

УДК 616-006.81.04

МУТАЦИЯ ГЕНА BRAF V600 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ – ФАКТОР НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ТЕЧЕНИЯ МЕЛАНОМЫ КОЖИ?

Абрамова О.Э., Кудрявцев Д.В., Шинкаркина А.П., Гуменецкая Ю.В., Кудрявцева Г.Т., Конова М.В.

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; 249035, Калужская обл., г. Обнинск, ул. Королева, д. 4

Ключевые слова: меланома кожи, мутация BRAF

Цель. Исследование роли мутации гена BRAF на прогноз меланомы кожи.

Материалы и методы. В исследование включены 114 больных меланомой кожи с прогрессированием заболевания после ранее проведенного хирургического лечения. В зависимости от результатов молекулярно-генетического исследования на наличие мутации гена BRAF пациенты были разделены на 2 группы — с мутантным геном и диким типом. У всех больных установлен временной период до прогрессирования заболевания с момента лечения первичной меланомы кожи. С помощью статистической программы изучены факторы, влиявшие на его длительность, а также оценена роль мутации гена BRAF на продолжительность безрецидивного периода.

Результаты. В нашем исследовании не было выявлено значимого влияния мутации V600 в гене BRAF на продолжительность безрецидивного периода у больных меланомой кожи и на характер первого рецидива заболевания. В то же время в исследовании установлено, что мутация в гене BRAF была более характерна для младшей возрастной группы — пациентов в возрасте до 50 лет ($p=0,002$).

Заключение. Частота мутации в гене BRAF составила 67,5% случаев. Отсутствие влияния мутации в гене BRAF на течение меланомы кожи было подтверждено при стратификации по стадиям заболевания, а также показано, что мутация значимо не влияла на характер прогрессирования заболевания. Таким образом, результаты нашего исследования не предоставили оснований считать мутацию гена BRAF фактором прогноза в отношении агрессивности течения меланомы кожи.

Введение

Меланома кожи — злокачественная опухоль с высоким метастатическим потенциалом. В странах с преимущественно белым населением меланома входит в число десяти наиболее социально значимых опухолей человека как в отношении заболеваемости, так и смертности [1]. При этом в странах с высокой заболеваемостью меланома кожи является одной из самых частых злокачественных солидных опухолей у молодых пациентов [2].

Рост заболеваемости меланомой отмечен почти во всем мире, ежегодный прирост этого показателя в течение 40 лет составил около 5% [3]. В 2016 г. в РФ зафиксировано 10 454 случая вновь выявленной меланомы. Среднегодовой темп прироста заболева-

емости в течение 10 лет составлял 3,07%, а рост заболеваемости в период с 2006 по 2016 г. составил 36,04%. За 2016 г. от прогрессирования меланомы умер 3701 больной, их средний возраст составил 63,9 года, прирост смертности за 2006–2016 гг. — 16,32% [4].

В этиологии меланомы играют роль как внешние (ультрафиолетовое облучение), так и внутренние (наследственные) факторы [5, 6]. В молекулярном патогенезе спорадической меланомы основную роль играют онкогены и гены-супрессоры различных сигнальных каскадов. В 60–75% случаев меланомы кожи отмечают гиперактивацию сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK [7], который является ключевым регулятором клеточной пролиферации и дифференцировки [5, 6]. Один из его ключевых элементов — серин-треониновая киназа, кодируемая геном BRAF [7]. По данным первого Всероссийского многоцентрового молекулярно-эпидемиологического исследования, частота выявления мутации гена BRAF у пациентов с меланомой кожи состав-

Адрес для корреспонденции

Абрамова Ольга Эдуардовна
E-mail: OEABramova@yandex.ru

ляет 61% случаев [8]. Частота выявления данной мутации имеет обратную зависимость от степени ультрафиолетовой нагрузки как этиологического фактора развития меланомы кожи. Так, активирующую мутацию BRAF выявляли в 59% случаев меланомы кожи, не подверженной хроническому солнечному повреждению, тогда как при меланоме с хронической инсоляцией — только в 11%, а при акральной меланоме — в 23%, при меланоме слизистых оболочек — в 11% случаев [7]. Примечательно, что мутации BRAF обнаруживают в 70% случаев беспигментной меланомы, причем в 89% из них опухоль имеет толщину менее 1 мм [9].

