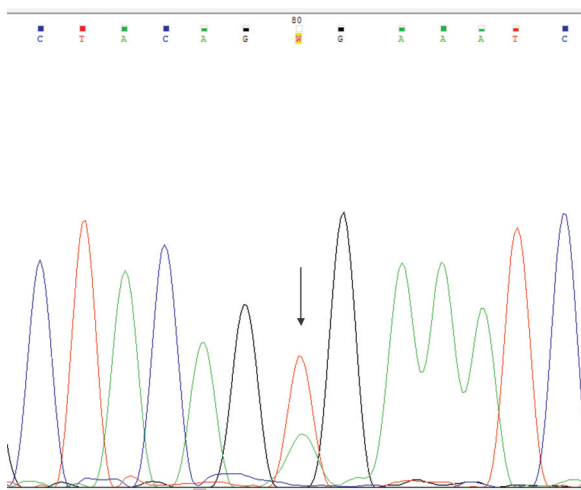


Рис. 3. Сиквенс образца с мутацией V600E в гене *BRAF*. Стрелкой указана замена нуклеотида Т на А.

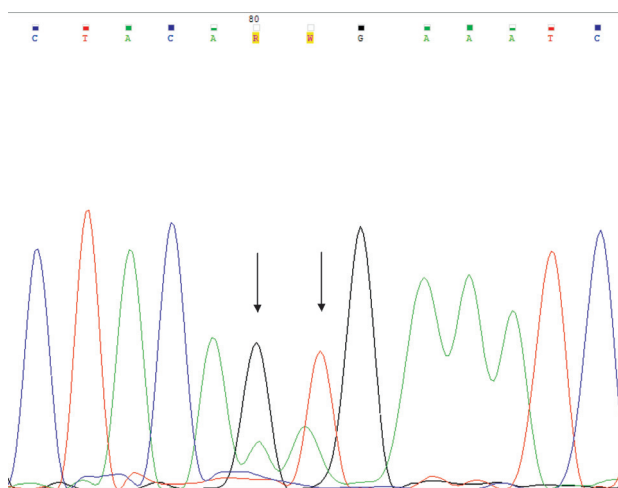


Рис. 4. Сиквенс образца с мутацией V600K в гене *BRAF*. Стрелкой указана замена нуклеотидов GT на AA.

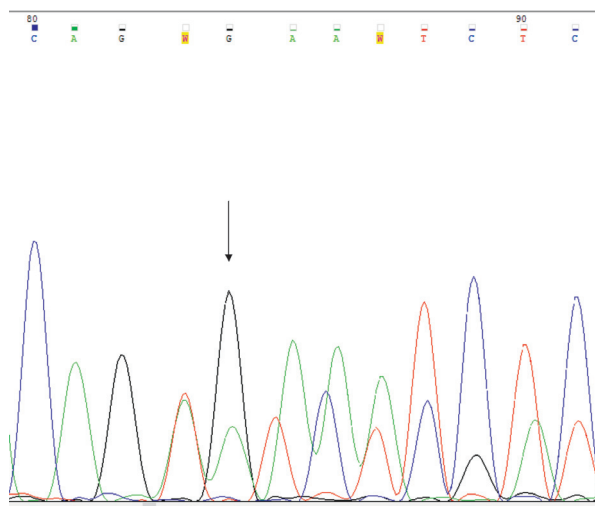


Рис. 5. Сиквенс образца с мутацией V600K601>E в гене *BRAF*. Стрелкой указано начало делеции.

2. Выявлены возрастные особенности спектра мутаций. Отмечено значительное уменьшение (в 1,7 раза) доли мутаций V600E в возрастной группе старше 50 лет по сравнению с возрастной группой до 50 лет. Также выявлено отсутствие мутаций V600K у пациентов моложе 50 лет.

3. При определении ассоциации между мутационным статусом гена *BRAF* и клинико-морфологическими особенностями меланомы кожи у пациентов Юга России и Северного Кавказа установлена достоверная связь между наличием активирующей мутации в гене *BRAF* и уровнем инвазии по Кларку. Следовательно, наличие активирующих мутаций в гене *BRAF* можно считать неблагоприятным прогностическим фактором для пациентов с меланомой кожи.

4. Обнаружено, что опухоли с активирующими мутациями в гене *BRAF* чаще возникали на участках кожи подверженных периодической солнечной инсоляции (туловище), тогда как опухоли без мутаций в гене *BRAF* преобладали на участках кожи с хроническим солнечным облучением (голова и шея).

