

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Российский научный центр рентгенорадиологии»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России)

*На правах рукописи*

**Куколева Елена Анатольевна**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ BRAF И ВЗАИМОСВЯЗИ  
ВЫЯВЛЕННЫХ МУТАЦИЙ С КЛИНИЧЕСКИМИ И  
ГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ, ПРОГНОЗОМ У  
БОЛЬНЫХ С МЕЛАНОМОЙ КОЖИ**

14.01.12 - онкология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
д. м. н., профессор Чхиквадзе В.Д.

Москва – 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	3
ВВЕДЕНИЕ .....	4
Глава 1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) .....	11
1.1 Эпидемиология меланомы кожи .....	11
1.2 Клинические особенности меланомы кожи .....	13
1.3 История развития исследований меланомы кожи .....	19
1.4 Современные стандарты лечения меланомы кожи .....	26
1.5 Сигнальный каскад RAS/RAF/MEK/MAPK (ERK) и его значение у больных меланомой кожи .....	28
1.6 Современные лекарственные препараты .....	38
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	45
2.1 Характеристика клинического материала .....	45
2.2 Методы исследования .....	51
2.3 Статистическая обработка данных .....	55
Глава 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ BRAF И ВЗАИМОСВЯЗИ ВЫЯВЛЕННЫХ МУТАЦИЙ С КЛИНИЧЕСКИМИ И ГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ, ПРОГНОЗОМ У БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ (РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ)..	56
3.1 Частота встречаемости мутаций V600 в генах семейства BRAF у больных меланомой кожи .....	56
3.2 Анализ распределения больных по полу, возрасту, локализации в зависимости от экспозиции к солнечному воздействию, стадиям .....	59
3.3 Анализ частоты неблагоприятных прогностических факторов при наличии мутации в гене BRAF .....	67
3.4 Анализ частоты лимфоидной инфильтрации и очагов регрессии в тканях опухоли у больных с мутациями и без мутаций .....	72
3.5 Анализ выживаемости .....	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	79
ВЫВОДЫ .....	88
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	89
Список литературы .....	90

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БЦЖ - Бацилла Кальметта — Герена

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

Гр. - грей

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФН - интерферон

ПЦР - полимеразная цепная реакция

СОД – суммарная очаговая доза

ФГБУ «РНЦРР» - Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

AJCC - American Joint Committee on Cancer, американский объединенный комитет по раку

ECOG - Eastern Cooperative Oncology Group, оценка физического состояния по шкале, разработанной данной группой

Ir - иридий

NCCN - The National Comprehensive Cancer Network

RUSSCO – Российское общество клинической онкологии

TGF-beta - трансформирующий ростовой фактор бета

TNM - аббревиатура от tumor, nodus и metastasis, международная классификация стадий злокачественных новообразований

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность работы и степень ее разработанности**

Меланома кожи составляет от 4 до 7% в структуре злокачественных новообразований по всему миру. Самый высокий уровень заболеваемости отмечается в США и Австралии (до 20 - 40 случаев на 100 000 населения). В Европе этот показатель находится в пределах 10 - 20 на 100 000 населения [129]. В России меланома кожи составляет 1,7% среди всех злокачественных заболеваний. Вместе с опухолями кожи, которые составляют 12,3%, меланома кожи занимает 1-ое место в структуре онкологической патологии. У мужчин злокачественные заболевания кожи находятся на 3-ем месте после заболеваний бронхо - легочной системы и рака предстательной железы, у женщин – на 2-ом после рака молочной железы. Уровень заболеваемости и смертности от меланомы кожи в России имеет тенденцию к росту [27].

Меланома кожи является болезнью с бурным и непредсказуемым течением, активным лимфогенным и гематогенным распространением, что обуславливает быстрое прогрессирование заболевания и высокую смертность.

К биологическим особенностям меланомы можно отнести её высокий злокачественный потенциал и одновременно низкую чувствительность к лучевой и химиотерапии. На сегодняшний день стойкое излечение от меланомы кожи возможно только на ранних стадиях заболевания.

Последние десятилетия ознаменовались революционными изменениями представлений ученых о молекулярной биологии опухолей. Установлено, что трансформация нормальных меланоцитов кожи в клетки меланомы является результатом аккумуляции мутаций, включенных в клеточное деление, дифференцировку и запрограммированную клеточную гибель. Некоторые из этих

мутаций нарушают регуляцию ключевых клеточных сигнальных путей и, таким образом, представляют потенциальные мишени для таргетной терапии.

За последние годы удалось расшифровать сложный генетический профиль меланомы. Предметом интенсивного исследования стал сигнальный путь: RAS/RAF/MEK/MAPK (ERK)[124]. Активация этого пути происходит как за счет активации рецепторов на поверхности опухоли, так и вследствие мутации в генах семейства RAS, RAF, регулирующих этот каскад. Имеющиеся нарушения приводят к постоянной активации RAS/RAF/MEK/MAPK (ERK) сигнального каскада, что, в последующем, приводит к злокачественной трансформации клеток.

В 2002 году в ходе научных работ была выявлена высокая частота BRAF онкогенных мутаций при меланоме. Так мутация гена BRAF были выявлены в 62% при местно-распространенных формах меланомы и до 72 % - при метастатической форме. До 80% BRAF мутаций приходится на тип V600E.

На ранней стадии заболевания мутации в гене BRAF отмечены только в 10 % случаев. Это позволяет предполагать, что BRAF мутации отражают процесс прогрессирования заболевания, и, возможно, не участвуют в инициации меланом.

В 2011 году в США была успешно завершена третья фаза клинических исследований эффективности таргетного препарата Вемурафениб, действие которого селективно направлено против белков - продуктов мутантного гена BRAF (V600). Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов в США сертифицировало препарат Вемурафениб (Zelboraf) для применения у больных с метастатической меланомой. В 2012 году данный препарат одобрен и начал широко применяться в странах ЕС также для лечения метастатической меланомы. В октябре 2013 года Вемурафениб зарегистрирован в РФ [17], в 2014 году он поступил на российский рынок и, возможно, будет включен в список жизненно важных лекарственных средств.

В мае 2013 года в США также были сертифицированы в сочетанном применении Дабрафениб (ингибитор BRAF) и Траметиниб (ингибитор MEK) для лечения пациентов с метастатической или неоперабельной меланомой с

мутациями в гене BRAF. В октябре 2013 года Дабрафениб был зарегистрирован в России, в апреле 2015 года Траметиниб также был зарегистрирован в России [17].

В ряде работ имеются данные, характеризующие взаимосвязь отдельных клинических и гистологических свойств меланомы, например, таких как возраст манифестации заболевания с наличием мутаций в генах семейства RAF [26]. Представляет интерес выявление больных с повышенным риском неблагоприятного течения заболевания на основании не только рутинных методов исследования, установления стадии заболевания, формы роста опухоли и т.д., но и по молекулярно – генетическому статусу больного. Высказываются предположения о более плохом прогнозе у пациентов с выявленными мутациями в гене BRAF, чем у пациентов без мутаций [73]. До настоящего времени комплексно не изучался вопрос, является ли наличие спектра мутаций в гене BRAF самостоятельным неблагоприятным прогностическим фактором и, в связи с этим, требуют ли больные с такими мутациями проведения более интенсивного лечения и последующего наблюдения. По некоторым публикациям таким прогностическим фактором может стать само наличие у больных меланомой кожи мутации в гене BRAF.

За последние годы существенно возросла роль молекулярно-генетических исследований, направленных на поиск мутаций в генах семейства BRAF у больных меланомой кожи, и проведение дальнейшей научной работы в этом направлении позволит определить место и значение поиска BRAF мутаций в лечении больных меланомой кожи.

### **Цель исследования**

Изучить прогностическую значимость мутации гена BRAF у больных с меланомой кожи.

### **Задачи исследования**

1. Определить частоту мутаций в гене BRAF и ее вариантов у больных с меланомой кожи, проживающих в Московском регионе.
2. Изучить общую и безрецидивную выживаемость больных с меланомой кожи в зависимости от наличия мутаций в гене BRAF.
3. Провести сравнение клинических особенностей меланомы кожи в группах больных с мутациями и без мутаций (распределение по полу, стадии заболевания и локализации меланомы).
4. Выявить и изучить частоту неблагоприятных прогностических факторов (ранний возраст манифестации заболевания, узловая, изъязвленная и беспигментная формы) и частоту признаков активации «иммунного ответа» (лимфоидной инфильтрации и очагов регрессии в тканях опухоли) у больных меланомой кожи с мутациями и без мутаций в гене BRAF.
5. Оценить влияние наличия мутаций в гене BRAF на прогноз течения и выбор тактики лечения больных меланомой кожи.

### **Научная новизна**

Впервые изучена частота встречаемости мутаций в гене BRAF и ее вариантов у больных меланомой кожи определенного региона - г. Москвы и Московской области. Установлено, что у исследуемых больных меланомой кожи мутации V600 в гене BRAF отмечались у 67,3% (74 из 100) больных. При этом наибольшее число больных - 63 (85,1%) имели вариант мутации V600E; реже – мутацию V600K (13,5%) , и только у одного больного была мутация типа V600R.

Впервые установлено, что у больных с мутацией V600E в гене BRAF опухоль достоверно чаще развивалась в более молодом возрасте, а у больных с мутацией V600K - достоверно чаще в более пожилом возрасте, чем у больных без мутаций.

Впервые установлено, что в группе больных с мутациями в гене BRAF достоверно чаще встречались как признаки агрессивного течения заболевания (более ранний возраст манифестации заболевания, узловой характер роста, беспигментная и изъязвленная формы опухоли.), так и признаки активации иммунного ответа организма (наличие лимфоидной инфильтрации и очагов регрессии опухоли).

Впервые установлено, что мутационный статус гена BRAF не может использоваться как самостоятельный прогностический фактор у больных с меланомой кожи.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Работа дает направление для дальнейших научных исследований в области изучения механизмов функционирования иммунной системы больного при развитии меланомы, одним из пусковых моментов которой является мутационный статус в гене BRAF. Полученные результаты исследования позволяют учитывать мутационный статус в гене BRAF для индивидуализации комбинированного лечения больных с меланомой кожи.

Определение мутационного статуса гена BRAF у больных меланомой кожи можно использовать для практического применения в профессиональной деятельности врачей-онкологов и врачей-генетиков в специализированных научно-исследовательских и клинических учреждениях и центрах системы здравоохранения РФ, при медико-генетических консультациях, а также для разработки методических рекомендаций.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. У больных меланомой кожи с мутациями в гене BRAF достоверно чаще встречаются как неблагоприятные клиничко - гистологические признаки (более



ранний возраст манифестации заболевания, узловый характер роста, изъязвленные и беспигментные формы опухоли), так и признаки активации иммунного ответа организма пациента (наличие лимфоидной инфильтрации и очагов регрессии).

2. Отсутствие достоверных различий в общей и безрецидивной выживаемости у больных с меланомой кожи в группах с мутациями и без мутаций не позволяет рассматривать наличие мутации в гене BRAF в качестве самостоятельного прогностического фактора течения заболевания.

### **Внедрение результатов работы**

Исследование мутационного статуса в гене BRAF у больных с меланомой кожи внедрено в клиническую практику ФГБУ «РНЦРР».

### **Апробация материалов диссертации**

Материалы диссертационной работы доложены на XII Всероссийской конференции молодых ученых «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии, Москва, ноябрь 2013 г., а также представлены в виде стендового доклада на XVII Российском онкологическом конгрессе, Москва, ноябрь 2013 г.

Апробация работы состоялась на совместном заседании научно-практической конференции и совета по апробациям кандидатских диссертаций ФГБУ «РНЦРР» 07 декабря 2015 года.

### **Публикации по материалам диссертации**

По теме научной работы опубликованы 3 работы, из них 2 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 103 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа иллюстрирована 14 таблицами, 27 рисунками. Список литературы включает 132 источника, из которых 27 отечественных и 105 зарубежных.

# Глава 1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1 Эпидемиология меланомы кожи

Меланома - злокачественная опухоль, которая развивается из пигментных клеток кожи - меланоцитов. Она, в основном, локализуется на коже туловища, конечностей, головы и шеи (94 %). Редко развивается из сосудистой оболочки глаза (уvealная меланома) – 5 % [113], на слизистых оболочках – 0,8-1,8% [44]. Меланома может развиваться как из предшествующих врожденных или приобретенных невусов кожи в 25% случаев, так и на неизменной коже в 75 % [94]. Эта опухоль обладает особыми биологическими характеристиками, которые выделяют её из ряда других злокачественных новообразований. К таким особенностям меланомы можно отнести её высокий злокачественный потенциал, который проявляется активным лимфогенным и гематогенным метастазированием, низкой чувствительностью к лучевой и химиотерапии. На сегодняшний день на стойкое излечение от меланомы кожи возможно рассчитывать только на ранних стадиях заболевания [16].

Несмотря на то, что меланома относится к числу клинически (визуально) диагностируемых опухолей, частоту выявления заболевания на ранних стадиях нельзя считать удовлетворительной. В Российской Федерации к моменту установления диагноза у 22,1% больных выявляется III и IV стадии заболевания [13].

В таблице 1.1 представлен прогноз общей 5-летней выживаемости в зависимости от стадии заболевания [101].

**Таблица 1.1. Общая 5-летняя выживаемость в зависимости от стадии меланомы**

Стадия	Распространенность заболевания	5-летняя выживаемость
I и II	локализованное заболевание	50 % - 90 %
III	метастазы в регионарные лимфатические узлы определяются микроскопически/сателлитные или транзиторные метастазы	20 % - 70 %
IV	отдаленные метастазы	менее 10 %

Заболеваемость меланомой кожи в различных странах не одинакова (показатели на 100 000 населения) [129]: Австралия – 54,5 чел., США (европейская популяция) – 25,6 чел., Германия – 20 чел., Великобритания – 18,8 чел., Италия – 13,3 чел., Франция – 11,7 чел. В России этот показатель составил 54,8 чел. Меланома является основной причиной смерти от злокачественных опухолей женщин в возрасте 25–30 лет в США и в возрасте 30–35 лет – в Австралии [120].

По статистическим данным в 2013 году в РФ меланома кожи составила 1,7% среди всех выявленных злокачественных новообразований. Вместе с опухолями кожи, которые составили 12,3%, они занимают 1-ое место в структуре заболеваемости злокачественными опухолями. У мужчин – злокачественные опухоли кожи находятся на 3-ем месте после заболеваний бронхо-легочной системы и рака предстательной железы, у женщин – на 2-ом месте после рака молочной железы. Уровень заболеваемости меланомой кожи в России имеет тенденцию к росту. Так за период с 2003 по 2013 гг. прирост числа заболевших среди мужчин составил 28,6%, а среди женщин – 30,5%. В 2003 году заболеваемость меланомой кожи составила 3,4 чел. на 100 000 населения, а в 2013 году – 4 чел., у женщин - 4,28 чел., у мужчин 3,77 чел. За тот же 10-летний период (2003-2013 гг.) отмечается прирост смертности от данного заболевания в РФ в целом на 10,18% (у мужчин – на 14,72%, у женщин – на 7,97%) [27]. Меланома кожи является опухолью с высоким злокачественным потенциалом. В России, как и во всем мире наблюдается рост заболеваемости и смертности от меланомы

кожи. Несмотря на успехи современной медицины результаты лечения больных остаются далеко не удовлетворительными. Поиски путей контроля над заболеванием на распространенных стадиях и у пациентов с прогрессированием заболевания – актуальная задача современной онкологии.

## 1.2 Клинические особенности меланомы кожи

Название опухоли из пигментных клеток происходит от древне-греческого слова μέλας, что означает «чёрный». Меланома кожи развивается вследствие злокачественной трансформации меланоцитов и меланобластов. Эмбриогенетически меланоциты являются производными нейроэктодермального гребешка, из которого их предшественники мигрируют в кожу и другие органы на ранних сроках внутриутробного развития. Меланоциты кожи имеют вид отростчатых клеток и располагаются на базальной мембране среди элементов росткового слоя эпителия. Их основной функцией является выработка пигмента меланина. Производимый ими меланин захватывается эпителиоцитами, и степень насыщенности последних пигментом определяет цвет кожи человека.

В основе современной теории злокачественного роста лежат необратимые повреждения генотипа нормальной клетки под воздействием физических, химических и биологических канцерогенных агентов. Эти нарушения могут иметь как генетический (генные мутации, хромосомные aberrации, изменения целостности хромосом или количества генов), так и эпигенетический, обменный характер (например, нарушения в ферментной системе ДНК). Клетки с поврежденной ДНК приобретают способность к беспредельному размножению, формированию опухоли и метастазированию.

Выделяют четыре основные формы меланомы [10]:

1. Поверхностно распространяющаяся меланома определяется у 70% больных.

2. Узловая меланома встречается в 15-20% случаев. На момент установления диагноза она обычно инвазивная, ее злокачественный характер распознается по выступающему узлу.

3. Лентиго-меланома наблюдается в 4-15% случаев. Эта форма меланомы чаще развивается у пожилых людей, средний возраст начала заболевания составляет 65 лет. Она развивается на участках, постоянно подверженных воздействию солнечного излучения: на коже лица, ушных раковин, рук и верхней части туловища. Опухоль медленно растет в течение 5-20 лет. Эта форма меланомы характеризуется наименее злокачественным течением.

4. Акральная лентигинозная меланома - наиболее редкая форма меланомы (2-8% случаев меланомы у лиц с белой кожей; 29-72% случаев - у лиц с темной кожей). Она развивается в виде небольших коричневатых пятен под ногтевой пластинкой, на ладонях или подошвах. Эта форма меланомы поздно диагностируется и вследствие этого имеет худший прогноз.

Редкой формой является амеланотическая (беспигментная) меланома (менее 5% случаев всех меланом). Она может являться либо разновидностью узловой меланомы, либо метастазом пигментной меланомы и развивается в результате неспособности мало-дифференцированных опухолевых клеток синтезировать меланиновый пигмент.

Характерными особенностями меланомы являются метастазы в кожу в виде узлов или сателлитов, а также транзиторные метастазы [3]. Узловые метастазы меланомы характеризуются множественными узелками различных размеров, располагающиеся подкожно на разном удалении от первичной опухоли. Сателлитные метастазы располагаются вокруг первичной меланомы (на расстоянии до 2 см) в виде пигментных пятен, имеющих такую же окраску, как и первичный очаг. На рисунке 1.1 представлен основной опухолевый очаг и рядом с ним – сателлитный метастаз.

Транзиторные метастазы - это метастатическое поражение, которое возникает в анатомической области на участке между местом иссечения первичного очага и регионарным лимфатическим коллектором. Этот тип

метастазирования характерен именно для меланомы кожи и, поэтому, выделяется в отдельный вариант локо - регионарного прогрессирования болезни. Он развивается из опухолевых клеток, проникших в лимфатические сосуды дермы и нашедших там подходящую микросреду для своего роста. С точки зрения механизмов своего развития эти образования сходны с местными рецидивами.



**Рис. 1.1. Меланома кожи с сателлитным метастазом**

В настоящее время выделяют такие факторы риска развития меланомы: воздействие на кожу ультрафиолетового излучения; ионизирующая радиация; солнечные ожоги, особенно полученные в детском возрасте; травматизация невусов (как многократное, так и однократное повреждение) [2]; большое количество родинок на теле (более 50), особенно атипичных (несимметричных, возвышающихся над поверхностью кожи); низкий уровень пигментации кожи [14]; наличие рака кожи в анамнезе; меланома у близких родственников; ослабленный иммунитет; воздействию определенного ряда химических факторов [9, 35]; облигатные предмеланомные заболевания (пигментная ксеродерма кожи, меланоз Дюбрейля); озлокачествление некоторых видов невусов, таких как сложный (озлокачивается в 45% случаев), пограничный (в 34%), интрадермальный (в 16%), голубой невус (в 3,2%); повышенному риску развития меланомы подвергаются также лица с диспластическим невусным синдромом.

Одним из самых известных симптомокомплексов, используемых в диагностике меланомы, является правило ABCD, предложенное R. Friedman в 1985 году [64]. Это правило включает оценку пигментного образования кожи по 4 параметрам: А (asymmetry) - асимметрия пигментного пятна; В (border) - неровность границ; С (color) - неравномерность окраски; D (diameter) - диаметр более 6 мм. С 1999 г. правило дополнено критерием Е (evaluation). Он характеризует результаты динамического наблюдения за лицами из группы риска и позволяет оценить динамику изменений цвета, формы и размеров пигментного образования кожи [8]. Недостатком клинического правила ABCD является неспособность обнаружить раннюю стадию злокачественного заболевания в пигментном образовании, которое имеет малый размер и/или симметрию в форме и цвете.



**Рис. 1.2. Меланома кожи**

На рисунке 1.2 можно четко увидеть ряд из критериев системы ABCDE: у пигментного образования имеется асимметрия, неровность и нечеткость контуров и неравномерность окраски.