В 80% случаев мутаций в гене BRAF выявляют нуклеотидную замену T1799A в 15-м экзоне, приводящую к замене валина на глутаминовую кислоту в кодоне 600 (V600E) [10]. В 20% случаев мутации кодона 600 представлены заменой V600K, при котором происходит замена валина на лизин, редко встречаются замены V600R/D/M [11, 12]. Мутации в киназном домене приводят к конформационным изменениям и повышению активности киназы до 480 раз *in vitro* или 70–130 раз *in vivo* [13]. Мутантный белок BRAF способствует не только гиперактивации каскада MAPK, но и выживанию клеток меланомы, регулируя экспрессию и функционирование проапоптотических и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 (BMF, BIM, BAD) и MCL-1. Миграция клеток меланомы и их инвазия также усиливаются при мутации V600E BRAF. При других мутациях в 15-м экзоне (D594V, L597R/S/Q, K601) или 14-м экзоне (G464E, G466V, G469E/R/S) активность белка BRAF составляет лишь 30% активности мутантного V600E BRAF [14].

Учитывая достаточно высокий процент выявляемости мутации BRAF, она была использована как точка приложения для таргетной терапии, и в 2011 г. в США был зарегистрирован лекарственный препарат вемурафениб (iBRAF — ингибитор BRAF), который продемонстрировал достоверное увеличение общей выживаемости пациентов с метастатической меланомой кожи по сравнению со стандартной химиотерапией [15].

В настоящее время в литературе достаточно широко освещен вопрос эффективности и целесообразности применения ингибиторов BRAF. Однако влияние данной мутации на течение меланомы не изучено. Имеются данные о взаимосвязи между BRAF-статусом и толщиной опухоли по Breslow, что является неблагоприятным фактором прогноза заболевания [16]. В исследовании, проведенном в ФБГУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», при анализе безрецидивной выживаемости было показано, что наличие мутации ассоциировано с уменьшением времени до развития местного рецидива и прогрессирования, однако полученные результаты не достигли статистической значимости ($p=0,6$) [17].

Материалы и методы

С целью оценки влияния наличия мутации в гене BRAF V600 на прогноз заболевания у пациентов с меланомой мы исследовали 114 случаев обращения в МРНЦ им. А.Ф. Цыба по поводу прогрессирования заболевания после ранее проведенного лечения первичной меланомы. У всех больных было установлено время хирургического удаления первичной опухоли и сроки прогрессирования заболевания, а также был выполнен анализ на наличие мутации в 15-м экзоне гена BRAF в опухолевых клетках, на основании которого выборка разделена на 2 группы. ДНК выделяли из парафиновых блоков, содержащих не менее 20% опухолевых клеток, с помощью наборов «QIAamp DNA FFPE Tissue Kit» (Qiagen, Германия). Для очистки ДНК, выделенной из ткани меланомы с большим содержанием меланина, применяли сорбентный метод с использованием набора АмплиПраймДНК-сорб-В («ИнтерЛабСервис», Россия). Скрининг мутации V600E проводили в ходе аллель-специфической ПЦР в реальном времени на детектирующем амплификаторе StepOnePlus (Applied Biosystems, США) с помощью набора TaqMan Mutation Detection Assay (Applied Biosystems, США), согласно инструкции производителя, с использованием внутреннего контроля, TaqMan Mutation Detection IPC Reagent Kit (Applied Biosystems, США) и комбинации праймеров/зонда для нормального и мутантного аллеля.