Список литературы

1. Bertolotto C. Melanoma: from melanocyte to genetical Alterations and clinical options // Scientifica. — 2013. 2013:635203.
2. Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. — М., 2016. — 250 с.
3. Davies M.A., Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma // Oncogene. — 2010. — № 29(41). — P. 5545—5555.
4. Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer // Nature. — 2002. — № 417 (6892). — P. 949—954.
5. Long G.V., Menzies A.M., Nargial A.M. et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma // J. Clin. Oncol. — 2011. — № 29. — P. 1239—1246.
6. Balch C.M., Soong S.-J., Gershenwald J.E. et al. Prognostic factors analysis of 17600 melanoma patient: validation of the American Joint Committee on cancer melanoma staging system // J. Clin. Oncol. — 2001. — Vol. 19. — P. 3622—3634.
7. Hmonen S. Prognosis of primary melanoma // Scand. J. Surg. — 2002. — Vol. 91. — P. 166—171.
8. Grande Sarpa H., Reinke K., Shaikh L. et al. Prognostic significance of extent of ulceration in primary cutaneous melanoma // Am. J. Surg. Pathol. — 2006. — Vol. 30. — P. 1396—1400.
9. Maddoni N., Setaluri V. Prognostic significance of melanoma differentiation and trans-differentiation // Cancers (Basel). — 2010. — Jun. — 2(2). — P. 989—999.
10. Кит О.И., Водолажский Д.И., Златник Е.Ю. и др. Сравнительная характеристика мутационного статуса гена BRAF в зависимости от клинико-морфологических особенностей меланомы кожи // Современные проблемы науки и образования. — 2015. — № 5.; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22900> (дата обращения: 20.02.2016).
11. Elder D.E., Van Belle P., Elenitsas R. et al. Neoplastic progression and prognosis in melanoma // Semin. Cutan. Med. Surg. — 1996. — № 15. — P. 336—348.
12. Jung J.E., Falk T.M., Bresch M. et al. BRAF mutations in cutaneous melanoma: no correlation with histological prognostic factors or overall survival // Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine. — 2010. — Vol. 46, № 6. — P. 487—493.
13. Любченко Л.Н., Черненко П.А., Хатырев С.А. и др. Клинико-генетическая гетерогенность меланомы кожи // Злокачественные опухоли. — 2012. — Т. 2, № 2. — С. 81—90.
14. Liu W., Kelly J.W., 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). — P. 900—905.
15. Shinozaki M., Fujimoto A., Morton D.L. et al. Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas // Clin. Cancer Res. — 2004. — Mar 1. — 10(5). — P. 1753—1757.
16. Menzies A., Haydu E., Visintin L. et al. Distinguishing Clinicopathologic Features of Patients with V600E and V600K BRAF-Mutant Metastatic Melanoma // J. Clin. Cancer Res. — June 2012. — № 18. — P. 3242—3249.

Association between *BRAF* gene mutation status and clinical-morphological features of cutaneous melanoma

Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Efimova I.Yu., Zlatnik E.Yu., Kochuev S.S.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, 344037, The 14th line, 63, e-mail: rnioi@list.ru

Skin melanoma — a malignant disease of the person with a high risk of metastasis. In countries with a predominantly white population of melanoma among the top ten most socially important categories of tumors, both in terms of morbidity and mortality. Estimation of some morphological characteristics of tumors is essential in determining the prognosis of the disease and the formation of high-risk groups in patients with melanoma. The aim of this study was to determine the association between the mutational status of *BRAF* gene, and clinical and morphological features of the skin melanoma patients of the South of Russia. Molecular genetic study of exon 15 of *BRAF* performed direct sequencing method of Sanger and by RT-PCR in 100 patients with a Russian South morphologically confirmed diagnosis of skin melanoma. It is found that the presence of mutations in the *BRAF* gene was significantly associated with an increased level of infestation by Clark. Also, there was a statistically significant increase in the frequency of tumor ulceration by 54% in patients with the presence of activating mutations V600. It has been found that tumors with activating mutations in the *BRAF* gene were more frequent in areas of skin exposed to periodic solar insolation (trunk). Tumors without mutations in the *BRAF* gene prevailed on the areas of skin with chronic sun exposure (head and neck). The overall frequency of somatic symptoms V600 mutations in the *BRAF* gene was 57% (57 of 100 patients). In this study the gene in BRAF have been identified mutations three options with different frequencies of occurrence: p.V600E (88%), p.V600K (10%) and K601>E (2%). In patients younger than 50 years, the frequency of occurrence V600 mutations was significantly higher than in the group of patients older than 50. Also, for patients younger than 50 years has been characterized by the absence of mutations V600K and a higher incidence of V600E mutation (1.7 times).

Key words: melanoma, mutations, *BRAF*