Для дифференциальной диагностики истинно пигментных и пигментированных образований кожи используют дерматоскопию [32, 81] - исследование образования кожи с увеличением до 150 раз. Дерматоскопия позволяет дифференцировать типичные пигментные новообразования (невусы,



меланому) от пигментированных новообразований кожи, таких, как себорейный кератоз, базальноклеточный рак, гемангиома, дерматофиброма, каждое из которых имеет характерные дерматоскопические признаки. Завершающим этапом дерматоскопии является дифференциальная диагностика доброкачественных и злокачественных пигментных новообразований кожи. Для этого используют ряд дифференциально-диагностических алгоритмов, работу над созданием которых начал Н. Rehamberger и соавт. в 1987 году [104]. В 1994 г. W.Stolz и соавт. [117] на основе клинического правила ABCD и данных дерматоскопии разработали дифференциально - диагностический алгоритм для выявления меланомы кожи. Каждому признаку (асимметрия, границы новообразования, цвет, дерматоскопические структуры) было присвоено определенное количество баллов, которые умножается на соответствующий весовой коэффициент. Если сумма баллов превышает 5,45, то точность диагностики меланомы составляет 92,2%. В 1996 г. S. Menzies и соавт. разработали новый дерматоскопический алгоритм [98]. Были изучены 72 признака при проведении дерматоскопии 62 меланом кожи и 159 клинически атипичных доброкачественных пигментных новообразований кожи. Методом статистического анализа выявлены 11 значимых дерматоскопических признаков, на основе которых разработано правило S.Menzies. Чувствительность и специфичность диагностики меланомы с использованием алгоритма S.Menzies составляют 92 и 71% соответственно. В 1998 г. G. Argenziano и соавторы [31] представили дерматоскопическое «правило 7 признаков». Они делят дерматоскопические признаки меланомы на большие и малые. Каждый из них имеет простую систему оценки. Большие дерматоскопические признаки меланомы (весовой коэффициент 2 балла): нерегулярная пигментированная ретикулярная сеть; бело-голубая вуаль; атипичные сосуды. Малые дерматоскопические признаки меланомы (весовой коэффициент 1 балл) включают: неравномерную пигментацию; неравномерные полосы; неравномерные точки и пятна; участки регрессии пигментного новообразования. Если сумма баллов составляет 3 условные единицы и более, меланома определяется с чувствительностью 95% и специфичностью 75%.

При дерматоскопии идентифицируется 6 цветов образований кожи, из них 4 цвета можно объяснить присутствием меланина, белый происходит из-за регрессивных изменений новообразования, красный вызван воспалением или неоваскуляризацией. Нормальный эпидермис кажется желтым, эпидермис с акантозом выглядит от непрозрачного желто - коричневого до серо - коричневого цвета и зависит от увеличения количества пигментации в кератиноцитах [21].



**Рис.1.3. Дерматоскопическое изображение меланомы кожи**

На рисунке 1.3 представлена дерматоскопическая картина, на которой можно выделить ряд признаков меланомы: большие признаки - нерегулярная пигментированная ретикулярная сеть, бело-голубая вуаль; малые признаки – неравномерная пигментация, неравномерные точки и пятна, участки регрессии белесоватого цвета. Сумма баллов в данном случае составляет  $2+2+1+1+1 = 7$  условных единиц, что соответствует меланоме кожи.

Таким образом, современные представления об опухолевом росте свидетельствуют о том, что в его основе лежит повреждение ДНК, вследствие чего клетка приобретает способность к неконтролируемому размножению. Выделяют 4 основных формы опухолей из пигментных клеток кожи – поверхностно – распространяющаяся, узловая, лентиго-меланома, акральная лентигинозная меланома, также встречается беспигментная меланома. Характерными особенностями меланомы кожи являются сателлитные метастазы в

кожу, а также транзиторные метастазы. Травматизация невусов и избыточное ультрафиолетовое излучение являются основными факторами риска развития меланомы кожи. В настоящее время разработаны и внедрены в общемировую практику ряд систем визуальных диагностических критериев, которые позволяют с высокой долей вероятности поставить верный диагноз. Также для диагностики меланомы кожи используется дерматоскопия – исследование кожи с увеличением.

### **1.3 История развития исследований меланомы кожи**

Первое упоминание о злокачественных пигментных образованиях кожи встречается в трудах Гиппократ в V веке до н.э. В 1960 году при раскопках в Перу были обнаружены 9 мумий инков, возраст которых насчитывал около 2500 лет. На останках одной из мумий были обнаружены явные признаки меланомы. Радиоактивный анализ показал, что у этой мумии имеются изменения, свидетельствующие о метастазах меланомы в кости конечностей и черепа.

Впервые метастатическая меланома была описана в 1787 году шотландским хирургом Джоном Хантером, который проводил лечение меланомы у пациента, описав ее, как «раковый грибковый нарост». В дальнейшем, эта опухоль была удалена, и помещена на хранение в музей Hunterian Королевского хирургического колледжа в Великобритании, а в 1968 году научные исследования подтвердили версию того, что опухоль явилась первым примером метастатической меланомы.

Французский врач Рене Лаэннек (1781 - 1826 гг.) первым описал сущность данного заболевания. В его докладе, который был первоначально представлен во время лекции для Медицинского факультета Парижского университета в 1804 году и затем опубликован в 1806 году, было указано, что меланома – опухоль развивающаяся из пигментных клеток [84].

В своей работе английский терапевт Уильям Норрис в 1857 году отметил, что существует семейная предрасположенность в развитии меланомы. Его исследования показали, что в 8 случаях из 10 именно это явилось причиной болезни. У.Норрис также первым предположил связь между меланомой и

факторами окружающей среды, отметив, что большинство его пациентов «...имели бледные лица» [103]. Он также отметил, что меланома может быть беспигментной и позже показал метастатический характер меланомы, заметив, что она может распространяться среди других внутренних органов.

Следует отметить, что поиск эффективных методов лечения меланомы кожи имеет достаточно длительную историю, знание которой помогает ученым в определении направлений дальнейших научных исследований.

Рассмотрим с исторической точки зрения основные направления этих исследований.

1. Малоинвазивные хирургические методы лечения. Учеными Великобритании из Gartnavel General Hospital [67] был обобщен опыт применения лазерной абляции кожных метастазов меланомы. Вывод исследователей заключался в том, что лазерная абляция может применяться как метод паллиативного лечения кожных метастазов меланомы.

2. Лучевые методы лечения.

А) Лучевая терапия сателлитных кожных метастазов. В 2010 году на 52-ом ежегодном конгрессе Американского общества радиационной онкологии были доложены результаты лечения пациентов с сателлитными кожными метастазами меланомы с применением высокомогностной брахитерапии источниками Ir 192 [48]. Авторы рекомендовали применение этой методики с паллиативной целью для увеличения периода контроля над прогрессированием заболевания.

Б) Стереотаксическая радиохирургия рассматривается в качестве варианта достижения контроля над метастазами меланомы в головной мозг [93]. В обзоре методик лечения метастазов меланомы в головной мозг Douglas J.G. и соавторы отмечают, что дополнение облучения всего объема головного мозга локальным стереотаксическим воздействием на метастазы, а также дополнение химиотерапевтического лечения стереотаксическим воздействием на метастазы в головном мозге позволяет достичь лучшего контроля над заболеванием [54].

3. Терапия, направленная на стимулирование иммунного ответа.

А) Имиквимод. Французские исследователи из Университетского госпиталя в г.Лилль [62] доложили о результатах лечения 5 пациентов с неоперабельной метастатической меланомой (кожные метастазы) с применением комбинации имиквимода и 5-фторурацила. На основании результатов исследования авторы считают, что такая комбинация может быть эффективной для достижения локо-регионального контроля у пациентов с неоперабельными кожными метастазами меланомы в связи с индукцией противоопухолевого иммунитета.

Б) Вакциноterapia. В 2006 году группой канадских авторов были проанализированы данные публикаций результатов исследований по применению различных комбинаций вакцины БЦЖ в адьювантном лечении меланомы высокого риска прогрессирования с вовлечением лимфатических узлов [42, 70, 115, 123]. Ни одно из приведенных и проанализированных исследований не выявило статистически значимого улучшения результатов общей выживаемости по сравнению с группой наблюдения или плацебо.

В) Левамизол. В 2006 канадскими авторами были проанализированы данные публикаций результатов исследований по применению левамизола в адьювантной терапии у больных меланомой с высоким риском метастазирования [88, 91, 107, 116, 122]. Несмотря на то, что в исследовании Spittler and Sagebiel [116] были отмечены лучшие результаты лечения при применении левамизола по сравнению с группой пациентов, получавших плацебо, статистически достоверной разницы в общей 3-х и 5-ти летней выживаемости они не получили. В исследовании Quirt [107] была получена статистически достоверная положительная разница в 5-летней выживаемости у больных, получавших левамизол по сравнению с плацебо – группой. Было показано, что риск смертности уменьшается на 29 % в группе левамизола. Однако, при сравнении выживаемости по группам выяснилось, что разница является статистически незначимой. Loutfi [91] и Lejeune [88] также не получили статистически достоверной разницы в выживаемости у больных, получавших левамизол, и больных, получавших плацебо. Авторы публикации пришли к выводу о том, что несмотря на то, что левамизол оказывает положительное влияние на клиническое течение меланомы у пациентов группы

высокого риска метастазирования, однако, этот эффект не влияет на выживаемость.

Г) *Corynebacterium parvum*. В 1986 г. группой авторов во главе с N. Thatcher были опубликованы результаты исследования, проводившегося с 1977 по 1982 гг. [118]. Исследователи сравнивали общую продолжительность жизни и продолжительность жизни без прогрессирования у пациентов с меланомой II стадии, которым в адьювантном режиме после хирургического лечения вводилась *Corynebacterium parvum* (58 пациентов) с аналогичными показателями в контрольной группе (57 пациентов). Статистически значимых различий по вышеназванным показателям в данных группах выявлено не было.

#### 4. Гормонотерапия.

А) Мегестрола ацетат. В Клинике Мэйо (США) было проведено рандомизированное исследование, которое было призвано оценить эффективность применения мегестрола ацетата в качестве адьювантной терапии больных после хирургического лечения локальных форм меланомы [95]. В 2002 году были опубликованы результаты данного исследования [18]. Медиана продолжительности времени до прогрессирования в обеих группах не имела существенных различий. Существенные различия в медианах общей выживаемости также не были достигнуты. Таким образом, учеными был сделан вывод о том, что адьювантная терапия мегестролом ацетатом не влияет на увеличение продолжительности времени до прогрессирования и общей выживаемости у пациентов после хирургического лечения локализованных форм меланомы.

Б) Тамоксифен. В 2003 году на Американском Онкологическом Обществе группой ученых были доложены результаты проведенного метаанализа рандомизированных контролируемых исследований, посвященных использованию тамоксифена в качестве дополнительного агента к существующим стандартным режимам моно- и полихимиотерапии меланомы кожи [89, 119]. Всего были проанализированы результаты 6-ти таких исследований, проведенных

с 1992 по 1999 гг. Проведенная работа показала отсутствие статистически значимого увеличения общего ответа, полного ответа на лечение и общей выживаемости в случае добавления тамоксифена к стандартным режимам химиотерапии при лечении больных меланомой кожи.

5. Применение витамина D. Исследования зависимости уровня витамина D в сыворотке крови, экспрессии рецепторов к витамину D в нормальных меланоцитах и клетках меланомы проводились в течение длительного периода времени. Так, высказывались предположения о том, что витамин D подавляет способность клеток меланомы к инвазии [131], обладает антипролиферативным эффектом [50]. Группой авторов проводились исследования, в которых было показано, что витамин D уменьшает повреждающее действие внешних факторов на ДНК и обладает репаративным действием по отношению к ДНК [55]. В 2006 году в Оксфордском медицинском журнале были опубликованы данные проведенного когортного исследования, включавшего 47 800 чел., в результате которого была выявлена положительная связь между риском развития меланомы и увеличением уровня витамина D в сыворотке крови, однако данная связь была статистически не достоверна [68]. Группой авторов были опубликованы в 2009 году исследования, в определенной степени противоречащие этим данным, проведенные на группе больных меланомой кожи из 165 человек [102]. Оценивалась взаимосвязь уровня витамина D в сыворотке крови и риска развития рецидива заболевания, также взаимосвязь с толщиной опухоли по Бреслоу. Авторы утверждают, что уровень витамина D в сыворотке крови у больных, не имевших рецидива, был несколько выше, чем у больных, у которых рецидив заболевания наступил. Однако, эта разница оказалась статистически недостоверной. Соответственно, учитывая противоречивость получаемых данных, такое направление лечения больных меланомой кожи, как корригирование уровня витамина D в сыворотке крови, в настоящее время нельзя признать перспективным для дальнейшего исследования.

6. Применение изофлавоноидов соевых культур и других растительных препаратов. Повышенное внимание к исследованиям противоопухолевой

активности различных веществ, входящих в состав соевых культур, было обусловлено эпидемиологическими данными о том, что активное использование в рационе питания соевых культур жителями Средней Азии может быть связано с более низкими показателями онкологической заболеваемости. В частности, исследования генистеина показали, что он защищает ДНК клеток человека от повреждения свободными радикалами, образующимися в результате воздействия на кожу ультрафиолетового излучения. В 1990 году были опубликованы результаты исследования, согласно которым генистеин наравне с ингибиторами топоизомеразы II и тирозин-киназы ограничивают увеличение количества меланина в меланоцитах в некоторых клеточных линиях меланомы [53]. Также было высказано предположение, что генистеин останавливает развитие клеток меланомы в G2 фазе, тогда как дайдзеин индуцирует накопление клеток в фазе G1 [45]. В целом обзор исследований, проведенный американскими учеными в 2011 году [79], показал, что широкий набор растительных препаратов проявляет противоопухолевую активность в отношении меланомы. Механизмы действия этих агентов совершенно различны и проявление активности в отношении клеток меланомы также разное. Однако, дальнейшие поиски в этом направлении признаны не бесперспективными.

7. Применение регионарной гипертермической перфузии конечностей при транзиторных метастазах меланомы. Регионарная (изолированная) химиотерапевтическая перфузия – метод противоопухолевого воздействия в зоне локализации первичной опухоли и ее регионарных метастазов. Такое воздействие достигается высокими дозами цитостатиков и цитокинов. Подведение высоких доз противоопухолевых агентов обеспечивается искусственным (оксигенированным) кровообращением перфузируемой области. Стандартом регионарной химиотерапии стал препарат мелфалан, сочетающий высокую эффективность с низкой местной токсичностью. Регионарная перфузия возможна также с применением фактора некроза опухоли. Эффективность перфузии значительно повышается в условиях гипертермии. Регионарная перфузия применяется в лечении больных опухолью конечностей (в том числе



транзиторных или сателлитных метастазах меланомы в кожу конечностей), головы и шеи, малого таза, печени, легких [22, 23]. Представляют интерес два механизма действия высоких доз фактора некроза опухолей: цитотоксическое воздействие на опухоль и снижение ее васкуляризации [4].

Результаты лечения больных с транзиторными или сателлитными метастазами меланомы кожи в конечностях были доложены на Московском онкологическом обществе в 2013 году. В частности, в исследовании, проводившемся в 2008-2012 гг. на базе РОНЦ им.Н.Н.Блохина, общий эффект был отмечен в 12 из 14 случаев (при полных и частичных эффектах у 3 и 9 больных соответственно) т.е. 21,4% и 64,3% соответственно. Сохранение конечности было достигнуто в 95% случаев. Побочные эффекты были минимизированы благодаря должной изолированности перфузии. Практически не отмечено признаков системной токсичности, а уровень местной токсичности соответствовал I-II степени [25].

В исследовании, проводившемся на базе НИИ онкологии им.Н.Н.Петрова в 2004 – 2010 гг., изолированная перфузия выполнялась в связи с множественными транзиторными метастазами и/или сателлитами (22 чел.), либо после радикального удаления рецидивов (8 чел.) Частичный регресс опухоли был достигнут у 12 больных (56%) и стабилизация заболевания у оставшихся 10 больных (44%). Осложнения в виде местной токсичности I-II степени наблюдались у 98% больных. Системная токсичность, обусловленная сбросом цитостатиков в системную циркуляцию, не отличалась от токсичности стандартной химиотерапии и проявлялась в виде цитопении III-IV степени тяжести. Медиана периода без прогрессирования заболевания составила  $13,0 \pm 4,2$  мес. При этом, в группе сравнения из пациентов, которым в 2000-х гг. в НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова была проведена химиотерапия по стандартным, общепризнанным схемам без изолированной перфузии, аналогичный показатель составил только  $4,9 \pm 0,9$  мес. ( $p=0,039$ ). Таким образом, авторы исследования делают вывод о том, что изолированная гипертермическая перфузия при

транзиторных метастазах и сателлитах меланомы кожи конечностей может быть рекомендована в качестве средства локального контроля над заболеванием [4, 5].

Таким образом, история поисков эффективного лечения меланомы кожи, в особенности поздних стадий и прогрессирования после радикального лечения насчитывает не один десяток лет. Исследования в области малоинвазивной хирургии, применения различных лучевых методов лечения, регионарная гипертермическая перфузия конечностей, применение терапии, направленной на стимулирование иммунного ответа приносят или частичные, или неудовлетворительные результаты. В связи с этим, поиск эффективных комбинаций методов или лекарственных препаратов для лечения меланомы кожи является актуальной задачей для современных научных исследований.

#### **1.4 Современные стандарты лечения меланомы кожи**

Согласно практическим рекомендациям RUSSCO [11] по диагностике, лечению и наблюдению больных меланомой кожи для разных стадий заболевания применяются различные стандарты лечения. При лечении локальных стадий (I-II) необходимо радикальное иссечение первичной опухоли в пределах здоровой ткани с достаточными краями резекции от границы опухоли. Не рекомендуется рутинное выполнение профилактической лимфаденэктомии или проведение лучевой терапии на регионарные лимфатические узлы. Биопсия сторожевого лимфатического узла с последующей регионарной лимфаденэктомией при его поражении является необходимой процедурой при толщине опухоли >1,5 мм. Больным с высоким риском метастазирования (IIb стадия и более) рекомендовано проведение адъювантной терапии [30, 60, 97, 100].

В стандарт лечения больных меланомой кожи III стадии в обязательном порядке должно быть включено адекватное иссечение первичной опухоли, регионарная лимфаденэктомия должна выполняться всем пациентам, также

хирургическое лечение должно быть дополнено адъювантной иммунотерапией [21].

Стандартом лечения меланомы кожи IV стадии и нерезектабельной меланомы III стадии является проведение химиотерапии.

При метастатическом поражении головного мозга рекомендованы следующие методы лечения: хирургическое удаление единичных очагов и профилактическое облучение головного мозга; темозоломид 150 мг/кв.м. в 1-5 дни 28-дневного цикла, если ранее пациенту проводилась химиотерапия, и в дозе 200 мг/кв.м в том же режиме, если химиотерапия проводится впервые; или лечение производными нитрозомочевины (ломустин, кармустин, араноза, фотемустин); проведение стереотаксической радиохирургии при единичных очагах.

Хирургическое удаление метастазов может быть проведено в отдельных случаях у больных с хорошим соматическим статусом и изолированным опухолевым поражением. Паллиативная лучевая терапия проводится при поражении головного мозга или при симптомном поражении костей, мягких тканей и лимфоузлов. Для пациентов с особым типом изолированного метастазирования в виде поражения кожи и / или мягких тканей конечности может быть рекомендован метод изолированной гипертермической перфузии конечности. Проведение полихимиотерапии с включением дакарбазина, цисплатина, винкаалкалоидов, препаратов нитрозомочевины может увеличить частоту объективных ответов, но не приводит к увеличению времени до прогрессирования или выживаемости больных. Применение химиоиммунотерапии (сочетание дакарбазина, цисплатина, винкаалкалоидов, препаратов нитрозомочевины с интерфероном-альфа и / или интерлейкином-2) сопровождается значительным увеличением частоты объективных ответов на лечение, увеличением времени до прогрессирования, но не продолжительности жизни больных.

Пациентам всех групп рекомендовано предлагать участие в клинических исследованиях при наличии таковых в данном лечебном учреждении.

Однако необходимо признать, что международные клинические исследования, которые проводились на протяжении последних нескольких десятков лет, не выявили эффективных схем и препаратов для терапии поздних стадий меланомы. Проведенные клинические исследования убедительно доказывают, что традиционные подходы к лечению поздних стадий меланомы кожи недостаточно эффективны, а именно: медиана общей выживаемости не превышает 1 года; 1-летняя выживаемость не превышает 25 %; 5-летняя выживаемость не превышает 10%; частота объективного ответа менее 25 %.

Какие же выводы были сделаны учеными, прошедшими столь тернистый путь поисков за последние десятилетия новой истории? Они не вполне удовлетворительны. Современная диагностика на ранних стадиях заболевания и удаление опухоли – решающие факторы, которые позволяют сделать лечение меланомы кожи максимально успешным. Хирургическое лечение остается на данном этапе стандартом лечения болезни на ранних стадиях. Для лечения метастатической и неоперабельной меланомы стандартом являются химиотерапевтические препараты, такие как дакарбазин и препараты интерферона в различных режимах дозирования.