Для выявления BRAF-мутаций в 600-м и 601-м кодонах применяли мутационно-специфическую ПЦР в режиме реального времени с использованием наборов «Insider BRAF» компании «Евроген» (Россия).

Для верификации выявленных мутаций проводили секвенирование 15-го экзона BRAF по Сэнгеру с использованием BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) по протоколу производителя с последующей очисткой продуктов с помощью BigDye xTerminator Purification Kit (Applied Biosystems, США) и их прямым секвенированием на генетическом анализаторе AB 3500 (Applied Biosystems, США).

Распределение больных в группах в зависимости от стадии заболевания на момент лечения первичной опухоли было следующим: с BRAF-мутацией I стадия была диагностирована у 6 (7,8%) больных, II — у 46 (59,7%), III — у 16 (20,8%), установить стадию заболевания на момент лечения первичной меланомы кожи не удалось у 9 (11,7%) пациентов. В группе без BRAF-мутации I стадия установлена у 3 (8,1%), II — у 23 (62,2%), III — у 5 (13,5%) и не установлена у 6 (16,2%) пациентов ($p>0,5$).

Для статистического анализа использовалась программа IBM SPSS Statistics 17. Критической величиной уровня значимости считали 0,005.

Результаты

Сравнительный статистический анализ длительности периода до первого прогрессирования меланомы кожи после ее первичного лечения в исследуемых группах показал, что в группе из 77 BRAF-положительных больных показатели 3- и 5-летней выживаемости до рецидива составили $16,8 \pm 4,3$ и $11,6 \pm 3,3\%$ против $18,9 \pm 6,4$ и $5,4 \pm 3,7\%$ в группе из 37 BRAF-отрицательных больных ($p=0,59$). Таким образом, несмотря на широко распространенное мнение о неблагоприятном влиянии мутации V600 в гене BRAF на прогноз при меланоме кожи, выполненный нами анализ безрецидивной выживаемости после лечения первичной опухоли не подтвердил влияния данной мутации на агрессивность течения заболевания, по крайней мере до прогрессирования, потребовавшего определения показаний к назначению iBRAF (рис. 1). Сравнительный анализ общей выживаемости в нашем исследовании не проводился, так как после установления статуса гена BRAF пациенты в дальнейшем получали разное лечение с неодинаковой эффективностью.

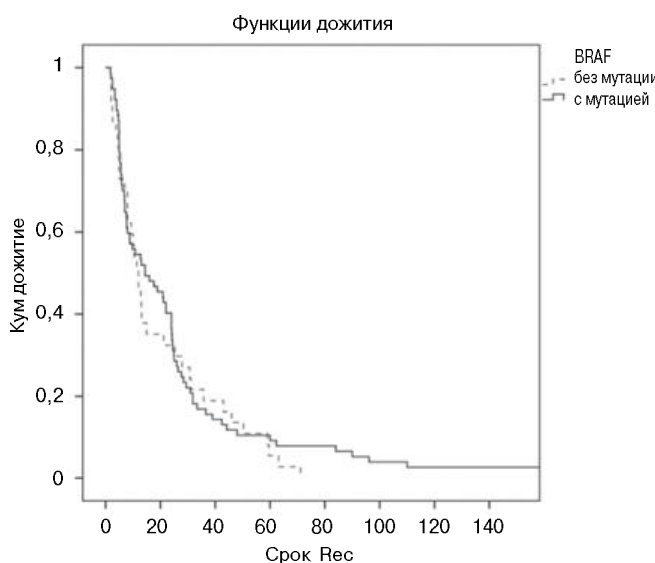


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость больных меланомой кожи в зависимости от наличия мутации в гене BRAF V600 после лечения первичной опухоли

С целью исключения влияния на зависимость безрецидивной выживаемости от статуса BRAF одного из основных прогностических факторов — толщины меланомы кожи — мы выполнили анализ безрецидивной выживаемости в двух выборках — в подгруппе опухолей толщиной по Breslow до 2 мм (pT1-2) и подгруппе меланом толщиной более 2 мм (pT3-4). В группе BRAF-положительных пациентов с тонкими меланомами показатели 3-летней безрецидивной выживаемости (рис. 2) составили 3 (4,7%) в сравнении с 4 (13,3%) в группе BRAF-отрицательных больных ($p>0,25$). В подгруппах толстых меланом данные показатели составили 5 (7,8%) и 2 (6,7%) соответственно ($p>0,25$).

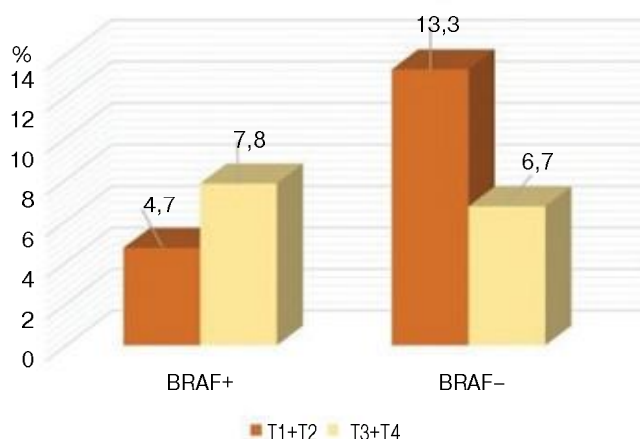


Рис. 2. Трехлетняя безрецидивная выживаемость пациентов в зависимости от мутации в гене BRAF и pT

При анализе 5-летней выживаемости мы получили следующее распределение среди пациентов с наличием мутации в гене BRAF — 1 (1,6%) среди тонких меланом и 2 (3,1%) — толстых меланом, среди пациентов без мутации в гене BRAF — 1 (3,3%) и 0 соответственно. Различия статистически недостоверны ($p>0,25$) (рис. 3).

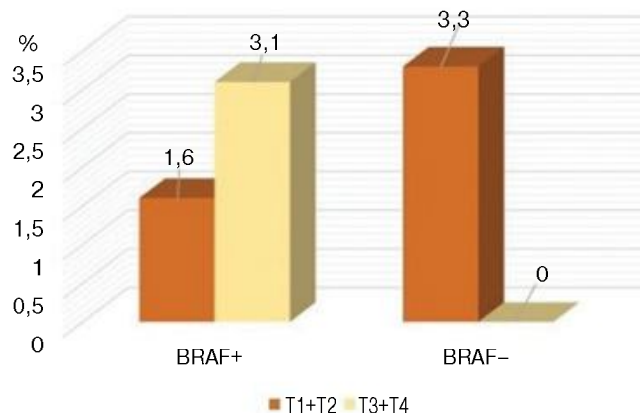


Рис. 3. Пятилетняя безрецидивная выживаемость пациентов в зависимости от мутации в гене BRAF и pT

Анализ характера первого рецидива заболевания показал, что в группе с мутацией в гене BRAF метастазы в регионарные лимфатические узлы как первое проявление прогрессирования заболевания были выявлены у 54 (70,1%) больных, а отдаленные метастазы — у 17 (22,1%), смешанный характер прогрессирования был отмечен у 6 (7,8%) пациентов, в то время как в группе без мутации данные показатели составили 24 (64,9%), 9 (24,3) и 4 (10,8%) соответственно. Сравнительный анализ этих двух групп по критерию χ^2 не выявил влияния мутации в гене BRAF V600 на характер прогрессирования заболевания ($p>0,5$).