### **1.5 Сигнальный каскад RAS/RAF/MEK/MAPK (ERK) и его значение у больных меланомой кожи**

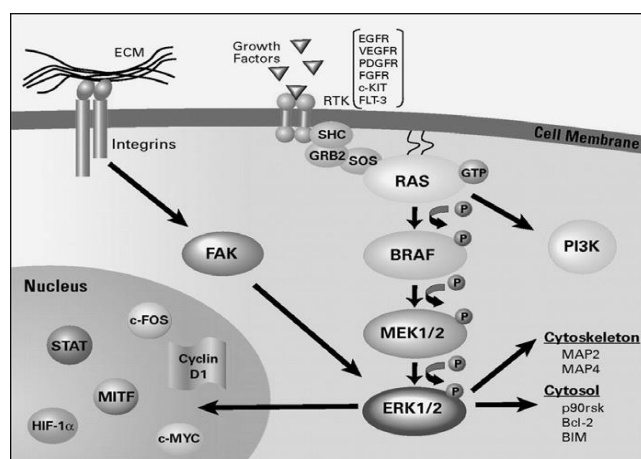
Последние десятилетия ознаменовались революционными изменениями наших представлений о молекулярной биологии опухолей. Было установлено, что трансформация нормальных меланоцитов кожи в клетки меланомы является результатом аккумуляции мутаций, включенных в клеточное деление, дифференцировку и апоптоз.

Молекулярно – генетический анализ образцов меланом выявил некоторые основополагающие закономерности. В частности, меланома оказалась рекордсменом по количеству мутаций на один геном – практически каждая

опухоль содержит тысячи соматических повреждений [63, 92]. Присутствие огромного количества изменений последовательности ДНК, подавляющее большинство из которых не играют функциональной роли и являются фоновыми, отражает значительную «канцерогенную нагрузку», которой подвергаются кожные покровы. Также важно, что количество мутаций в меланомах коррелирует с уровнем экспозиции кожных покровов к солнечным лучам. Наибольшее число мутаций при меланомах приводит к замене цитозина на тимин и затрагивает пиримидиновые димеры. Эта особенность характерна именно для мутагенного воздействия УФ лучей.

Необходимо отметить, что некоторые из этих мутаций являются значимыми, так как нарушают регуляцию ключевых клеточных сигнальных путей.

За последние годы удалось расшифровать сложный генетический профиль меланомы. Предметом интенсивного исследования стал сигнальный путь ERK: (RAS/RAF/MEK/ERK) - путь митоген-активируемой протеинкиназы, схема которого представлена на рисунке 1.4.



**Рис. 1.4. Сигнальный путь ERK [58]**

Сигнальные пути MAPK (к классу которых относится сигнальный путь ERK) содержат характерный модуль, состоящий из трёх протеинкиназ. Эти пути активируются внеклеточными сигналами, такими как гормоны, факторы роста,

хемокины и нейротрансмиттеры, которые распознаются соответствующими рецепторными тирозинкиназами или рецепторами, ассоциированными с G-белками. На следующем этапе происходит димеризация этих рецепторов, которые «передают» соответствующий сигнал на белок семейства RAS, от него – на белки семейства RAF (RAF-1, ARAF и BRAF), а затем на киназы MEK и ERK [124].

Активация этого пути может происходить также вследствие мутации в генах семейства RAS, RAF, регулирующих этот каскад. Из трех белков семейства RAS – HRAS, KRAS и NRAS – подавляющая часть активирующих мутаций приходится на NRAS [75, 78, 87]. А для белков семейства RAF (RAF-1, ARAF и BRAF) наибольшим значением обладает продукт гена BRAF. Имеющиеся мутации приводят к продукции «патологического» белка, что, в свою очередь приводит к постоянной активации сигнального пути митоген активируемой протеинкиназы, что в последующем, влечет за собой стимулирование пролиферации, а в дальнейшем - злокачественную трансформацию меланоцитов в клетки меланомы [36].

Впервые в ходе научных работ высокая частота BRAF онкогенных мутаций при меланоме была выявлена в 2002 году [52]. Соматические мутации гена BRAF выявляется в 40 – 88 % при местно-распространенных и метастатических формах меланомы [99]. Эти повреждения наиболее характерны для участков кожи, скрытых под одеждой и не подвергающихся постоянному солнечному воздействию.

Активация BRAF встречается чаще в меланомах, возникающих у молодых пациентов и, по всей видимости, связана с более агрессивным течением заболевания [90]. Отмечено также, что на ранней стадии заболевания мутации в гене BRAF выявлены только в 10 % случаев. Это позволяет предположить, что BRAF мутации отражают процесс прогрессирования заболевания, и, возможно, не участвуют в инициации меланом [38].

До 80 % BRAF мутаций приходится на вариант 1799T>A в 15 экзоне гена, приводящий к замене валина на глутаминовую кислоту в 600-ом аминокислотном остатке соответствующего полипептида (V600E), полученные в 2002 г. Davies с

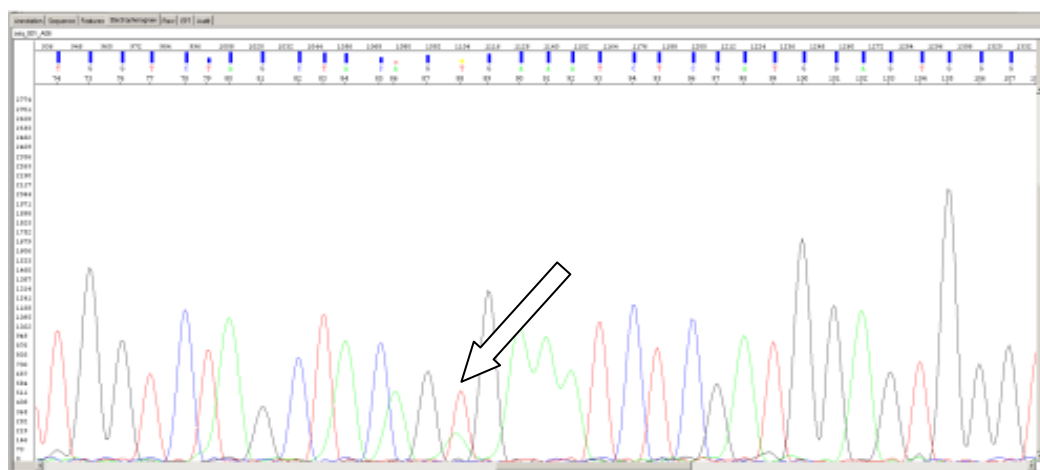
соавт. [52]. Изначально ей уделялось наибольшее внимание, однако, в ходе дальнейших работ были выявлены более редко встречающиеся мутации: замена валина на лизин, аргинин, аспарагиновую кислоту, метионин [65, 112], смысловые последовательности нуклеотидов в которых представлены в таблице 1.2.

**Таблица 1.2. Замена аминокислот в нуклеотидной последовательности GTG при мутации V600**

Аминокислота в нормальном белке	Исходная нуклеотидная последовательность	Нуклеотидная последовательность при мутации	Аминокислота в патологическом белке
Валин	GTG (гуанин-тимин-гуанин)	GAG (гуанин-аденин-гуанин) GAA (гуанин-аденин-аденин)	Глутаминовая кислота
Валин	GTG (гуанин-тимин-гуанин)	AAG (аденин-аденин-гуанин)	Лизин
Валин	GTG (гуанин-тимин-гуанин)	AGG (аденин-гуанин-гуанин)	Аргинин
Валин	GTG (гуанин-тимин-гуанин)	GAC (гуанин-аденин-цитозин)	Аспарагиновая кислота
Валин	GTG (гуанин-тимин-гуанин)	ATG (аденин-тимин-гуанин)	Метионин

Выявление описанных выше мутаций производится методом мутационно-специфической ПЦР. Для выполнения такого анализа используются олигонуклеотиды (зонды), комплементарные мутантным и нормальной последовательностям переменного участка ДНК. При использовании этого метода невозможно выявить «новые» мутации, т.е. те, которые не предусмотрены дизайном диагностического набора. В то же время этот метод обладает исключительной чувствительностью - он может обнаруживать мутированный ген даже в тех случаях, когда доля опухолевых клеток в образце составляет не более 1 %.

Проверяются результаты методом секвенирования по Сэнгеру. Серьезным преимуществом данного метода является его способность выявлять не только самую частую мутацию V600E, но и относительно более редкие варианты замен. Однако данный метод предъявляет очень высокие требования к качеству микродиссекции опухолевых клеток. Хотя минимальный порог трансформированных клеток в образце может в определенных ситуациях составить всего 25 - 30 %, в реальной диагностической практике этот показатель не должен опускаться ниже 50-70 %. Процедура микродиссекции практически не поддается автоматизации и не всегда удается достичь столь высокого присутствия опухолевых клеток в препарате. Это приводит к тому, что секвенирование часто дает ложноотрицательные результаты.



**Рис. 1.5. Выявление мутации V600E методом секвенирования**

На рисунке 1.5 стрелкой показана замена азотистого основания тимин на аденин в 1799 позиции, в связи с чем нуклеотидная последовательность приобрела иное смысловое значение: триплет нуклеотидов GTG (гуанин-тимин-гуанин), кодирующий аминокислоту валин, превращается в триплет GAG (гуанин-аденин-гуанин), кодирующий глутаминовую кислоту в 600-ом кодоне.

Мутации гена RAS (NRAS) в меланомах изучены в значительно меньшей степени по сравнению с мутациями BRAF. Это связано, в первую очередь с тем, что до недавнего времени для мутированных белков RAS не удавалось подобрать



эффективных терапевтических ингибиторов [34, 105]. В целом мутации RAS выявляются реже мутаций BRAF и наблюдаются примерно в 15% меланом [49], чаще встречаются в меланоммах слизистых оболочек [132].

Установлено, что в большинстве случаев мутации NRAS и BRAF не присутствуют вместе [59].

Соматические генетические повреждения в первой молекуле этого сигнального каскада – рецепторе KIT – выявляются при меланоммах в 1-3% случаев [39]. Тем не менее, существует 2 разновидности меланом, ассоциированных с этим событием. Это акральные меланомы (опухоли переходного эпителия верхних и нижних конечностей) [51], а также меланомы слизистых покровов [128]. Интерес к исследованию этих мутаций связан, прежде всего, с доступностью эффективного ингибитора мутированной тирозинкиназы KIT – препарата иматиниб и нескольких схожих по механизму действия лекарственных субстанций [72].

Неблагоприятные генетические события в контексте развития меланомы могут происходить не только в сигнальном каскаде MAPK. Относительно недавно в молекулярной биологии появилась принципиально новая технология – массивное параллельное секвенирование (секвенирование нового поколения, next generation sequencing - NGS) [12]. Эта методика является разновидностью секвенирования ДНК, для которой характерна очень высокая «производительность». Массивное параллельное секвенирование позволяет полностью «прочитать» геном каждого образца ДНК. Такие полногеномные исследования выявили ряд новых генов, вовлеченных в патогенез меланомы. Около трети опухолей содержат мутации в субъединице глутаматного рецептора, GRIN2A [126]. Роль глутаматных рецепторов ранее изучалась в контексте физиологии нервной системы, их возможная причастность к механизмам опухолевой трансформации представляется достаточно неожиданной. В 14% меланом обнаружены предположительно активирующие мутации в гене *PREX2*, который является негативным регулятором гена-супрессора *PTEN* [37]. В 10% случаев меланомы характеризуется аномалией в гене *PPP6C*. Который кодирует

каталитическую субъединицу фосфатазного комплекса PP6, он может играть роль супрессора злокачественной трансформации, участвуя в негативной регуляции клеточного цикла и митоза [82]. 5-10% меланом характеризуются повреждениями в гене *RAC1*. Этот белок сходен с молекулами семейства RAS, он принимает участие в регуляции цитоскелета и может играть роль в клеточной адгезии, инвазии и метастазировании [73, 82]. Такая же частота наблюдается для мутаций киназы STK19 и мультидоменного белка TRRAP, эти гены вовлечены, в частности, в регуляцию транскрипции [73, 125, 130].

Благодаря секвенированию нового поколения было выявлено еще одно интересное событие, а именно возможная причастность синонимичных мутаций к формированию злокачественного профиля клетки. В основе подобного феномена, по всей видимости, лежит изменение взаимодействия вовлеченного участка ДНК с комплементарной микроРНК [41]. «Синонимичными» или «молчащими» называют такие нуклеотидные замены, которые не меняют смысла кодирующего триплета. Например, замена тимина на цитозин в третьей позиции триплета ТТТ не отражается на аминокислотной последовательности белка, так как получившийся кодон - ТТЦ - также кодирует фенилаланин. В 2013 г. Gartner J.J. и соавторами [66] были опубликованы результаты полногеномного анализа образцов меланомы, который позволил выявить синонимичную мутацию в гене *BCL2L12* (F17F), которая встретилась в 12 (4%) из 285 опухолей. Эта мутация сопровождалась увеличением экспрессии продукта гена *BCL2L12* вследствие нарушения взаимодействия с микроРНК has-miR-671-5p.

Российские ученые также вносят значительный вклад в эту актуальную проблему. Рассмотрим некоторые результаты, полученные в ходе проведенных исследований.

Цель исследований, выполненных Аксененко М.Б. с соавт. [1] - оценить частоту мутации BRAF V600E у пациентов с меланомой кожи и ассоциацию данного вида мутации с клинико-морфологическими характеристиками заболевания. Проведен анализ мутации у 71 пациента с меланомой кожи, находившегося на лечении в КГБУЗ «Красноярский краевой онкологический

диспансер». Анализ мутации BRAF V600E осуществляли методом аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени. В результате, мутация V600E гена BRAF наблюдалась у 40,8 % больных, в 59,2 % случаев данный вид мутации не определялся. Выявлены некоторые особенности локализации и гистотип опухоли в зависимости от BRAF-статуса.

Гырылова С.Н. [7] в своей диссертационной работе показала, что BRAF – позитивные меланомы кожи в высокой степени присутствуют в популяции больных меланомой кожи – жителей Красноярского края. Также в работе было отмечено, что у больных меланомой кожи нарушена функциональная активность нейтрофилов, на что указывает снижение уровня translocator proteine в нейтрофилах периферической крови по сравнению показателем здоровых лиц. Лиганд translocator proteine РКП 195 обладает способностью вызывать изменение уровня апоптоза и пролиферации клеток меланомы; при этом РКП 195 потенцирует проапоптотический и антипролиферативный эффекты MEK-ингибиторов, что показывает возможность использования translocator proteine в качестве молекулярной мишени для оптимизации способов противоопухолевой терапии в отношении BRAF-положительной меланомы кожи.

В работе Черненко П.А. [26] показано, что мутация гена BRAF не связана с влиянием УФ-излучения и чаще наблюдается в группе больных меланомой кожи со средними (промежуточными) показателями солнечной экспозиции.

Было установлено, что большинство образцов меланомы кожи с отсутствием хронического солнечного повреждения (средние уровни ультрафиолетовой 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 ультрафиолетового излучения и чаще наблюдается в группе меланомы кожи со средними (промежуточными) показателями солнечной экспозиции.

В данной 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. Также в работе было показано, что возраст манифестации заболевания на материале, собранном в ФГБУ «РОИЦ им.Н.Н.Блохина» у пациентов с мутацией гена BRAF на 10 лет достоверно ниже по сравнению с пациентами без мутаций. В группе пациентов с мутациями в этом исследовании достоверно чаще встречалась толщина опухоли более 1 мм и достоверно чаще происходили местные рецидивы с поражением регионарных лимфатических узлов. Было показано, что наличие мутаций в гене BRAF ассоциировано со снижением общей и безрецидивной выживаемости, однако полученные результаты не достигли статистической значимости.

В результате исследований Наседкиной Т.В. с соавт. [19] разработан метод, позволяющий детектировать 13 наиболее часто встречающихся мутаций в гене EGFR (9 вариантов делеций в 19 экзоне, точковые мутации в 858 и 719 кодонах), 13 мутаций в 12, 13 и 61 кодонах гена KRAS и мутацию в 600 кодоне гена BRAF. Для выявления минорных фракций опухолевых клеток в клинических образцах использовали амплификацию последовательностей опухолевой ДНК с подавлением амплификации последовательностей дикого типа в ходе ПЦР с помощью LNA(locked nucleic acid)-олигонуклеотидов. Продукты реакции LNA-блокирующей ПЦР далее гибридизовали с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными в геле на поверхности биочипов. С использованием этого подхода протестированы образцы опухолевой ДНК 123 пациентов с немелкоклеточным раком легкого, преимущественно, аденокарциномами. Использовали как образцы свежзамороженной ткани, так и образцы, фиксированные в парафиновых блоках. В качестве референс-метода использовали секвенирование ПЦР продуктов, полученных из клинических образцов с обогащением опухолевыми клетками. Наличие мутации в гене BRAF исследовано в 93 образцах пациентов с меланомой. В качестве референс-метода использовали

аллель-специфичную ПЦР и секвенирование. Разработанный метод с использованием биочипов позволяет с высокой достоверностью обнаруживать мутации в генах EGFR, KRAS и BRAF независимо от метода фиксации клинического материала, если доля клеток, несущих мутацию, составляет не менее 1 %.

В первом всероссийском молекулярно – эпидемиологическом исследовании меланомы по поиску мутаций в гене BRAF [24] было проанализировано 1035 образцов меланом. Исследование проводилось с января по декабрь 2013 г., в нем участвовали 46 клинических центров РФ, расположенных в 7 субъектах Российской Федерации. Материал был получен от больных в возрасте от 19 до 89 лет, у которых диагноз впервые выявленной меланомы III–IV стадии или рецидива заболевания был установлен после 01.01.2012 г. Мутации V600 были выявлены в 627 (60,6%) образцах опухолей. На долю мутации V600E пришлось 89,3%, а мутация V600K встречалась в 8,3% случаев. Мутации с равной частотой наблюдались у пациентов мужского и женского пола (61,4 и 60,9% соответственно). Также было выявлено значительное преобладание мутированных форм гена BRAF у пациентов молодого и среднего возраста. Так, в группах до 30 и 30 - 40 лет мутации выявлены в 73,9 и 81% случаев соответственно. В старших возрастных группах доля опухолей с мутациями BRAF уменьшалась. Анализ корреляции мутационного статуса опухоли и локализации метастазов, проведенный в рамках исследования, показал, что опухоли с наличием мутации BRAF чаще вызывают вторичные поражения лимфатических узлов и кожи, чем опухоли с интактным геном BRAF. В исследовании также было установлено, что опухоли с мутацией BRAF часто располагаются на участках кожи, скрытых от постоянного солнечного облучения.

## 1.6 Современные лекарственные препараты

Успехи в исследовании сигнального пути MAPK и выявление мутаций в генах этого каскада послужило основой для активации разработок ряда новых таргетных препаратов [46, 61, 127].

В настоящее время продолжают исследования с обнадеживающими клиническими результатами препаратов – селективных ингибиторов белков сигнального каскада MAPK (Вемурафениб, Дабрафениб, Траметиниб, Кобиметиниб).

Международные исследования эффективности вышеназванных препаратов показали убедительные результаты.

Исследование BRIM2 [110] - международное, многоцентровое, открытое, несравнительное исследование II фазы, в которое было включено 132 пациента с ранее леченной метастатической меланомой с мутациями BRAF V600. В отличие от BRIM3, в исследовании BRIM2 включались пациенты, которые ранее получали терапию по поводу метастатической меланомы. Основной целью исследования была оценка наилучшего ответа на терапию. Обновлённые данные показали, что у 53% пациентов наблюдалось уменьшение опухоли (медиана продолжительности ответа составила 6,7 мес.) Пациенты, включенные в исследование BRIM2, жили в течение 6,7 мес. без ухудшения их заболевания (медиана выживаемости без прогрессирования). Профиль безопасности Вемурафениба в исследовании BRIM2 в целом соответствовал ранее полученным данным. У 26% пациентов был обнаружен плоскоклеточный рак кожи. Образования были удалены и пациенты продолжили лечение. Наиболее распространёнными нежелательными явлениями любой степени тяжести являлись боль в суставах, сыпь, повышенная чувствительность к солнечному свету и утомляемость.

Исследование BRIM3 - международное, многоцентровое, рандомизированное, открытое, контролируемое исследование III фазы по оценке эффективности и безопасности Вемурафениба по сравнению с дакарбазином у

больных неоперабельной местно-распространенной или метастатической меланомой с мутацией гена BRAF V600, ранее не получавших лечения [29, 47]. В исследование было включено 675 пациентов. Основными целями исследования являлись оценка общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования; дополнительными - оценка ответа на терапию, его продолжительности и профиля безопасности.