На момент лечения первичной меланомы кожи у подавляющего числа пациентов была установлена I, II или III стадии заболевания, у оставшихся

14 пациентов не удалось установить стадию по причине отсутствия необходимой документации и предоставления препаратов низкого качества. В итоге распределение больных в группах в зависимости от стадии заболевания на момент лечения первичной опухоли было следующим: с BRAF-мутацией I стадия была установлена у 7 (9,1%) больных, II стадия — у 45 (58,7%), III — у 17 (22,1%), установить стадию в этой группе не удалось у 8 (10,4%) пациентов. В группе без BRAF-мутации I стадия установлена у 3 (8,1%), II — у 23 (62,2%), III — у 5 (13,5%) и не установлена у 6 (16,2%) пациентов (рис. 4). Таким образом, распределение больных по стадиям забо-

в гене BRAF была более характерна для младшей возрастной группы — пациентов в возрасте до 50 лет, в то время как в группе же BRAF-отрицательных пациентов преобладали пациенты в возрасте старше 55 лет ($p=0,002$).

Заключение

В нашем исследовании частота мутации V600 в гене BRAF составила 67,5% случаев, что в целом соответствует частоте обнаружения мутации у больных меланомой кожи как в нашей стране, так и за рубежом. Этот достаточно высокий удельный вес мутаций BRAF в контингенте больных меланомой

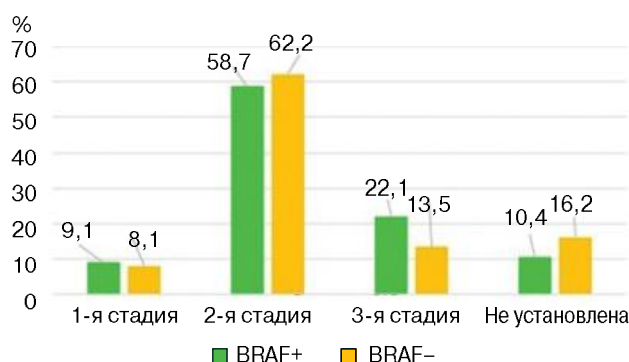


Рис. 4. Анализ распределения пациентов по стадиям заболевания в когортах на момент лечения первичной меланомы

левания на момент лечения первичной опухоли в исследуемых группах было сравнимым. В нашем исследовании не было выявлено зависимости частоты мутации V600 в гене BRAF от степени местной и регионарной распространенности первичной меланомы кожи ($p>0,5$).

С целью оценки зависимости наличия мутации в гене BRAF и возраста пациентов нами был выполнен вариационный анализ. Исследуемые группы мы разделили в соответствии с возрастом, с интервалом 10 лет. Таким образом, мы получили следующие частотные ряды в группах BRAF-положительных и BRAF-отрицательных пациентов (рис. 5).

Проанализировав распределение с помощью метода Манна—Уитни, мы установили, что мутация

кожи обуславливает необходимость дальнейшего изучения их роли в развитии и течении меланомы. Данные, полученные в нашем клиническом исследовании, свидетельствуют об отсутствии значимого влияния мутации BRAF на агрессивность течения меланомы по крайней мере до первого прогрессирования заболевания, потребовавшего обоснования показаний к назначению ингибиторов BRAF. Оценить же дальнейшее влияние данной мутации на течение болезни не представляется возможным ввиду назначения BRAF-положительным пациентам таргетной терапии, обладающей заведомо большей потенциальной эффективностью, чем традиционные средства системного лечения меланомы кожи. Отсутствие влияния мутации в гене BRAF на

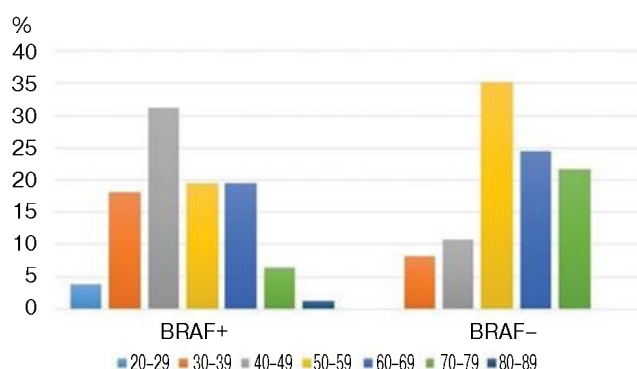


Рис. 5. Возрастное распределение пациентов в выборках

течение меланомы кожи было подтверждено при стратификации по стадиям заболевания, а также показано, что данная мутация значимо не влияла на характер прогрессирования заболевания — неоперабельные метастазы в лимфатические узлы, висцеральные метастазы или смешанный характер прогрессирования. Таким образом, результаты нашего исследования не предоставили оснований считать мутацию гена BRAF фактором прогноза в отношении агрессивности течения меланомы кожи. Однако необходимо отметить выявленную в работе статистически значимую ассоциацию мутации BRAF с возрастом больных меланомой кожи. Так, мутация гена BRAF была наиболее характерна для пациентов моложе 50 лет, в то время как большинство больных без данной мутации были возрастной категории старше 55 лет ($p=0,002$). Учитывая данные литературы в отношении частоты мутации BRAF у больных меланомой кожи, возникшей на фоне предсуществующего невуса — 63% случаев, а также частоту выявления данной мутации в доброкачественных невусах — 50% случаев, следует оценивать роль данной мутации как предрасполагающего фактора к возникновению меланомы кожи в молодом возрасте, то есть как фактор риска данного заболевания. Кроме того, обращает на себя внимание наиболее частое выявление мутации при меланомах, не подверженных хронической инсоляции, — 59% случаев. Что в свою очередь свидетельствует о вероятном различии в генетическом и молекулярном механизме формирования меланомы кожи, обусловленных мутацией в гене BRAF, в сравнении с меланомами, этиологическим фактором которых стали повреждения кожи, вызванные ультрафиолетовым излучением.

Информация об источниках финансирования

Финансовой поддержки в настоящей статье не было.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

- Концепция и дизайн исследования — О.Э. Абрамова, Д.В. Кудрявцев.
- Сбор и обработка материала — О.Э. Абрамова, Д.В. Кудрявцев, А.П. Шинкаркина, М.В. Конова.
- Статистическая обработка данных — О.Э. Абрамова.
- Написание текста — О.Э. Абрамова, Д.В. Кудрявцев.
- Редактирование — Ю.В. Гуменская.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кит ОИ, Водолажский ДИ, Ефимова ИЮ и соавт. Связь клинико-морфологических особенностей и мутационного статуса гена BRAF в качестве прогностического фактора у больных меланомой кожи. Медицинская генетика. 2016;6(168):19-24.
2. Trotter SC, Sroa N, Winkelmann RR et al. A Global Review of Melanoma Follow-up Guidelines. J Clin Aesthet Dermatol. 2013;6(9):18-26.
3. Bertolotto C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. Scientifica. 2013;635203.
4. Каприн АД, Старинский ВВ, Петрова ГВ. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2016:250.
5. Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. N Engl J Med. 2006;355(1):51-65.
6. Smalley KS, Sondak VK, Weber JS. C-KIT signaling as the driving oncogenic event in sub-groups of melanomas. Histol Histopathol. 2009;24(5):643-650.
7. Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. Oncogene. 2010;29(41):5545-5555.
8. Франк ГА, Имянитов ЕН, Завалишина ЛЭ и соавт. Первое Всероссийское молекулярно-эпидемиологическое исследование меланомы: результаты анализа мутаций в гене BRAF. Архив патологии. 2014;76(3):65-73.
9. Hutchinson KE, Lipson D, Stephens PJ et al. BRAF fusions define a distinct molecular subset of melanomas with potential sensitivity to MEK inhibition. Clin Cancer Res. 2013;19(24):6696-6702.
10. Davies H, Bignell GR, Cox C et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002;417(6892):949-954.
11. Long GV, Menzies AM, Nargal AM et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. J Clin Oncol. 2011;29(10):1239-1346.
12. Lovly CM, Dahlman KB, Fobn LE et al. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype — driven therapeutic trials. PLoS One. 2012;7(4):e35309.
13. Lin K, Baritaki S, Militello L et al. The role of B-RAF mutations in melanoma and the induction of EMT via dysregulation of the NF-KB/Snail/RKIP/PTEN circuit. Genes Cancer. 2010;1(5):409-420.
14. Гребенникова ОП, Прилепо ВН. Меланома. В кн.: Онкология для практикующих врачей (ред. С.С. Чистякова). М.: Товарищество научных издательств КМК, Авторская академия. 2009:548-563.
15. Орлова КВ, Харкевич ГЮ, Утяшев ИА и соавт. Персонализированная терапия метастатической меланомы кожи, Эффективная фармакотерапия. 2016:16-25.
16. Кит ОИ, Водолажский ДИ, Златник ЕЮ и соавт. Ассоциация мутационного статуса гена BRAF и клинико-морфологических особенностей меланомы кожи. Кубанский научный медицинский вестник. 2016;158(3):67-71.
17. Любченко ЛН, Черненко ПА, Хатырев СА и соавт. Клинико-генетическая гетерогенность меланомы кожи. Злокачественные опухоли. 2012;2(2):81-90.