В данном исследовании было показано, что по сравнению с химиотерапией Вемурафениб на 63% снижает риск смерти (отношение рисков [HR]=0,37;  $p<0,0001$ ) и, кроме того, на 74% (HR=0,26;  $p<0,0001$ ) уменьшает риск ухудшения течения заболевания (выживаемость без прогрессирования - вторая основная цель исследования). Профиль безопасности Вемурафениба соответствовал ранее полученным данным.

В январе 2011 г. независимый наблюдательный комитет по мониторингу рассмотрел данные запланированного промежуточного анализа исследования BRIM3 и рекомендовал опубликовать его результаты в связи с убедительной демонстрацией эффективности Вемурафениба. Комитет также рекомендовал разрешить пациентам из группы химиотерапии переходить в группу Вемурафениба или получать данный препарат вместо химиотерапии.

На основании результатов клинических испытаний в 2011 году в США Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов сертифицировало препарат Вемурафениб. В 2012 году данный препарат одобрен в странах Европейского союза для лечения метастатической меланомы. В октябре 2013 года данный препарат зарегистрирован в России. С 2014 года препарат доступен для пациентов в России.

Мутации в генах, кодирующих белки семейства MEK, наблюдались как в первичных препаратах опухолей, так и были отмечены в ходе «приобретения» опухолью резистентности к ингибиторам BRAF. В связи с этим начались исследования комбинаций препаратов – ингибиторов BRAF и MEK [28, 74, 106, 121].

Кобиметиниб был разработан для избирательного блокирования активности белка MEK, одного из звеньев пути митоген - активируемой протеинкиназы. Кобиметиниб связывается с белком MEK, что позволяет прервать аномальное распространение сигнала, запускающего рост опухоли [111]. Было показано в доклинических исследованиях, что одновременное ингибирование MEK и BRAF предотвращает развитие приобретенной резистентности. На фоне блокирования парадоксальной активации сигнального пути MEK, которое возникает из-за ингибирования BRAF, отмечается уменьшение возникновения очагов гиперпролиферации. Задачей исследования соBRIM была оценка терапевтической комбинации Кобиметиниба 60 мг ежедневно и Вемурафениба 960 мг 2 раза в день в сравнении с монорежимом Вемурафениба 960 мг 2 раза в день. Исследование показало, что применение комбинации позволило пациентам с распространенной меланомой с мутацией BRAF V600, ранее не получавшим лечения, жить до одного года (медиана 12,3 месяца) без ухудшения течения заболевания или смерти (выживаемость без прогрессирования) в сравнении с 7,2 месяца при монотерапии препаратом Вемурафениб (относительный риск 0.58; 95% доверительный интервал 0,46-0,72) [86]. Частота объективных ответов составила 68% в группе двойной таргетной терапии и 45% в группе монотерапии ( $p < 0,0001$ ). При лечении комбинацией препаратов Вемурафениб + Кобиметиниб полный ответ достигнут 10% пациентов по сравнению с 4% в контрольной группе. Показатель 9-месячной общей выживаемости составил 81,1 и 72,5% в группах двойной и монотерапии соответственно ( $OR=0,65$ ;  $p=0,046$ ). В целом безопасность применения Вемурафениба и Кобиметиниба была сопоставимой с профилем безопасности в группе монотерапии [85, 96]. Таким образом, исследование соBRIM подтвердило увеличение эффективности комбинированной терапии ингибитором BRAF и ингибитором MEK по сравнению с монотерапией ингибитором BRAF больных меланомой кожи с мутацией BRAF V600. Вероятно, применение ингибиторов BRAF и MEK может стать новым стандартом таргетной терапии меланомы с мутацией BRAF V600. Схожие результаты показало исследование комбинированного применения ингибиторов BRAF и MEK



Дабрафениба и Траметиниба. Дабрафениб (является селективным ингибитором BRAF) и Траметиниб (является селективным ингибитором MEK) в сочетании у пациентов с метастатической меланомой и наличием мутации BRAF V600 сравнивается с применением одного Дабрафениба. Исследование COMBI-V [109] проводилось с июня 2012 по октябрь 2013 г. В исследование вошли пациенты с нерезектабельной или метастатической меланомой (стадия IIIС или IV) с мутацией BRAF V600E/К, ранее не получавшие противоопухолевую терапию. На основании результатов исследования был сделан вывод о том, что применение в первой линии комбинации препаратов Дабрафениб и Траметиниб улучшает общую выживаемость и выживаемость без прогрессирования по сравнению с терапией одним Вемурафенибом у больных нерезектабельной или метастатической меланомой кожи с мутацией BRAF V600E/К [69, 76]. С ингибированием BRAF, как уже было показано, связано возникновение резистентности опухоли и развитие плоскоклеточного рака кожи. Одновременное ингибирование BRAF и MEK уменьшает эти эффекты. В исследовании, сравнившем комбинацию Дабрафениб + Траметиниб и терапию Дабрафенибом, также было показано, что двойная терапия увеличивала частоту общих ответов, выживаемость без прогрессирования и снижала частоту развития плоскоклеточного рака кожи [40, 80].

Систематические исследования демонстрируют, что подавляющее число меланом являются моноклональными в отношении статуса BRAF [83]. Тем не менее, отдельные наблюдения свидетельствуют о том, что, по крайней мере в некоторых случаях, мутации BRAF могут демонстрировать внутриопухолевую гетерогенность [108]. Опубликованы данные о том, что ПЭТ-анализ ответа BRAF-мутированных меланом на Дабрафениб продемонстрировал неоднородность ответа опухолевых очагов у 6 из 23 пациентов (26%) [43]. Нельзя исключить, что в основе этого явления лежат именно вариации, формирующиеся в ходе прогрессии опухолевого клона.

Также существенных успехов в лечении метастатической меланомы удалось добиться с помощью современных препаратов иммунотерапии, так как меланома

относится к числу опухолей, которые могут активировать иммунный ответ. Задача иммунотерапии - активировать иммунную систему, запустить процесс распознавания и уничтожения опухолевых клеток. Сегодня для этого используются моноклональные антитела - вещества, которые воспринимают определенные молекулы в качестве антигенов, связываются с ними, тем самым активируя иммунные клетки. Один из таких препаратов – Ипилимумаб в настоящее время начал широко применяться для лечения метастазирующих и неоперабельных меланом на поздней стадии. Как и другие препараты из группы моноклональных антител, Ипилимумаб действует не на саму опухоль, а на иммунную систему, в результате чего организм начинает самостоятельно уничтожать опухолевые клетки. На поверхности Т-лимфоцитов находится рецептор CTLA-4. Ипилимумаб, являясь антителом, воспринимает этот рецептор как антиген и присоединяется к нему, тем самым активируя лимфоцит. При применении Ипилимумаба пятилетняя выживаемость больных достигает 16%. Препарат обладает эффективностью 80%, это проявляется в уменьшении размеров метастазов, снижении опухолевой интоксикации, повышении качества жизни [71]. Ипилимумаб дает более медленный эффект, чем Вемурафениб и другие ингибиторы BRAF. Но он действует более продолжительно. В большинстве случаев препарат переносится пациентами хорошо.

Одним из препятствий для активации иммунной системы становился белок PD-1. Это иммуноглобулин, молекулы которого встроены в клеточные мембраны. Он играет роль в запрограммированной клеточной гибели. Лиганд PD-L1 на поверхности опухолевой клетки соединяется с рецептором PD-1 на поверхности лимфоцита, что блокирует его «работу» по уничтожению злокачественного меланоцита. Препарат Пембролизумаб содержит моноклональные антитела, которые блокируют PD-1. Препарат помогает убрать «тормоз», благодаря чему лимфоциты приобретают способность атаковать опухолевые клетки. В Калифорнийском Университете Лос-Анджелеса было проведено клиническое исследование препарата Пембролизумаб. У 24% пациентов, получавших препарат в дозе 2 мг/кг, опухоль уменьшилась более чем на треть. Повторный рост

меланомы не отмечался, а эффект препарата сохранялся от 1,4 до 8,5 месяцев. Среди побочных эффектов у больных возникала повышенная утомляемость, кашель, тошнота, сыпь, кожный зуд, снижение аппетита, запор, диарея, боли в суставах [56].

Ниволумаб – также новый препарат из группы моноклональных антител. По механизму действия препарат представляет собой аналог Пембролизумаба. Он также блокирует рецептор PD-1, который снижает активность Т-лимфоцитов, не дает им распознавать и атаковать иммунные клетки. Эффективность Ниволумаба была изучена во время исследования, в котором приняли участие 120 больных с неоперабельной метастатической меланомой. В ходе применения препарата у 32% пациентов отмечалось существенное уменьшение размеров опухоли. Эффект сохранялся в течение 6 месяцев [57].

В настоящее время также обсуждается вопрос о последовательности применения комбинированной терапии ингибиторами белков BRAF и иммунотерапии современными моноклональными антителами. Этот вопрос стал изучаться в связи с тем, что одновременное применение препаратов этих групп вызывало недопустимую токсичность. В 2014 году были опубликованы данные исследования, сравнивавшего последовательности применения ингибитора BRAF Вемурафениба и Ипилимумаба. У 45 больных с метастатической меланомой в первую очередь применялся BRAF ингибитор Вемурафениб, а затем Ипилимумаб и у 48 больных применялся сначала Ипилимумаб, а затем - Вемурафениб. Медиана общей выживаемости в первом случае составила 9,9 мес., во втором – 14,5 мес. Комбинация Ипилимумаб, затем ингибитор BRAF Вемурафениб показала также лучшие результаты в выделенных подгруппах: для больных с повышенным уровнем ЛДГ - 14 мес. против 7,5 мес., для больных с метастазами в головной мозг – 12,3 мес. против 7,5 мес. [33].

История борьбы с меланомой, с одной стороны, является наглядным примером фатальности заболевания, сложности и многофакторности механизмов его развития, а, с другой стороны, примером того, как революционные изменения в клинической онкологии могут обеспечить прорыв в, казалось бы, безнадежном

направлении борьбы с одним из самых агрессивных онкологических заболеваний. Представляет большой клинический интерес не только продолжение исследований в области поиска эффективных комбинаций таргетных препаратов, но и выявление больных с повышенным риском неблагоприятного течения заболевания на основании как рутинных методов исследования, установления стадии опухоли, формы ее роста и т.д., так и по молекулярно – генетическому статусу больного. До настоящего времени комплексно не изучался вопрос, является ли наличие спектра мутаций в гене BRAF неблагоприятным прогностическим фактором и, в связи с этим, требуют ли больные с такими мутациями проведения более интенсивного лечения и дальнейшего наблюдения, чем больные без мутаций. По некоторым публикациям [73] таким прогностическим фактором может стать само наличие у больных меланомой кожи мутации в гене BRAF.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Характеристика клинического материала

В наше исследование были включены 110 больных из Московского региона, проходивших обследование и лечение по поводу меланомы кожи в ФГБУ РНЦПР МЗ РФ в период с 2003 по 2015 гг. Диагноз меланомы кожи больным был установлен и морфологически подтвержден в РНЦПР или других медицинских учреждениях с пересмотром стекол и блоков в РНЦПР. Критерием отбора больных была гистологически подтвержденная в РНЦПР меланома кожи. Всем больным было проведено хирургическое лечение (широкое иссечение кожи с опухолью с отступом рекомендованных границ, широкое иссечение п/о рубцов, широкое иссечение рецидивных опухолей мягких тканей, различные варианты лимфаденэктомии), которое, в зависимости от стадии заболевания и других факторов, дополнялось лекарственным (химиотерапия - дакарбазин, темодал, иммунотерапия препаратами интерферона, вакциноterapia - БЦЖ) и лучевым методами лечения. В наше исследование не включались больные, которым по различным причинам не проводилось лечение меланомы кожи, имевших место рецидивов или прогрессирования в соответствии с утвержденными в РНЦПР стандартами лечения, или сроки такого лечения существенным образом нарушались. Также в наше исследование не включались больные, принимавшие участие в программах клинических исследований современных таргетных препаратов. В наше исследование не были включены больные с увеальной меланомой и акрально – лентигинозной меланомой, так как мутации в гене BRAF не играют существенной роли в развитии этих заболеваний.

На нашем клиническом материале в 26,7% наблюдений меланомы кожи располагались на участках тела с повышенным уровнем экспозиции к солнечному излучению (голова, шея, верхние конечности), а в 73,3% на участках с более низкой экспозицией солнечного излучения (туловище и нижние конечности).

По причинам обращения всех больных можно разделить на следующие группы: первичное обращение по поводу меланомы кожи – 72,7% больных, обращение после нерадикального иссечения пигментного образования, при гистологическом исследовании которого была подтверждена меланома – 7,3%; по поводу местных рецидивов или прогрессирования меланомы после радикального лечения – 20,0%.

Больные были разделены на 2 группы:

Больные с наличием мутации в гене BRAF - 74 человека:

подгруппа А - больные с мутацией V600E - 63 (85,14%);

подгруппа Б - больные с мутацией V600K - 10 (13,51%);

подгруппа В - больные с мутацией V600R - 1 (1,35%).

Больные без мутации в гене BRAF - 36 человек.

Возраст больных варьировал от 20 лет до 91 года, в среднем составил 54,42 (51,25 ÷ 57,59) года. 48,18% (53) больных составляли мужчины, 51,82% (57) больных составляли женщины.

Для анализа распределения частот встречаемости меланомы кожи по возрастным группам нами была использована классификация возрастов, предложенная ВОЗ:

25 - 44 года - молодой возраст

45 - 59 лет - средний возраст

60 - 74 года – возраст поздней зрелости

75-89 лет – пожилой возраст

90 и старше – долгожители.

Мы разделили всех пациентов на 4 группы, ориентируясь на применяемую ВОЗ классификацию:

- 1 группа – пациенты до 44 лет
- 2 группа – пациенты 45-59 лет
- 3 группа – пациенты 60-74 лет
- 4 группа – пациенты от 75 лет и старше.

В дальнейшем все данные анализа по группам больных приводятся с учетом доступной информации о возрасте, стадии заболевания, гистологических характеристиках и другой информации из историй болезни пациентов.

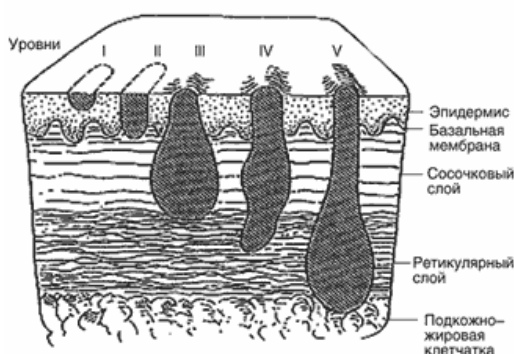
Группировка меланомы кожи по стадиям согласно TNM классификации [114] представлена в таблице 2.1.

**Таблица 2.1. Группировка меланомы кожи по стадиям в соответствии с TNM классификацией**

Стадия	T	N	M
Стадия 0	pT0, Tis	N0	M0
Стадия IA	pT1a	N0	M0
Стадия IB	pT1b pT2a	N0	M0
Стадия IIA	pT2b pT3a	N0	M0
Стадия IIB	pT3b pT4a	N0	M0
Стадия IIC	pT4b	N0	M0
Стадия IIIA	pT1a-4a	N1a, 2a	M0
Стадия IIIB	pT1a-4a pT1b-4b	N1b, 2b, 2c N1a, 2a, 2c	M0
Стадия IIIC	pT1b-4b Любая pT	N1b, 2b N3	M0
Стадия IV	Любая pT	Любая N	M1

У 78 больных нам были доступны данные о типе опухоли. У 46,15% больных меланома имела узловой тип роста, у 53,85% больных – поверхностно – распространяющийся и лентиго-меланома.

В 1967 году W.H. Clark на основании микроскопического исследования образцов меланомы кожи внедрил методику определения уровня инвазии опухоли в нижележащие слои дермы [10]. Впоследствии определение уровня инвазии опухоли, выполняемое по предложенной W.H.Clark методике, было включено в классификацию TNM меланомы, как один из факторов, основанных на анатомическом строении кожи и коррелирующих с возможным прогнозом болезни. В настоящее время уровень инвазии опухоли определяется согласно методике, разработанной W.H. Clark (рисунок 2.1).



**Рис. 2.1. Определение уровня инвазии меланомы по методике W.H. Clark**

Уровень I: все опухолевые клетки находятся в эпидермисе, до базальной мембраны.

Уровень II: клетки опухоли инфильтрируют сосочковый слой дермы.

Уровень III: опухоль достигает границы между сосочковым и сетчатым (ретикулярным) слоями дермы.

Уровень IV: опухолевые клетки обнаруживаются в сетчатом (ретикулярном) слое дермы.

Уровень V: опухоль прорастает в жировую клетчатку.

Выживаемость больных с меланомой кожи напрямую связана с уровнем инвазии опухоли. В таблице 2.2 приведены показатели общей 5-летней



выживаемости больных в зависимости от диагностированного уровня инвазии, так, если при инвазии опухоли только до базальной мембраны выживаемость может достигать 100%, то при поражении подкожной жировой клетчатки этот показатель может падать до 12%.

**Таблица 2.2. Пятилетняя выживаемость больных меланомой кожи в зависимости от уровня инвазии опухоли по W.H. Clark**

<b>Уровень инвазии по W.H. Clark</b>	<b>Выживаемость (%)</b>
Уровень I	100% - 98%
Уровень II	96% - 72%
Уровень III	90% - 46%
Уровень IV	67% - 31%
Уровень V	48% - 12%

В нашем исследовании уровень инвазии по W.H.Clark был определен у 85 больных, при этом I уровень инвазии был у 5,88% (5) больных, II уровень - у 23,53% (43) больных, т.е. опухоль достигала сосочкового слоя дермы, III уровень - у 50,59% (43), IV уровень инвазии – у 15,29% (13) больных и у 4 пациентов (4,71%) опухоль прорастала в подкожную жировую клетчатку и определялся V уровень инвазии.

В 1970 году А. Breslow разработал еще одну методику установления микростадии первичной меланомы кожи. Суть ее заключалась в измерении толщины опухоли или ее максимального вертикального размера в миллиметрах. Для этого используется микрометр, установленный в окуляре микроскопа, с помощью которого производится замер наибольшего вертикального сечения опухоли. Верхней границей этого замера служит гранулярный слой эпидермиса, а нижней - наиболее глубоко расположенные клетки меланомы в структурах дермы или подкожно - жировой клетчатки.

Проведенные многочисленные клинические исследования по изучению факторов прогноза меланомы кожи позволили выявить высокую значимость определения толщины опухоли, причем именно толщина опухоли оказалась

наиболее информативным показателем в оценке прогноза, превосходя все другие клинические и морфологические признаки в однофакторном анализе, в связи с чем TNM классификация меланомы кожи по признаку T основывается именно на толщине опухоли, измеряемой по методике А. Breslow.

В нашем исследовании толщина опухоли по А. Breslow была определена у 78 больных. При этом у 19,23% (15) пациентов имела место толщина опухоли до 1 мм включительно, у 32,05% (25) пациентов была определена толщина опухоли более 1, но менее 2 мм включительно, 24,36% (19) больных имели опухоль более 2, но менее 4 мм включительно и 19 больных (24,36%) имели опухоль толще 4 мм.

Как известно, меланомы могут содержать пигмент, а также быть беспигментными, что вероятнее всего объясняется тем фактом, что в процессе прогрессирования заболевания и утраты дифференцировки клоны опухолевых клеток теряют способность к накоплению пигмента. Пигментный статус опухоли в нашем исследовании был оценен у 107 пациентов. При этом у 81,31% (87) больных опухоли содержали пигмент, беспигментная опухоль была выявлена у 18,69% (20) больных.

Изъязвление опухоли является самостоятельным негативным прогностическим фактором и учтено в TNM классификации в виде присвоения литеры *b* в каждой стадии при наличии изъязвления. Прогноз пятилетней выживаемости в зависимости от изъязвления и толщины опухоли по Бреслоу по данным AJCC представлен в таблице 2.3.

**Таблица 2.3. Пятилетняя выживаемость больных меланомой кожи в зависимости от глубины инвазии и изъязвления**

<b>Глубина инвазии, мм</b>	<b>С изъязвлением</b>	<b>Без изъязвления</b>
меньше или равно 1,0	91%	95%
1,01 – 2,0	77%	89%
2,01 – 4,0	63%	79%
больше 4,0	45%	67%

Из данных таблицы видно, что при любой толщине опухоли 5-летняя выживаемость у больных с изъязвленными опухолями меньше, чем при отсутствии изъязвления.

В нашем исследовании оценка изъязвленности опухоли была проведена 98 больным. При этом опухоли без изъязвления встретились у 62,24% (61) больных, с изъязвлением – у 37,76% (37) больных.

Меланома относится к числу иммуногенных опухолей, т.е. распознаваемых иммунной системой человека. В настоящее время доказано, что лимфоидная инфильтрация и признаки регрессии опухоли имеют благоприятное прогностическое значение в течение многих злокачественных новообразований, в том числе – меланомы кожи. Они свидетельствуют об активации иммунной системы организма в борьбе с меланомой. Гистологические признаки регрессии встречаются в 10-56% случаев у больных меланомой кожи [2].