Статья поступила 20.05.2019 г., принята к печати 17.06.2019 г.
Рекомендована к публикации Т.К. Харатишвили

Информационная страница

Абрамова Ольга Эдуардовна, МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, клинический ординатор 2-го года обучения.

Кудрявцев Дмитрий Владимирович, МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, в.н.с. отделения комбинированного лечения опухолей костей, мягких тканей и кожи, доктор медицинских наук.

Гуменецкая Юлия Васильевна, МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, зав. отделением радиотерапии, доктор медицинских наук.

Шинкаркина Анна Петровна, МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава

России, с.н.с. патологоанатомического отделения, кандидат биологических наук.

Конова Марина Викторовна, МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, н.с. патологоанатомического отделения.

Дополнительные утверждения

Авторы согласны на публикацию представленной работы.

Авторы утверждают, что данная рукопись в настоящее время не представлена для публикации в другие издания и не была принята для публикации в других изданиях.

BRAF MUTATION V600 IN TUMOR CELLS — A FACTOR OF ADVERSE COURSE OF MELANOMA SKIN?

Abramova O.E., Kudryavtsev D.V., Shinkarkina A.P., Gumenetskaya Yu.V., Kudryavtseva G.T., Konova M.V.

A. Tsyb Medical Radiological Research Centre — Branch of the National Medical Radiology Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation; Russia, 249035, Kaluga Region, Obninsk, Koroliova, 4

Key words: melanoma skin, BRAF mutation

Background. To investigate the role of BRAF mutation in the prognosis of skin melanoma.

Patients and methods. 114 patients with skin melanoma in a stage of progression after previous surgical treatment were included in the study. Depending on the results of a molecular genetic test for the presence of a BRAF mutant, the patients were divided into 2 groups — with the mutant gene and the wild type. All patients had noted by time to progression of the disease since the initial treatment of the skin melanoma. By using a statistical program, we studied the factors that influenced on time to progression, and the role of the BRAF gene mutation on relapse-free period.

Results. There was no significant effect of BRAF V600-mutant on the duration of the relapse-free period in skin melanoma patients and on the nature of the first recurrence of the disease. At the same time, the study found out that the mutation in the BRAF gene was more characteristic to the younger age group — patients under the age of 50 years ($p = 0.002$).

Conclusions. The frequency of BRAF V600-mutant was 67.5% of cases. The absence of the effect in BRAF V600 mutation-positive melanoma was confirmed by stratification according to the stages of the disease, and it was also shown that the mutation did not significantly affect the nature of disease progression. The results of our study did not provide grounds to consider the BRAF mutant melanoma to be a predictive factor in association with aggressiveness of the skin melanoma.