В нашем исследовании оценка лимфоидной инфильтрации была проведена 95 пациентам и очагов регрессии - 94 пациентам. Уровень лимфоидной инфильтрации определялся у 7 пациентов (7,37%), а наличие очагов регрессии было отмечено у 6 пациентов (6,38%).

## **2.2 Методы исследования**

Всем пациентам было проведено молекулярно-генетическое исследование, включающее поиск мутаций в «горячей точке» 15-го экзона гена BRAF в ДНК, выделенной из гистологического материала парафинового блока больных.

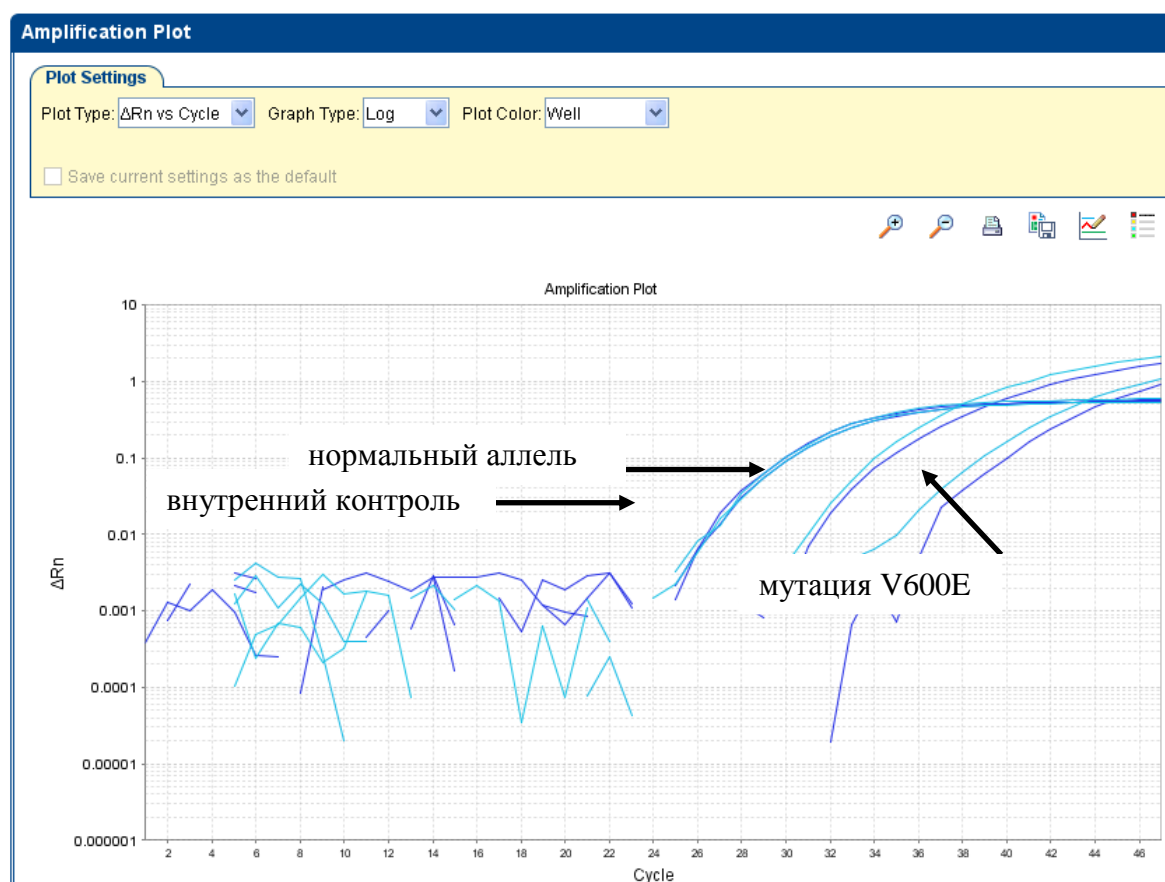
Исследование 70 блоков было проведено в лаборатории молекулярной биологии и цитогенетики ФГБУ РНЦПР. Геномную ДНК выделяли из полученных срезов гистологических образцов с помощью наборов Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Ambion, LifeTechnologies) и DNAClean&Concentrator-5 (ZymoResearch) методом сорбции нуклеиновых кислот на колонке.

ПЦР таргетного участка 15-го экзона гена BRAF для последующего секвенирования по Сэнгеру проводили с праймерами BRAF-F 5'-AATGCTTGCTCTGATAGGAA-3' и BRAF-R 5'-CAACTGTTCAAACCTGATGGG-3' по следующей программе амплификации: 95°C 3 мин, затем 35 циклов (94°C 20 сек, 61°C 30 сек, 72°C 40 сек) и 72°C 7 мин. После проведения реакции наличия специфических ПЦР - продуктов проверяли методом электрофореза в 1,5-2% агарозном геле. Мутационно - специфическую ПЦР в режиме «реального времени» проводили на амплификаторах «7500 Real Time PCR System» фирмы LifeTechnologies, наборами “Insider B-Raf” фирмы Евроген. Детекция таргетного фрагмента шла по каналу FAM. Каждый образец ставили в двух повторах. Анализ полученных кривых флуоресценции и детекцию мутации проводили в интегрированном с прибором программном обеспечении. ПЦР-продукты секвенировали по Сэнгеру для идентификации типа мутации.

Для исследования 40 блоков (лаборатория патогистологии НИИ урологии и интервенционной радиологии им.Н.А.Лопаткина) использовался набор RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Ambion, LifeTechnologies) и применялся метод сорбции нуклеиновых кислот на колонке. При наличии видимого окрашивания пигментом мембраны, получаемый препарат геномной ДНК дополнительно очищали с помощью сорбента с использованием набора АмплиПрайм ДНК-сорб-В. ПЦР участка экзона 15 гена BRAF для последующего секвенирования проводили с праймерами BRAF-F: 5'-AATGCTTGCTCTGATAGGAA-3' и BRAF-R: 5'-CAACTGTTCAAACCTGATGGG-3' при следующих температурных параметрах: 95°C 1 мин в течение 30 с, затем 35 циклов (95°C 45 с, 61°C 30 с, 72°C 20 с) и 72°C 1 мин. После проведения реакции проверяли наличие специфических ПЦР - продуктов с помощью электрофореза в 8% полиакриламидном геле при 400В в течение 1 часа с последующей окраской нитратом серебра. Аллель - специфическую ПЦР в реальном времени проводили на детектирующем амплификаторе StepOnePlus System с помощью набора TaqMan Mutation Detection Assay с использованием внутреннего контроля TaqMan Mutation Detection IPC Reagent Kit (Applied

Biosystems®). Применяемая комбинация праймеров/зонда для нормального аллеля – Hs00000172\_rf, для мутации V600E – Hs00000111\_mu, зонды были мечены флуоресцентным красителем FAM. Каждую амплификацию делали в двух повторениях и определяли среднее Ct. Анализ полученных кривых флуоресценции и детекцию мутации проводили в интегрированном с прибором программном обеспечении согласно рекомендациям производителя оборудования и наборов реагентов. Секвенирование ПЦР - продуктов осуществляли на капиллярном генетическом анализаторе 3500x1 (Applied Biosystems®). Предварительно ПЦР-продукты обрабатывали смесью экзонуклеазы I из E.coli и щелочной фосфатазы для нейтрализации непрореагировавших праймеров и dNTPs.

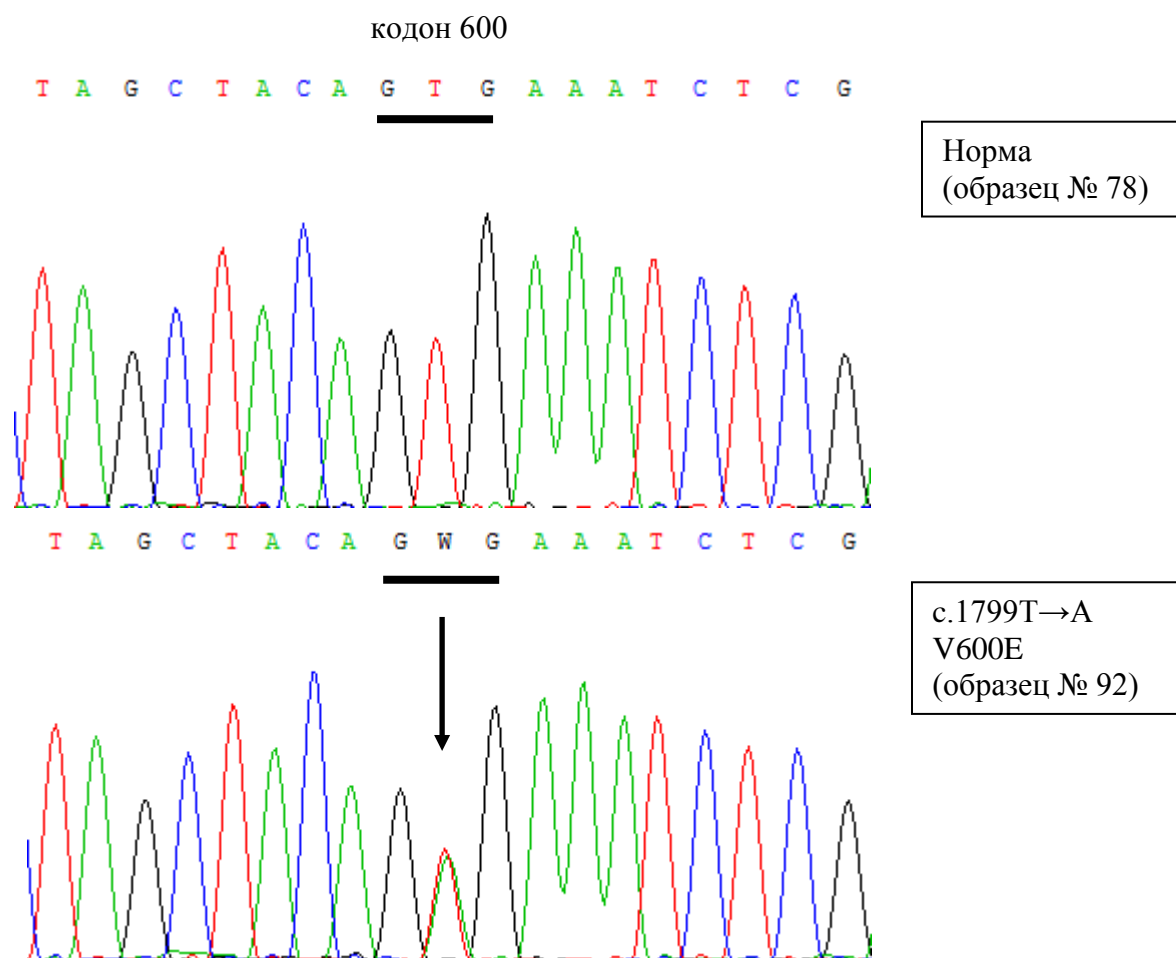
На рисунке 2.2 представлено графическое изображение результата определения мутации методом аллель-специфической ПЦР в реальном времени.



**Рис. 2.2. Определение мутации V600E гена BRAF методом аллель-специфической ПЦР в реальном времени (образец № 151)**

Реакцию синтеза меченых фрагментов по Сэнгеру проводили с набором BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®) по протоколу фирмы-производителя, в качестве праймера использовали BRAF-F.

На рисунке 2.3 представлено графическое изображение результатов определения мутации методом секвенирования по Сэнгеру.



**Рис. 2.3. Секвенирование мутации в 600 кодоне гена BRAF**

Методики ПЦР и секвенирования, использованные при выполнении нашего исследования, рекомендованы производителями соответствующего оборудования и сертифицированы для применения в медицинских исследованиях на территории РФ.

### 2.3 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных выполнена на персональном компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и пакета прикладных программ «Statistica for Windows» v.8.0, StatSoft Inc. (США). При этом соблюдались рекомендации для медицинских исследований. Основным критерием оценки было выявление взаимосвязей между наличием или отсутствием мутаций и клиническими или гистологическими показателями. В работе были применены следующие методы обработки данных:

- критерий Шапиро-Уилка для проверки на нормальность распределений (для оценки возможности использования параметрических или непараметрических критериев для сравнения рассматриваемых групп);

- критерий  $\chi^2$  для таблиц сопряженности признаков 2\*2, 2\*3, 2\*5 (для сравнения частот встречаемости признаков в анализируемых группах);

- сравнительный анализ переменных с помощью параметрического Т-критерия Стьюдента для несвязанных совокупностей (по результатам предшествующей проверки на нормальность; выбор данного критерия обусловлен его наибольшей мощностью для рассматриваемых групп);

- ранговый корреляционный анализ Спирмена (для выявления существования прямой и обратной связи между признаками);

- оценка функции выживаемости по методике Каплана-Мейера, при этом выбывшие из-под наблюдения пациенты оценивались по дате их последнего визита, время до прогрессирования определялось до даты прогрессирования/смерти больного, либо даты последнего контакта с больным;

- сравнение выживаемости в группах с использованием критерия Гехано-Пето.

Во всех случаях применялся 95% доверительный интервал и двусторонний р.

### **Глава 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ BRAF И ВЗАИМОСВЯЗИ ВЫЯВЛЕННЫХ МУТАЦИЙ С КЛИНИЧЕСКИМИ И ГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ, ПРОГНОЗОМ У БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ (РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ)**

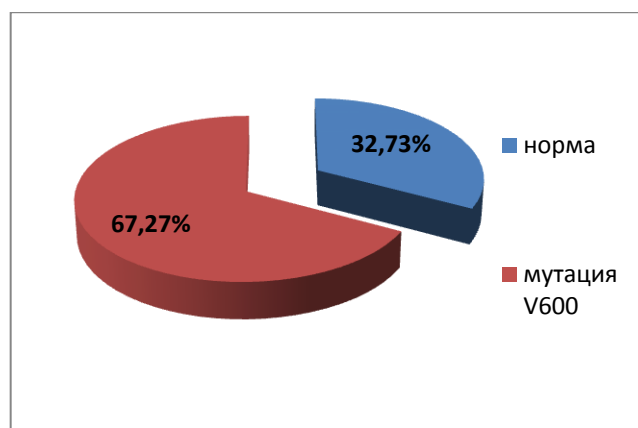
#### **3.1 Частота встречаемости мутаций V600 в генах семейства BRAF у больных меланомой кожи**

В данной работе нами определена частота встречаемости мутаций V600 в гене BRAF у больных меланомой кожи из Москвы и Московской области, проходивших лечение на базе ФГБУ РНЦПР в период с 2003 по 2015 гг. Проанализировано распределение больных с выявленными мутациями V600 по стадиям заболевания. Проанализирована зависимость мутационного статуса и таких клинических параметров как пол и возраст на момент установления диагноза, локализация на кожных покровах с различным уровнем экспозиции к солнечному излучению, уровень инвазии опухоли по Кларку, толщина опухоли по Бреслоу, стадия заболевания, также проанализирована взаимосвязь наличия мутаций с такими гистологическими характеристиками опухоли, как ее тип роста (узловой, поверхностно-распространяющийся, лентиго-меланома), пигментный статус, изъязвление, наличие признаков лимфоидной инфильтрации и очагов регрессии.

В работе использовались статистические методы сравнительного анализа данных, был проведен корреляционный и частотный анализ. Проведено сравнение общей выживаемости, безрецидивной выживаемости, безрецидивной выживаемости после радикального лечения рецидива опухоли с использованием метода Каплана – Майера и критерия Гехано – Пето.

В нашем исследовании был проанализирован мутационный статус гена BRAF у 110 больных.





**Рис.3.1. Частота встречаемости мутаций V600 в гене BRAF у больных меланомой кожи в настоящем исследовании**

Как видно на рисунке 3.1 мутации V600 в гене BRAF были выявлены у 74 (67,3%) больных, у остальных 36 (32,7%) - мутации выявлены не были. Полученные данные в целом соответствуют данным из международных и российских источников [49, 63, 73]. Однако, частота встречаемости BRAF-мутаций у больных Москвы и Московской области в нашем исследовании выше опубликованных общероссийских данных - 60,6% [24].

В результате предыдущих исследований было установлено, что мутации V600 в гене BRAF могут быть разных типов, когда замена валина происходит не только на глутаминовую кислоту, но на лизин, аргинин, аспарагиновую кислоту, метионин. В таблице 3.1 приведены обобщенные данные по частоте встречаемости различных типов мутаций [63, 65].

**Таблица 3.1. Частота встречаемости различных типов мутаций в 600-кодоне гена BRAF**

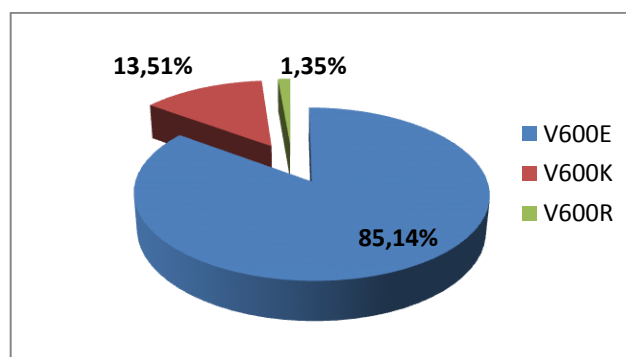
Обозначение мутации		От общего числа(%)	Замена валина
V600E	(Val600Glu)	70-80%	Глутаминовая кислота
V600K	(Val600Lys)	5-20%	Лизин
V600R	(Val600Arg)	1-5%	Аргинин
V600D	(Val600Asp)	меньше 1%	Аспарагиновая кислота
V600M	(Val600Met)	меньше 1%	Метионин

В ряде исследований и докладов также упоминались другие, более редко встречающиеся типы мутаций [24], которые приведены в таблице 3.2.

**Таблица 3.2. Частота встречаемости редких типов мутаций в гене BRAF**

Обозначение мутации	От общего числа (%)	Механизм мутации
K601E	0,2%	1803A>G
T599_V600insT	0,2%	c.1797_1798insACA
D594N	0,1%	c.1780G>A
L597S	0,1%	c.1789_1790CT>TC
K601N	0,1%	c.1803A>T

В нашем исследовании из 74 у 63 (85,1%) больных был выявлен вариант мутации V600E; а у 10 (13,5%) - V600K, и только у одного больного - мутация V600R. Другие, более редкие типы мутаций (V600D, V600M, K601E, T599\_V600insT, D594N, L597S, K601N), в нашем исследовании не встретились.

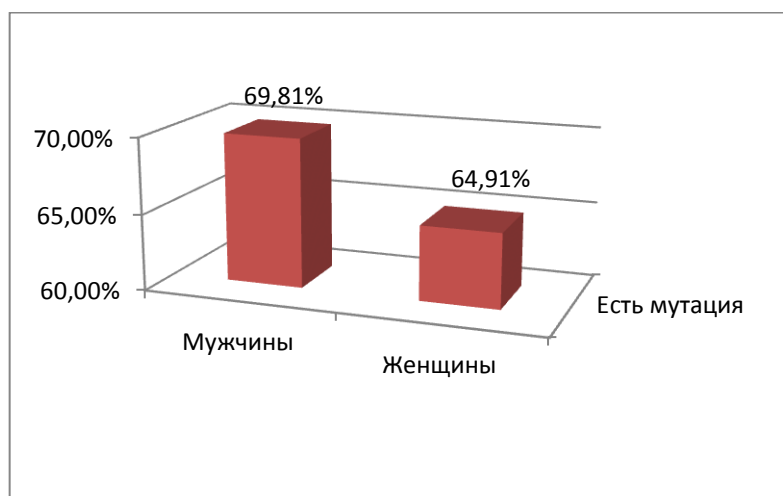


**Рис.3.2. Частота встречаемости различных типов мутаций V600 в гене BRAF у пациентов с меланомой кожи**

Как видно из рисунка 3.2 мутации V600E в нашем клиническом материале встречались несколько чаще, в 85,14% случаев, чем представлено в современных публикациях Частота встречаемости мутаций V600K (13,51%) и V600R (1,35%) находилась в рамках приводимых в публикациях интервалов.

### 3.2 Анализ распределения больных по полу, возрасту, локализации в зависимости от экспозиции к солнечному воздействию, стадиям

В нашем исследовании мутационный статус гена BRAF был определен у 53 мужчин (48,18%) и у 57 женщин (51,82%). Среди 53 мужчин мутации были выявлены несколько чаще - в 37 (69,81%) наблюдениях, а среди 57 женщин – в 20 (64,91%) (рисунок 3.3).



**Рис.3.3. Частота встречаемости мутаций в гене BRAF в зависимости от пола**

Для сравнительного анализа различий нами использовался критерий  $\chi^2$  таблицы сопряженности признаков 2\*2 (0,29), достоверные различия в частоте встречаемости мутаций у мужчин и у женщин нами получены не были. При проведении корреляционного анализа взаимосвязи двух признаков был рассчитан коэффициент Спирмена (R), его значение составило 0,0522, что подтверждает данные сравнительного анализа, а также литературные данные об отсутствии значимых различий в частоте встречаемости мутаций в гене BRAF у мужчин и у женщин.

Анализ частоты распределения пациентов с мутациями и без мутаций по возрастным группам показал, что частота мутаций в гене BRAF в группах молодого и среднего возраста была примерно одинаковой - 71,88% и 70,97% соответственно, что в среднем составило 71,43%.

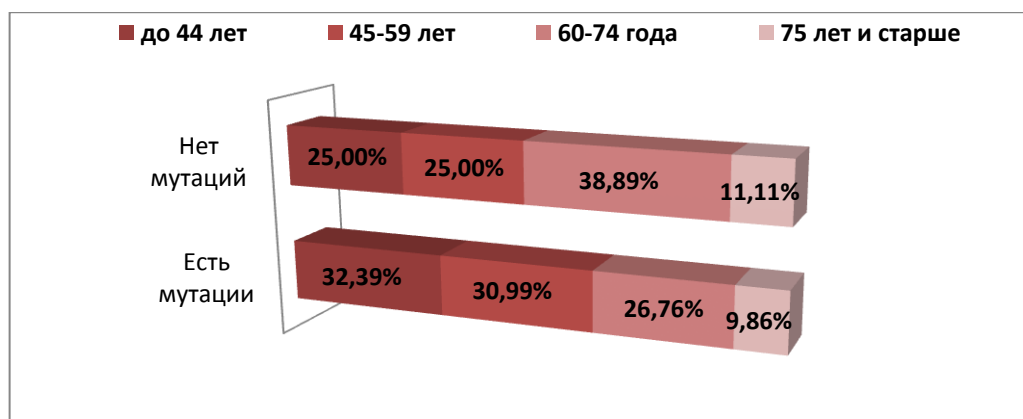
У пациентов в возрасте поздней зрелости и пожилого возраста мутации в гене BRAF встречались реже – 57,58% и 63,64% соответственно, что суммарно в среднем составило 59,09% (таблица 3.3).

**Таблица 3.3 Частота выявления мутаций в гене BRAF в различных возрастных группах**

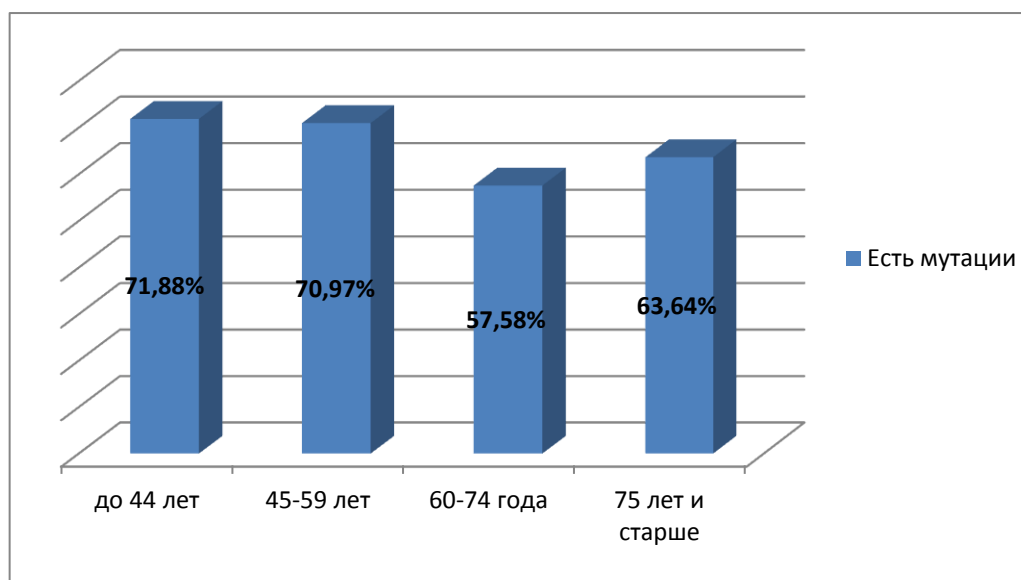
Возрастная группа(по классификации ВОЗ)	Группа I (мутации в гене BRAF +)	Группа II (мутации в гене BRAF -)
	число б-х (%)	число б-х (%)
Молодой возраст (до 44 лет), n=32	23 (71,88%)	9 (28,12%)
Средний возраст (45-59лет), n= 31	22 (70,97%)	9 (29,03%)
Возраст поздней зрелости (60-74 года), n =33	19 (57,58%)	14 (42,42%)
Пожилой возраст и возраст долгожителей (75 лет и старше), n = 11	7 (63,64%)	4 (36,36%)
<b>Итого:</b>	<b>71</b>	<b>36</b>

На рисунке 3.4 видно, что 63,38% больных с мутациями относятся к I и II возрастным группам, т.е. меланома кожи у таких больных начала развиваться в молодом и среднем возрасте. У больных без мутаций только в 50% случаев болезнь начала развиваться в молодом и среднем возрасте. Однако, при проведении сравнительного и корреляционного анализа статистически достоверных различий между первыми двумя и вторыми двумя группами нами получено не было.

На рисунке 3.5 представлен процент встречаемости больных с мутациями в различных возрастных группах. Из полученных нами данных видно, что в молодом и среднем возрасте частота встречаемости больных с мутациями выше, чем в возрасте поздней зрелости, пожилом и возрасте долгожителей.



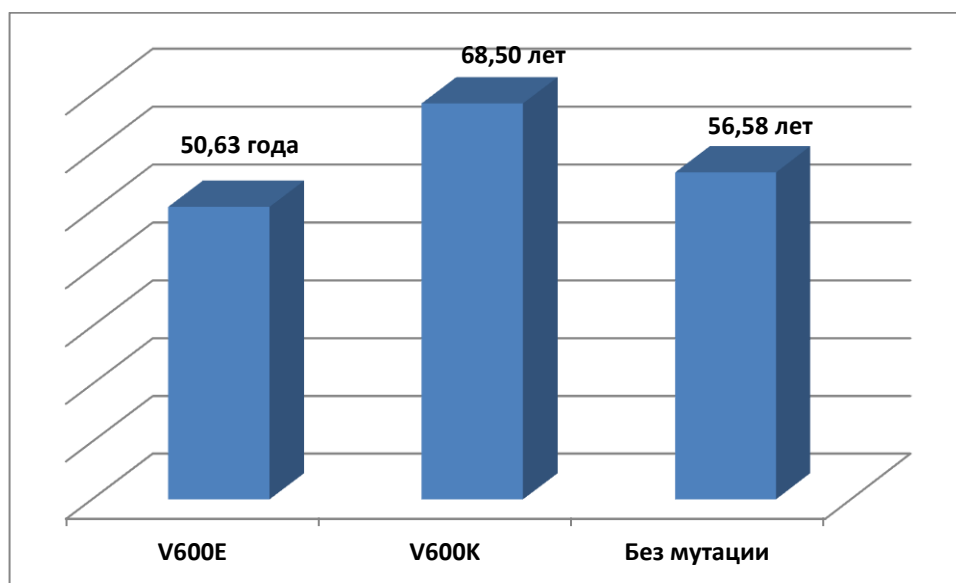
**Рис. 3.4. Доля больных разных возрастов в группе больных с мутациями и без мутаций**



**Рис. 3.5. Частота встречаемости больных с мутациями и без мутаций в различных возрастных группах**

Нами было проведено сравнение среднего возраста на момент манифестации заболевания у пациентов в группе с мутациями и без мутаций. Использовался t-критерий Стьюдента для несвязанных совокупностей. Средний возраст на момент установления диагноза у больных с мутациями был меньше (53,32 года), чем средний возраст больных в группе без мутаций - 56,58 лет. И хотя, у больных с мутациями средний возраст начала заболевания меньше, достоверных различий при таком сравнении нами не получено ( $p > 0,05$ ).

При анализе среднего возраста на момент установления диагноза по вариантам мутаций V600E и V600K в гене BRAF было выявлено, что средний возраст начала заболевания у больных с наиболее часто встречающимися мутациями V600E был ниже - 50,63 года, чем у пациентов с мутациями V600K – 68,50 лет и пациентов без мутаций – 56,58 лет (рисунок 3.6).

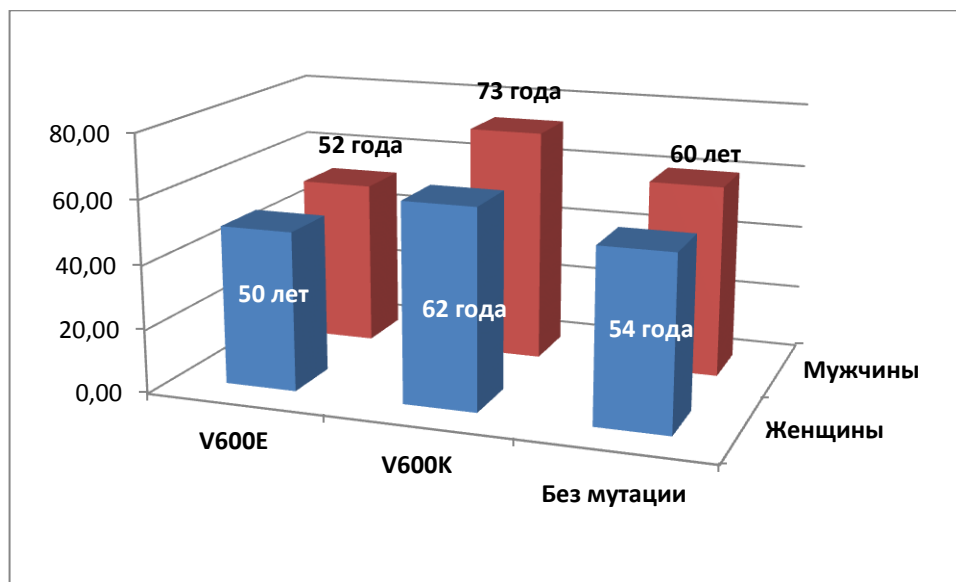


**Рис.3.6. Средний возраст начала болезни у пациентов с различными типами мутаций и без мутаций**

При сравнении 3-х групп пациентов (с мутациями V600E, V600K, без мутаций) нами были получены статистически значимые различия: средний возраст пациентов с мутацией V600E на момент установления диагноза достоверно меньше среднего возраста пациентов без мутаций ( $p < 0,05$ ); средний возраст установления диагноза у пациентов с мутацией V600K достоверно выше среднего возраста пациентов без мутаций ( $p < 0,001$ ).

При анализе среднего возраста манифестации заболевания у мужчин и у женщин с наиболее часто встречающимися вариантами мутаций V600E, V600K и без мутаций использовался t-критерий Стьюдента для несвязанных совокупностей, были получены, следующие данные: у больных с мутациями V600E средний возраст женщин составил 49,69 лет ( $44,63 \div 54,75$ ), мужчин –

51,71 год ( $45,32 \div 58,10$ ); у больных с мутациями V600K средний возраст женщин составил 62,00 года ( $25,69 \div 98,31$ ), мужчин – 72,83 года ( $63,25 \div 82,42$ ). Сравнение среднего возраста мужчин и женщин в группах с различными типами мутаций и без мутаций представлено на рисунке 3.7.

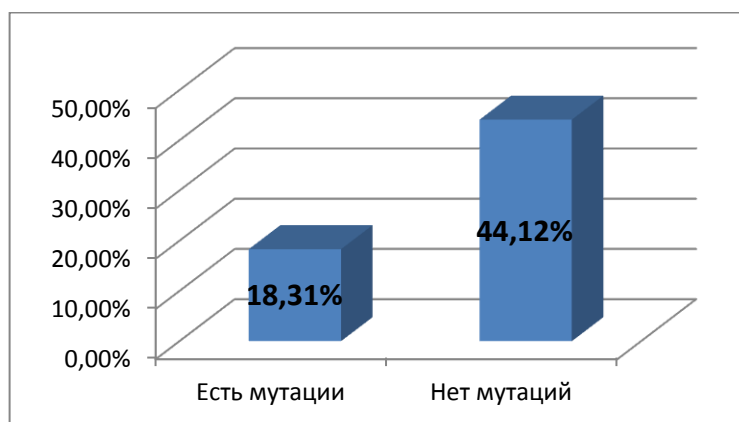


**Рис. 3.7. Средний возраст мужчин и женщин на момент установления диагноза в группах с различными типами мутаций и без мутаций.**

При анализе данных статистически значимых различий в возрасте начала заболевания у мужчин и у женщин в трех группах нами получено не было. Однако, можно отметить тенденцию, что во всех трех группах возраст начала болезни у женщин меньше, чем у мужчин.

В ряде исследований было показано, что меланома с мутациями в гене BRAF чаще возникает на кожных покровах, не подвергшихся хроническому солнечному излучению [26]. На рисунке 3.8 показана частота локализации опухолей на участках кожи, открытых для солнечного воздействия в группах больных с мутациями и без мутаций в нашем исследовании. У больных меланомой кожи без мутаций в гене BRAF опухоль чаще (в 44,12% наблюдений) располагалась на открытых участках кожи, подвергающихся хроническому солнечному воздействию, чем у больных с мутациями – у 18,31%. При

проведении корреляционного анализа взаимосвязи двух признаков был рассчитан коэффициент Спирмена (R), его значение составило (0,27). Различия достоверны ( $p < 0,05$ ).



**Рис.3.8 Распределение больных с расположением опухолей на открытых к солнечному воздействию участках кожи в группах с мутациями и без мутаций**

Данный факт показывает, что мутации в гене BRAF не связаны с воздействием УФ-излучения, которое является самостоятельным фактором канцерогенеза в развитии меланоцитарных опухолей кожи.

Анализ распределения больных по уровням инвазии меланомы кожи по W.H.Clark показал, что I-II-III уровни инвазии (опухолевые клетки достигают сосочкового и границы с ретикулярным слоем дермы) имели 84,21% пациентов с мутациями в гене BRAF, тогда как пациенты без мутаций - только в 71,43% случаев. IV-V уровни инвазии (опухоли, клетки которых обнаруживались в ретикулярном слое дермы и в подкожной жировой клетчатке), наоборот, чаще наблюдались у больных с отсутствием мутаций – у 28,57%, чем у больных с мутациями – у 15,79%. При этом у последних ни один больной не имел опухолевые клетки в подкожной жировой клетчатке, т.е. V уровень инвазии (см.таблицу 3.4).



**Таблица 3.4. Результаты распределения больных с мутациями и без мутаций по уровню инвазии согласно методике W.H.Clark**

Уровень инвазии	Группа I (мутации в гене BRAF +), число б-х (%)	Группа II (мутации в гене BRAF -), число б-х (%)
I уровень, n = 5	3 (5,26%)	2 (7,14%)
II уровень, n = 20	14 (24,56%)	6 (21,43%)
III уровень, n = 43	31 (54,39%)	12 (42,85%)
<b>Итого: n = 68</b>	<b>48 (84,21%)</b>	<b>20 (71,43%)</b>
IV уровень, n = 13	9 (15,79%)	4 (14,29%)
V уровень, n = 4	0 (0%)	4 (14,29%)
<b>Итого: n = 17</b>	<b>9 (15,79%)</b>	<b>8 (28,57%)</b>
Всего: n = 85	57 (100%)	28 (100%)

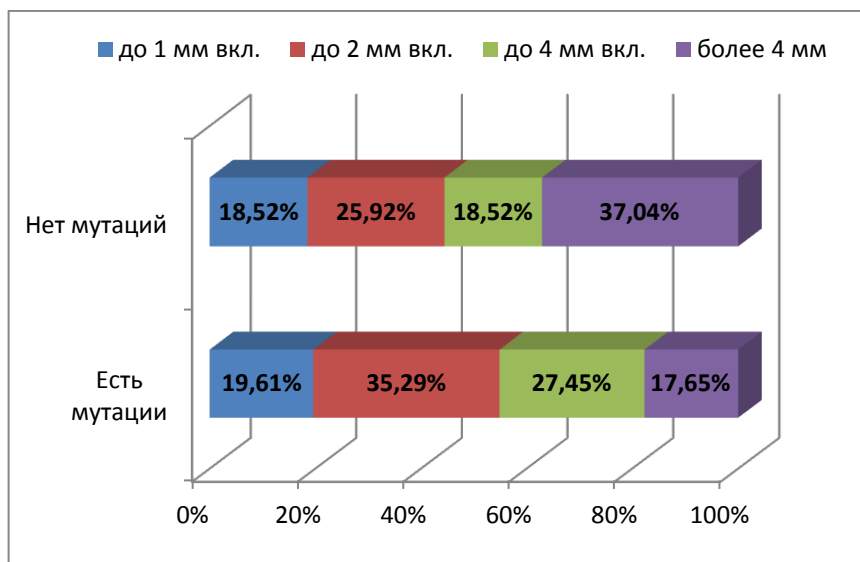
Для сравнительного анализа различий нами использовался критерий  $\chi^2$  таблицы сопряженности признаков 5\*2 (0,7), достоверные различия в распределении больных с мутациями и без мутаций по уровням инвазии нами получены не были.

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи двух признаков был рассчитан коэффициент Спирмена (R), его значение составило (-0,1027), что подтверждает данные сравнительного анализа об отсутствии значимых различий в распределении больных с мутациями и без мутаций по уровням инвазии по W.H.Clark.

При анализе распределения больных с мутациями и без мутаций по толщине опухоли по Бреслоу необходимо отметить, что 82,35% больных с мутациями имели толщину опухоли до 4 мм. У больных без мутаций опухоли толщиной до 4 мм составили 62,96%. Опухоли толщиной более 4 мм встречались чаще у больных без мутаций – в 37,04% случаев против 17,65% в группе больных с мутациями. Распределение больных по толщине опухоли представлено на рисунке 3.9.

Для сравнительного анализа различий нами использовался критерий  $\chi^2$  таблицы сопряженности признаков 2\*2 (3,8) – сравнивались группы опухолей до

4 мм включительно и больше 4 мм, нами получены достоверные различия в распределении больных с мутациями и без мутаций по толщине опухоли: у больных с мутациями достоверно чаще встречались опухоли толщиной до 4 мм, чем у больных без мутаций ( $p < 0,05$ ).



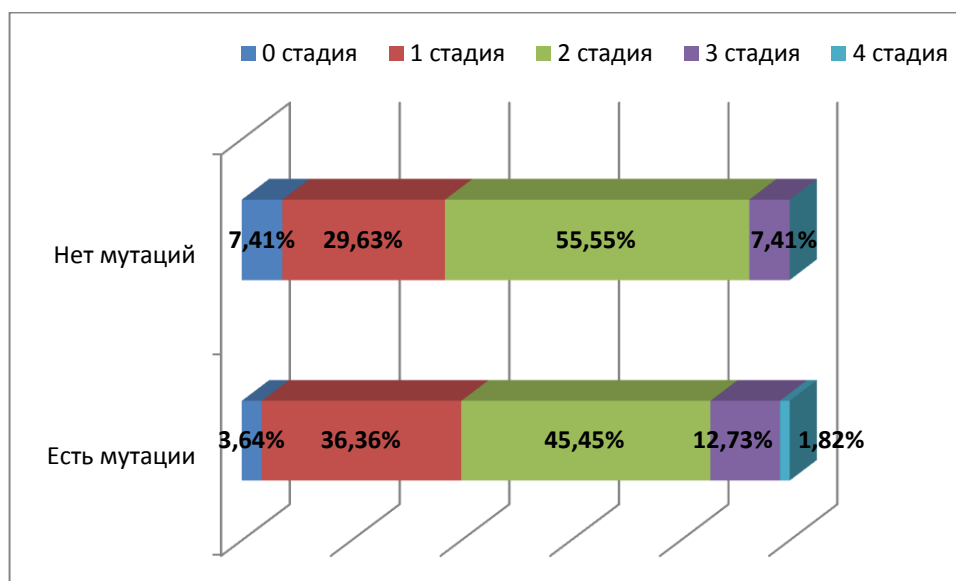
**Рис.3.9** Распределение больных с мутациями и без мутаций по толщине опухоли по Бреслоу

Уровень инвазии меланомы кожи по Clark и толщина опухоли по Бреслоу являются основополагающими факторами при определении стадии заболевания. Дополнительными факторами в оценке стадии заболевания является наличие или отсутствие изъязвления, поражение регионарных лимфоузлов и наличие отдаленных метастазов.

У 82 больных нам была известна стадия заболевания: меланома *in situ* имелась у 4 больных (4,88%), I стадия заболевания - у 28 больных (34,15%), II стадия - у 40 (48,78%), III стадия - у 9 больных (10,97%) и IV стадия была у одного больного (1,27%).

Среди больных с мутациями гена BRAF 0, I и II стадия заболевания были выявлены в 85,45% наблюдений, III-IV – у 14,55%. У больных без мутаций 0, I и II стадии меланомы отмечены в 92,59% наблюдений, III-IV – в 7,41%. Таким образом, в обеих группах больных преобладали пациенты с ранними стадиями заболевания (рисунок 3.10).

В данной ситуации необходимо отметить, что наибольшее число больных как с мутациями, так и без мутаций выявляются на ранних стадиях заболевания.



**Рис.3.10. Распределение больных с мутациями и без мутаций по стадиям заболевания**

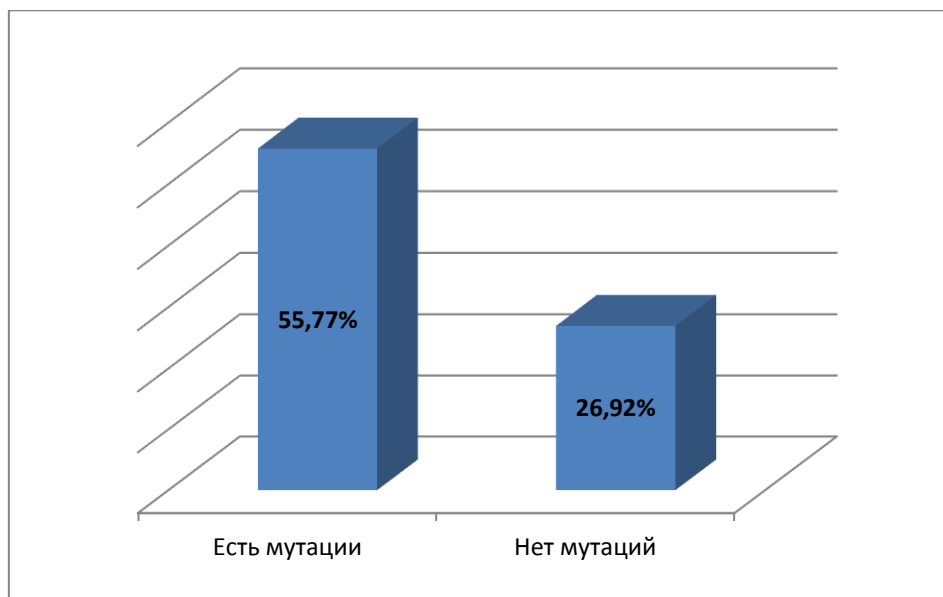
Для сравнительного анализа различий нами использовался критерий  $\chi^2$  таблицы сопряженности признаков  $5 \times 2$  (1,6), достоверные различия в распределении больных с мутациями и без мутаций по стадиям заболевания нами получены не были.

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи двух признаков был рассчитан коэффициент Спирмена (R), его значение составило 0,0311, что подтверждает данные сравнительного анализа об отсутствии значимых различий в распределении больных с мутациями и без мутаций по стадиям заболевания.

### **3.3 Анализ частоты неблагоприятных прогностических факторов при наличии мутации в гене BRAF**

Из трех основных форм опухолей: узловая, поверхностно – распространяющаяся и лентиго – меланома, первая характеризуется наиболее

неблагоприятным прогнозом. Мы разделили больных на 2 группы: в первую группу включили больных с прогностически более неблагоприятной формой опухолей - узловой, во вторую группу – больных с поверхностно – распространяющейся и лентиго – меланомой. Распределение больных по типам опухолей представлено на рисунке 3.11.



**Рис.3.11 Распределение больных с узловой формой опухолей в группах больных с мутациями и без мутаций**

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи двух признаков был рассчитан коэффициент Спирмена (R), его значение составило (-0,2975), что свидетельствует об отсутствии значимых различий в распределении больных с мутациями и без мутаций по типам опухоли.

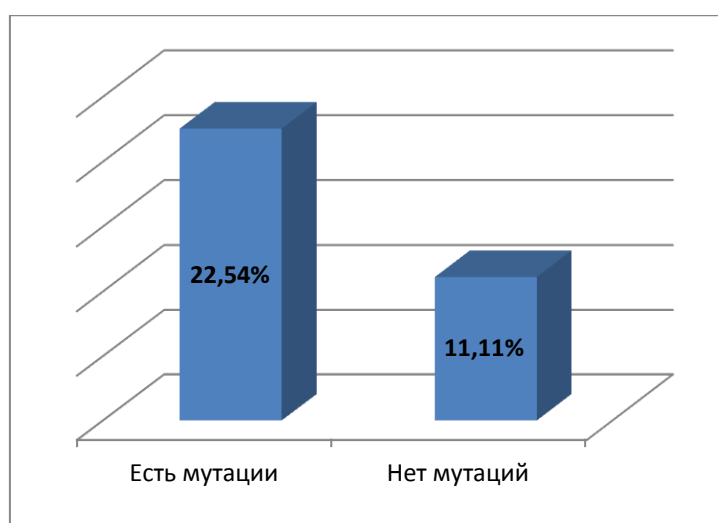
Несмотря на отсутствие данных за статистически значимые различия частоты распределения больных с мутациями и без мутаций по типам опухоли, имеется тенденция превышения доли больных с мутациями в группе узловых опухолей над долей в группе поверхностных опухолей, что также может свидетельствовать о более агрессивном течении болезни при наличии мутации.

Распределение больных по пигментному статусу представлено в таблице 3.5.

**Таблица 3.5. Результаты распределения больных с мутациями и без мутаций по пигментному статусу опухоли**

Пигментный статус опухоли	Группа I (мутации в гене BRAF +) число б-х (%)	Группа II (мутации в гене BRAF -) число б-х (%)
Пигментная, n = 87	55 (77,46%)	32 (88,89%)
Беспигментная, n = 20	16 (22,54%)	4 (11,11%)
Всего, n = 107:	71 (100%)	36 (100%)

Из представленных в таблице данных видно, что более 80% опухолей больных без мутаций содержат пигмент, а у пациентов с мутациями доля беспигментных опухолей выше, чем в группе пациентов без мутаций. На рисунке 3.12 представлена частота беспигментных опухолей у больных с мутациями и без мутаций в гене BRAF.



**Рис.3.12. Частота беспигментных опухолей у больных с мутациями и без мутаций в гене BRAF**

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи двух признаков был рассчитан коэффициент Спирмена (R), его значение составило 0,14, различия не достоверны ( $p > 0,05$ ).

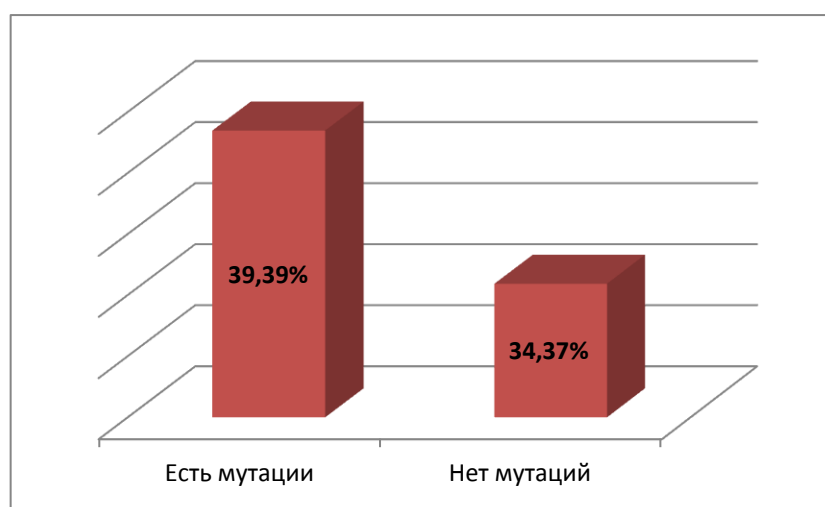
Несмотря на отсутствие статистически значимых различий в данном случае, имеется тенденция превышения частоты встречаемости беспигментных опухолей в группе больных с мутациями, что, по всей видимости, также свидетельствует о более агрессивном течении болезни при наличии мутации, так как считается, что беспигментные опухоли являются прогностически более неблагоприятными.

Распределение больных по отсутствию или наличию изъязвления в группе больных с мутациями и без мутаций представлено в таблице 3.6.

**Таблица 3.6. Результаты распределения больных с мутациями и без мутаций по отсутствию или наличию изъязвления**

Пигментный статус опухоли	Группа I (мутации в гене BRAF +) число б-х (%)	Группа II (мутации в гене BRAF -) число б-х (%)
Без изъязвления, n = 61	40 (60,61%)	21 (65,63%)
С изъязвлением, n = 37	26 (39,39%)	11 (34,37%)
Всего, n =98:	66 (100%)	33 (100%)

Распределение частоты изъязвленных опухолей в группах больных с мутациями и без мутаций представлено на рисунке 3.13.



**Рис.3.13. Частота изъязвленных опухолей у больных с мутациями и без мутаций в гене BRAF**

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи двух признаков был рассчитан коэффициент Спирмена (R), его значение составило 0,05, что отсутствуют значимые различия в распределении больных с изъязвлением в группах с мутациями и без мутаций.

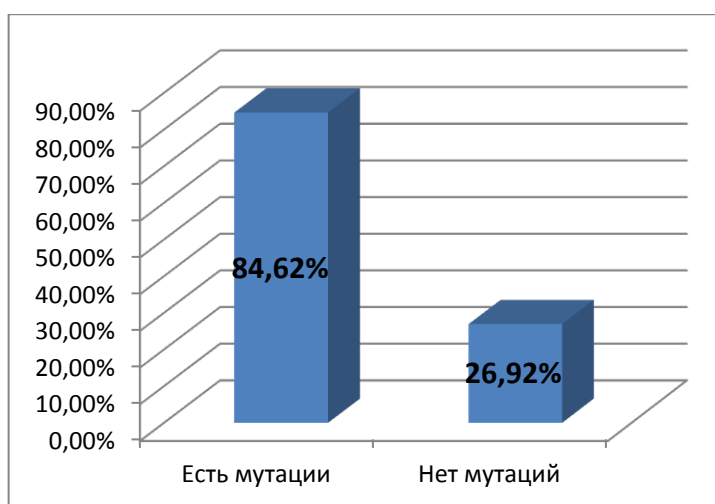
Несмотря на отсутствие данных за статистически значимые различия в данном случае, имеется незначительное превышение доли больных с мутациями в группе изъязвленных опухолей над группой неизъязвленных, что, по всей видимости, также может свидетельствовать о более агрессивном течении болезни при наличии мутации, так как фактор изъязвления является самостоятельным неблагоприятным прогностическим признаком.

Анализ признаков более агрессивного течения заболевания (узловая, изъязвленная и беспигментная формы) среди больных с мутациями и без мутаций в гене BRAF в совокупности представлен в таблице 3.7.

**Таблица 3.7 Частота выявления отдельных неблагоприятных форм меланомы кожи у больных с мутациями и без мутаций в гене BRAF**

Форма опухоли	Группа I (мутации в гене BRAF +)	Группа II (мутации в гене BRAF -)
	(%)	(%)
Узловая, n = 36	55,77%	26,92%
Изъязвленная, n = 37	39,39%	34,38%
Беспигментная, n = 20	22,54%	11,11%

В целом, прогностически неблагоприятные, более агрессивные формы меланомы кожи – узловая, изъязвленная и беспигментная формы среди больных с мутациями в гене BRAF встречались достоверно чаще - у 84,62%, чем без мутаций – у 26,92%, различия достоверны ( $p < 0,05$ ) (рисунок 3.14).



**Рис.3.14 Частота встречаемости признаков агрессивности течения заболевания в группах с мутациями и без мутаций**

### **3.4 Анализ частоты лимфоидной инфильтрации и очагов регрессии в тканях опухоли у больных с мутациями и без мутаций**

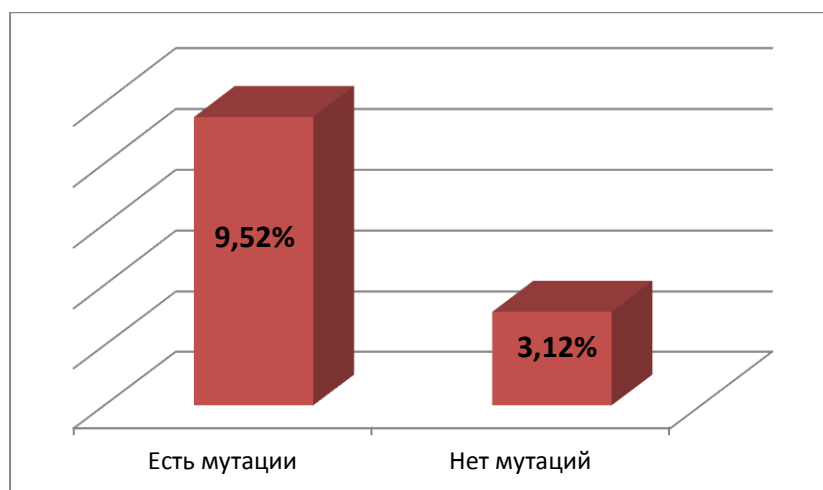
Распределение больных в зависимости от наличия лимфоидной инфильтрации в группах больных с мутациями и без мутаций представлено в табл. 3.8.

**Таблица 3.8. Результаты распределения больных с мутациями и без мутаций в зависимости от наличия лимфоидной инфильтрации**

Лимфоидная инфильтрация	Группа I (мутации в гене BRAF +)	Группа II (мутации в гене BRAF -)
	число б-х (%)	число б-х (%)
Нет, n = 88	57 (90,48%)	31 (96,88%)
Есть, n = 7	6 (9,52%)	1 (3,12%)
Всего, n = 95:	63 (100%)	32 (100%)

Из данных таблицы видно, что опухоли большей части проанализированных больных не содержали признаков лимфоидной инфильтрации, а среди пациентов с мутациями лимфоидная инфильтрация опухолей встречалась чаще (рисунок 3.15).





**Рис.3.15 Частота встречаемости лимфоидной инфильтрации у больных с мутациями и без мутаций в гене BRAF**

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи двух признаков был рассчитан коэффициент Спирмена (R), его значение составило 0,12, что свидетельствует об отсутствии значимых различий в частоте встречаемости лимфоидной инфильтрации в 2-х анализируемых группах больных.

Несмотря на отсутствие данных за статистически значимые различия в данном случае, имеется превышение доли больных с лимфоидной инфильтрацией в группе больных с мутациями.

Распределение больных в зависимости от наличия в опухоли очагов регрессии представлено в таблице 3.9.

**Таблица 3.9. Результаты распределения больных с мутациями и без мутаций в зависимости от наличия очагов регрессии**

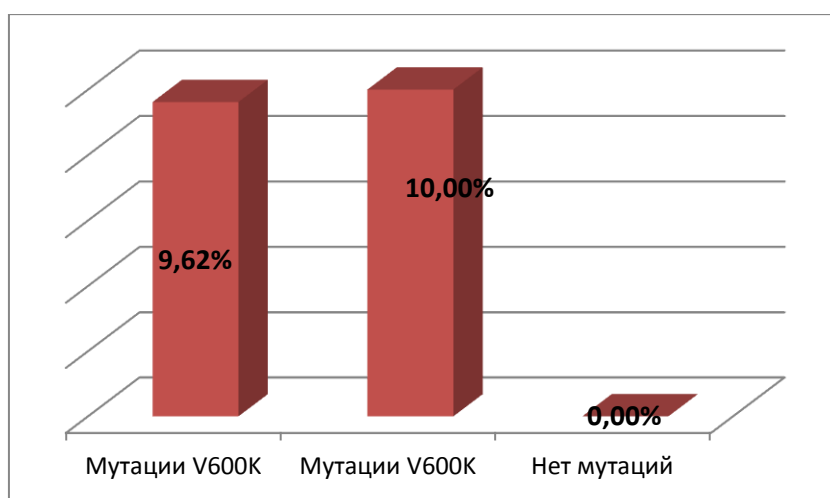
Очаги регрессии	Группа I (мутации в гене BRAF +)	Группа II (мутации в гене BRAF -)
	число б-х (%)	число б-х (%)
Нет, n = 88	57 (90,48%)	31 (100%)
Есть, n = 6	6 (9,52%)	0 (0%)
Всего, n = 94:	63 (100%)	31 (100%)

Из представленных данных в таблице можно отметить, что большее число опухолей не содержало очагов регрессии, а среди опухолей без мутаций очагов регрессии встречено не было.

Для сравнительного анализа различий нами использовался критерий  $\chi^2$  таблицы сопряженности признаков  $2 \times 2$  (3,15), достоверные различия в распределении больных с мутациями и без мутаций в группах опухолей без очагов регрессии и с наличием очагов регрессии нами получены не были.

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи двух признаков был рассчитан коэффициент Спирмена (R), его значение составило 0,1832, что подтверждает данные сравнительного анализа об отсутствии значимых различий в распределении больных с мутациями и без мутаций в зависимости от отсутствия или наличия очагов регрессии.

Было проведено более углубленное изучение этого вопроса и выявлено, что у больных с наиболее часто встречающимися вариантами мутаций V600E и V600K достоверно чаще встречались очаги регрессии, чем у больных без мутаций (рисунок 3.16).



**Рис.3.16 Частота встречаемости гистологических признаков регрессии в группах с мутациями V600E, V600K и без мутаций**

Для сравнительного анализа различий нами использовался критерий  $\chi^2$  таблицы сопряженности признаков  $2 \times 2$ . Для сравнения групп с мутацией V600E и

без мутаций значение  $\chi^2$  составило 3,7; для сравнения групп с мутацией V600K и без мутаций значение  $\chi^2$  составило 3,8. Данные значения критерия свидетельствуют о наличии достоверных различий с уровнем значимости  $\alpha=0,05$ .

Выявленная тенденция по превышению доли больных с лимфоидной инфильтрацией в группе пациентов с мутациями, а также полученные статистически значимые различия в частоте встречаемости очагов регрессии у больных с мутациями V600E и V600K, чем у больных без мутаций могут свидетельствовать о возможно более активной реакции иммунной системы на опухолевые клетки, у больных с мутациями.

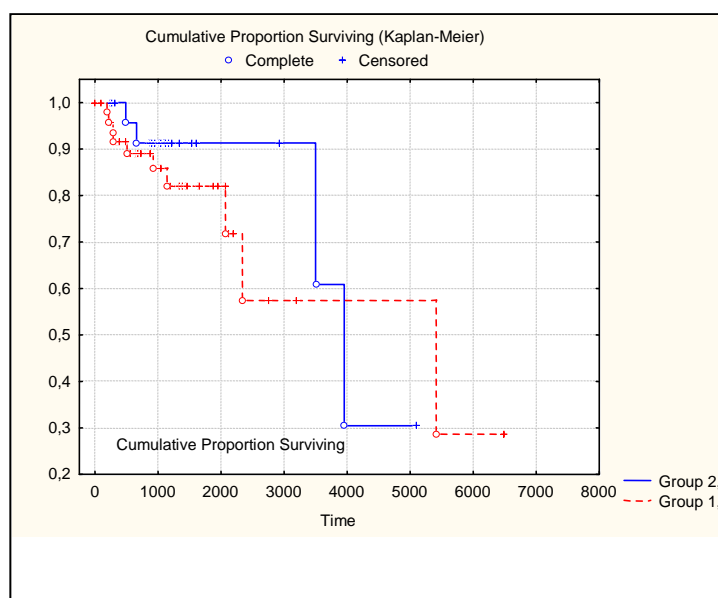
Следует отметить, что при анализе литературных источников нами были встречены работы, в которых обсуждаются особенности функционирования иммунной системы у пациентов с BRAF-мутированными меланомами [77], в частности отмечается, что в таких опухолях обнаруживается ряд различных активированных клеток иммунной системы, часть из которых при применении ингибиторов BRAF теряет свою активность.

### **3.5 Анализ выживаемости**

Для проведения сравнения характера течения заболевания и прогноза после лечения у больных с мутациями и без мутаций в гене BRAF нами были рассчитаны показатели общей выживаемости в двух группах, безрецидивной выживаемости и безрецидивной выживаемости после лечения рецидива опухоли. Для обработки результатов мы использовали оценку функции выживаемости по методике Каплана-Мейера и проводили сравнение выживаемости в группах с использованием критерия Гехано-Пето, а также использовали методику частотного анализа для описанных показателей через 1, 3 года и 5 лет после лечения.

Все больные проходили лечение в ФГБУ РНЦЦ МФ согласно утвержденному научному протоколу, стандарт лечения включал в себя в обязательном порядке хирургическое лечение с соблюдением рекомендуемых границ отступов (либо широкое иссечение послеоперационного рубца после нерадикального хирургического лечения), в дальнейшем, в зависимости от стадии заболевания, проводилась иммуно- и/или химиотерапия. В некоторых случаях лечение дополнялось лучевой терапией.

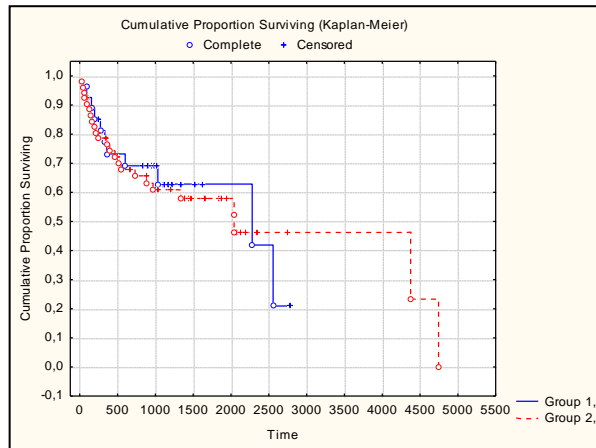
На графике представлены кривые общей выживаемости больных для группы 1 – с мутациями и группы 2 – без мутаций (рисунок 3.17).



**Рис.3.17 Кривые общей выживаемости больных с мутациями и без мутаций**

Общая выживаемость в группах сравнивалась с использованием критерия Гехано-Пето, достоверных различий выявлено не было ( $p = 0,26$ ). Однако, по представленным кривым прослеживается тенденция превышения показателей общей выживаемости в группе больных без мутаций за период наблюдения.

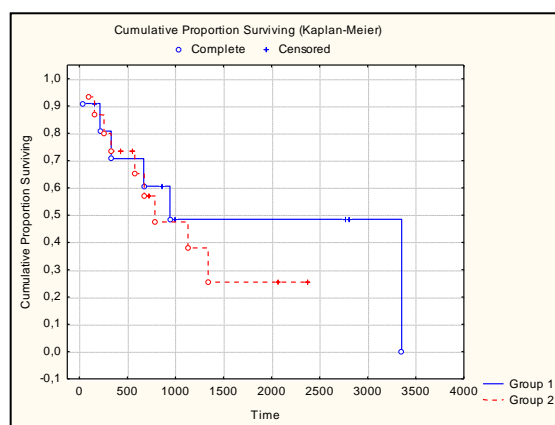
На графике представлены кривые безрецидивной выживаемости больных для группы 1 – с мутациями, группы 2 – без мутаций (рисунок 3.18).



**Рис.3.18 Кривые безрецидивной выживаемости больных с мутациями и без мутаций**

Безрецидивная выживаемость в группах сравнивалась с использованием критерия Гехано-Пето, достоверных различий в группах выявлено не было ( $p = 0,66$ ).

На графике представлены кривые безрецидивной выживаемости больных после радикального лечения рецидива для группы 1 – с мутациями, группы 2 – без мутаций (рисунок 3.19). Безрецидивная выживаемость в группах после радикального лечения рецидива опухоли сравнивалась с использованием критерия Гехано-Пето, достоверных различий в группах выявлено не было ( $p = 0,77$ ).



**Рис.3.19. Кривые безрецидивной выживаемости больных с мутациями и без мутаций после радикального лечения рецидива**

Также были рассчитаны показатели общей выживаемости, безрецидивной выживаемости и безрецидивной выживаемости после лечения рецидива опухоли в группах больных с наиболее часто встречающимися вариантами мутаций V600E, V600K и без мутаций. Достоверных различий как в группах с разными вариантами мутаций между собой, так и по сравнению с группой без мутаций выявлено не было.

Анализ 1-годовой, 3-летней и 5-летней общей, безрецидивной выживаемости и безрецидивной выживаемости после радикального лечения рецидива опухоли (таблица 3.9) показал отсутствие достоверных различий в группах больных с мутациями и без мутаций.

**Таблица 3.9 Анализ показателей 1, 3, 5-летней выживаемости больных с мутациями и без мутаций**

Выживаемость	Период	Группа I (мутации в гене BRAF +)	Группа II (мутации в гене BRAF -)
		(%)	(%)
Общая	1 год	90,91%	100%
	3 года	80,00%	92,31%
	5 лет	62,5%	83,33%
Безрецидивная	1 год	80,65%	80,00%
	3 года	68,00%	50,00%
	5 лет	47,06%	0,00%
После радикального лечения рецидива опухоли	1 год	73,33%	80%
	3 года	41,67%	37,5%
	5 лет	18,18%	37,5%

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Меланома (злокачественная опухоль из меланоцитов - пигментных клеток кожи) развивается вследствие злокачественной трансформации меланоцитов и меланобластов. Основной функцией меланоцитов является выработка пигмента - меланина.

Меланома кожи является болезнью с агрессивным и непредсказуемым течением, активным лимфогенным и гематогенным распространением, что обуславливает быстрое развитие заболевания и высокую смертность. Своевременная диагностика на ранних стадиях заболевания и радикальное удаление очага – определяющие факторы, которые делают лечение меланомы кожи максимально успешным. Хирургическое лечение до настоящего времени остается основным радикальным методом лечения ранних стадий болезни. Для поздних стадий заболевания и метастатической меланомы кожи продолжают поиски эффективной противоопухолевой терапии. Последние годы привлекают внимание достижения в применении таргетных препаратов.

Уровень заболеваемости меланомой кожи в России имеет тенденцию к росту. Так за период с 2003 по 2013 гг. прирост числа заболевших среди мужчин составил 28,6%, а среди женщин – 30,5%. В 2003 году заболеваемость меланомой кожи была 3,4 на 100 000 населения, а в 2013 году – 4 (у женщин - 4,28; у мужчин 3,77). За тот же 10-летний период (2003-2013 гг.) отмечался и прирост смертности от данного заболевания в РФ в целом на 10,18% (у мужчин – на 14,72%, у женщин – на 7,97%). Средний возраст больных с впервые в жизни установленным диагнозом меланома кожи составил 57,7 лет.

Выделяют четыре основные формы меланомы:

1. Поверхностно распространяющаяся меланома.
2. Узловая меланома.

3. Лентиго-меланома.

4. Акральная лентигинозная меланома.

Характерными особенностями меланомы, редко встречающимися при других злокачественных новообразованиях, являются метастазы меланомы в кожу в виде узлов, сателлитов, транзиторные метастазы.

Современные стандарты лечения и наблюдения больных меланомой кожи предусматривают различные схемы лечения для больных на разных стадиях. При лечении локальных стадий (I-II) необходимо радикальное иссечение первичной опухоли.

В стандарт лечения больных меланомой кожи III стадии в обязательном порядке должно быть включено адекватное иссечение первичной опухоли, регионарная лимфаденэктомия, также хирургическое лечение должно быть дополнено адъювантной иммунотерапией. Стандартом лечения меланомы кожи IV стадии и нерезектабельной меланомы III стадии является проведение противоопухолевого лекарственного лечения.

Сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы RAS/RAF/MEK/ERK играет существенную роль в прогрессировании меланомы. Активация этого пути происходит как за счет активации тирозинкиназных рецепторов на поверхности опухоли, так и вследствие мутации в генах семейства RAS, RAF, регулирующих продукцию сигнальных молекул этого пути. Впервые в ходе научных работ в 2002 году была выявлена высокая частота BRAF онкогенных мутаций при меланоме. Соматические мутации гена BRAF выявляется в 40 – 88 % при местно-распространенных и метастатических формах меланомы.

Лекарственные таргетные препараты – ингибиторы патологического белка BRAF показывают убедительные результаты по улучшению продолжительности жизни больных с неоперабельной и метастатической меланомой. Улучшение показателей общей и безрецидивной выживаемости также показывают препараты современной иммунотерапии, задачей которых является активация иммунной



системы, запуск процесса распознавания и уничтожения опухолевых клеток. Сегодня для этого используются моноклональные антитела - вещества, которые воспринимают определенные молекулы в качестве антигенов, связываются с ними, тем самым активируя иммунные клетки. Попытки одновременного приема современных таргетных препаратов и моноклональных антител показали высокую токсичность и плохую переносимость такой комбинированной терапии. Последовательное применение сначала иммунопрепарата, а затем таргетного препарата дает лучшие результаты по общей выживаемости, чем применение только таргетной или только иммунотерапии, а также – чем обратная последовательность.

Представляет интерес выявление больных с повышенным риском неблагоприятного течения заболевания на основании не только стандартных методов исследования, но и по молекулярно-генетическому статусу больного для проведения более интенсивного лечения и последующего тщательного наблюдения. По некоторым публикациям таким прогностическим фактором могло бы стать само наличие у больных меланомой кожи мутации в гене BRAF. На основании анализа научных публикаций можно сделать вывод, что этот вопрос до настоящего времени не изучался, поэтому нами были проведены исследования по выявлению влияния на течение и прогноз заболевания у больных меланомой кожи наличия мутаций V600 в гене BRAF.

Целью нашего исследования было изучение прогностической значимости мутации гена BRAF у больных с меланомой кожи.

В рамках поставленных задач нами была определена частота встречаемости мутаций V600 и ее вариантов в генах семейства BRAF у больных с меланомой кожи, проанализировано распределение больных по полу, локализации на коже в зависимости от уровня воздействия солнечного излучения, уровню инвазии опухоли по Clark, толщине опухоли по Breslow, стадиям заболевания. Также была проанализирована взаимосвязь наличия мутаций в гене BRAF с такими характеристиками опухолей, указывающими на более агрессивное течение заболевания, как ранний возраст начала, узловой характер роста, наличие

изъязвления, беспи́гментный статус опухоли. Была проанализирована частота лимфоидной инфильтрации и очагов регрессии, как признаков активации иммунной системы в борьбе с опухолью. Была проанализирована взаимосвязь наличия мутаций в гене BRAF с общей и безрецидивной выживаемостью больных с меланомой кожи, выживаемостью после радикального лечения рецидива. Также в рамках работы была дана оценка возможности использования мутационного статуса гена BRAF в определении течения заболевания у больных меланомой кожи и, соответственно, в определении показаний к более интенсивному лечению и последующему наблюдению.

В работе были использованы статистические методы сравнительного анализа данных, был проведен корреляционный и частотный анализ. Проведено сравнение общей выживаемости, безрецидивной выживаемости, безрецидивной выживаемости после радикального лечения рецидива опухоли с использованием метода Каплана – Майера и критерия Гехано – Пето.

В наше исследование были включены 110 больных из Москвы и Московской области, проходивших обследование и лечение в ФГБУ РНЦРР МЗ РФ по поводу первичной меланомы кожи (72,7%), после нерадикальных операций (7,3%), рецидивов после лечения (20,0%) в период с 2003 по 2015 гг.

Диагноз меланомы кожи больным был установлен и морфологически подтвержден в РНЦРР или других медицинских учреждениях с пересмотром стекол-препаратов и блоков в РНЦРР. Критерием отбора больных была гистологически подтвержденная в РНЦРР меланома кожи. Всем больным было проведено хирургическое лечение, которое, в зависимости от стадии заболевания и других факторов, дополнялось лекарственным лечением и лучевой терапией. В наше исследование не включались больные, которым по различным причинам не проводилось лечение или сроки лечения были существенно нарушены, а также больные, получавшие современные таргетные препараты. В наше исследование не были включены больные с увеальной меланомой и акрально-лентицинозной меланомой. На нашем клиническом материале в 26,7% наблюдений меланома кожи располагалась на участках тела

с повышенным уровнем экспозиции к солнечному излучению (голова, шея, верхние конечности), а в 73,3% на участках с более низкой экспозицией солнечного излучения (туловище и нижние конечности).

Возраст больных варьировал от 20 лет до 91 года, в среднем составил 54,4 (51,3 ÷ 57,6) года. Мужчин было 53 (48,2%) больных, женщин – 57 (51,8%).

Всем 110 пациентам было проведено молекулярно-генетическое исследование, включающее поиск мутаций в «горячей точке» 15-го экзона гена BRAF в ДНК, выделенной из гистологического материала парафинового блока больных, методом аллель-специфической ПЦР с последующей проверкой полученных результатов методом секвенирования по Сэнгеру.

Мутации V600 в гене BRAF были выявлены у 74 (67,3%) больных, у остальных 36 (32,7%) - мутации выявлены не были. Полученные данные в целом соответствуют данным из международных и российских источников. Однако, частота встречаемости BRAF-мутаций у больных Москвы и Московской области в нашем исследовании выше опубликованных общероссийских данных - 60,6%.

В результате предыдущих исследований было установлено, что мутации V600 в гене BRAF могут быть разных типов, когда замена валина происходит не только на глутаминовую кислоту, но на лизин, аргинин, аспарагиновую кислоту, метионин. В нашем исследовании из 74 у 63 (85,1%) больных был выявлен вариант мутация V600E, а у 10 (13,5%) - V600K, и только у одного больного - мутация V600R. Другие, более редкие типы мутаций (V600D, V600M, K601E, T599\_V600insT, D594N, L597S, K601N), в нашем исследовании не встретились.

Среди 53 мужчин мутации были выявлены несколько чаще - в 37 (69,81%) наблюдениях, а среди 57 женщин – в 20 (64,91%). Однако, различия недостоверны ( $p > 0,05$ ).

Анализ распределения больных по уровням инвазии меланомы кожи по Clark показал, что I-II-III уровни инвазии (опухолевые клетки достигают сосочкового и границы с ретикулярным слоем дермы) имели 84,21% пациентов с

мутациями в гене BRAF, тогда как пациенты без мутаций - только в 71,43% случаев. IV-V уровни инвазии (опухоли, клетки которых обнаруживались в ретикулярном слое дермы и в подкожной жировой клетчатке), наоборот, чаще наблюдались у больных с отсутствием мутаций – у 28,57%, чем у больных с мутациями – у 15,79%. При этом у последних ни один больной не имел опухолевые клетки в подкожной жировой клетчатке, т.е. V уровень инвазии. Различия не достоверны ( $p > 0,05$ ), имеется только тенденция превышения доли пациентов с мутациями на более ранних стадиях заболевания.

У 82,35% больных с мутациями превалировала толщина опухоли до 4 мм по Бреслоу, в отличие от больных без мутаций, у которых опухоли толщиной до 4 мм составили 62,96%. Различия статистически достоверны ( $p < 0,05$ ). Соответственно опухоли толщиной более 4 мм встречались чаще у больных без мутаций – в 37,04% случаев против 17,65% в группе больных с мутациями.

Среди больных с мутациями гена BRAF 0, I и II стадия заболевания были выявлены в 85,45% наблюдений, III-IV – у 14,55%. У больных без мутаций 0, I и II стадии меланомы отмечены в 92,59% наблюдений, III-IV – в 7,41%. Таким образом, в обеих группах больных преобладали пациенты с ранними стадиями заболевания, различия в группах не достоверны ( $p > 0,05$ ).

У больных меланомой кожи без мутаций в гене BRAF опухоль чаще (в 44,12% наблюдений) располагалась на открытых участках кожи, подвергающихся солнечному воздействию, чем у больных с мутациями – у 18,31%. Различия достоверны ( $p < 0,05$ ). Данный факт показывает, что мутации в гене BRAF не связаны с воздействием УФ-излучения, которое является самостоятельным фактором канцерогенеза в развитии меланоцитарных опухолей кожи.

Частота мутаций в гене BRAF в группах молодого и среднего возраста была примерно одинаковой - 71,88% и 70,97% соответственно, что в среднем составило 71,43%. У пациентов в возрасте поздней зрелости и пожилого возраста мутации в гене BRAF встречались реже – 57,58% и 63,64% соответственно, что суммарно в среднем составило 59,09%. Из полученных нами данных видно, что в молодом и среднем возрасте частота встречаемости больных с мутациями выше, чем в

возрасте поздней зрелости, пожилом и возрасте долгожителей, однако, различия не достоверны ( $p > 0,05$ ).

Проведение сравнения среднего возраста на момент манифестации заболевания показало, что у больных с мутациями средний возраст на момент установления диагноза был меньше (53,32 года), чем средний возраст больных в группе без мутации - 56,58 лет ( $p > 0,05$ ). При анализе среднего возраста на момент установления диагноза по типам мутаций V600E и V600K в гене BRAF было выявлено, что средний возраст начала заболевания у больных с наиболее часто встречающимися мутациями V600E был достоверно ниже - 50,63 года, чем у пациентов с мутациями V600K - 68,50 лет ( $p < 0,001$ ) и пациентов без мутаций - 56,58 лет ( $p < 0,05$ ).

При анализе среднего возраста манифестации заболевания у мужчин и у женщин с наиболее часто встречающимися вариантами мутаций V600E, V600K и без мутаций была выявлена тенденция более низкого среднего возраста у женщин во всех трех группах, чем у мужчин ( $p > 0,05$ ).

Анализ признаков более агрессивного течения заболевания (узловая, изъязвленная и беспигментная формы меланомы) среди больных с мутациями и без мутаций показал, что в целом, прогностически неблагоприятные, более агрессивные формы меланомы кожи - узловая, изъязвленная и беспигментная формы среди больных с мутациями в гене BRAF встречались достоверно чаще - у 84,62%, чем без мутаций - у 26,92%, различия достоверны ( $p < 0,05$ ).

В нашем исследовании лимфоидная инфильтрация в группе больных с мутациями в гене BRAF встречалась в 9,52% случаев, в группе без мутаций - в 3,12%. Достоверные различия в частоте больных с лимфоидной инфильтрацией в группах больных с мутациями и без мутаций нами получены не были. Несмотря на это, доля больных с лимфоидной инфильтрацией в группе больных с мутациями выше, чем в группе больных без мутаций.

Гистологические признаки регрессии опухоли в группе больных с мутациями присутствовали в 9,52% случаев, тогда как ни в одном препарате меланомы без мутаций такие признаки выявлены не были ( $p > 0,05$ ). Было

проведено более углубленное изучение этого вопроса и выявлено, что у больных с наиболее часто встречающимися вариантами мутаций V600E и V600K достоверно чаще встречались очаги регрессии, чем у больных без мутаций ( $p < 0,05$ ).

Выявленная тенденция по превышению доли больных с лимфоидной инфильтрацией в группе пациентов с мутациями, а также полученные статистически значимые различия в частоте встречаемости очагов регрессии у больных с мутациями V600E и V600K, чем у больных без мутаций могут свидетельствовать о возможно более активной реакции иммунной системы на опухолевые клетки, у больных с мутациями.

Нами были рассчитаны показатели общей, безрецидивной выживаемости и безрецидивной выживаемости после лечения рецидива опухоли в группе больных с мутациями и без мутаций, достоверные различия получены не были. Такие же показатели были рассчитаны отдельно в группах больных с наиболее часто встречающимися вариантами мутаций V600E, V600K и без мутаций. Достоверных различий как в группах с разными вариантами мутаций между собой, так и по сравнению с группой без мутаций выявлено не было.

Анализ 1-годичной, 3-летней и 5-летней общей, безрецидивной выживаемости и безрецидивной выживаемости после радикального лечения рецидива опухоли показал отсутствие достоверных различий в группах больных с мутациями и без мутаций.

В целом необходимо отметить, что в результате проведенных исследований нами было выявлено, что такие клиничко-морфологические критерии, характеризующие меланому, как более агрессивно текущее заболевание и, соответственно, обладающее более плохим прогнозом, как более ранний возраст установления диагноза, узловая форма роста, изъязвление, отсутствие пигмента, чаще встречается у больных с мутациями в гене BRAF, чем у больных без мутаций. Этот факт заставляет предполагать, что больные с опухолью, положительными по мутационному статусу в гене BRAF, имеют худший прогноз течения заболевания, чем больные с опухолями без мутаций, у них болезнь развивается более активно и быстро, чаще отмечаются рецидивы и метастазы

после радикального лечения, у таких больных меньшая продолжительность жизни. Однако, полученные нами фактические данные по общей и безрецидивной выживаемости не выявили достоверных различий, что не позволяет использовать мутационный статус гена BRAF в качестве прогностического маркера течения заболевания. Возможно полагать, что именно более высокая активность клеток иммунной системы у BRAF-мутированных меланом, которая по ряду признаков (лимфоидная инфильтрация, наличие очагов регрессии) подтвердилась в нашем исследовании, «уравновешивает» повышенную активность каскада митоген-активируемой протеинкиназы ERK. Это дает направление для дальнейших научных исследований в области изучения механизмов функционирования иммунной системы больного в условиях развития меланомы, одним из пусковых механизмов которой являются мутации в гене BRAF.

## ВЫВОДЫ

1. Среди жителей Москвы и Московской области более, чем у 2/3 больных меланомой кожи (67,3%) были выявлены мутации в гене BRAF, что чаще, чем в целом по РФ. Из них подавляющее большинство - мутации V600E (85,14% случаев), значительно реже встречались мутации V600K (13,51%) и V600R (1,35%). Другие редкие варианты мутаций у исследованных пациентов не встречались.
2. Статистически значимых различий в общей и безрецидивной выживаемости в группе больных с мутациями и без мутаций не выявлено. Отмечается тенденция к превышению показателей общей выживаемости в группе больных без мутаций.
3. У больных Московского региона с мутациями в гене BRAF меланома достоверно реже локализуется на открытых к солнечному воздействию участках кожи, чем у больных без мутаций ( $p < 0,05$ ). Различий в распределении больных по полу и стадиям заболевания не выявлено.
4. У больных с мутациями в гене BRAF достоверно чаще встречаются признаки, указывающие на более агрессивное течение заболевания, такие как более ранний возраст манифестации заболевания, узловой характер роста, изъязвленный и беспигментный характер опухоли ( $p < 0,05$ ).
5. У больных с мутациями в гене BRAF чаще встречаются гистологические признаки активации иммунного ответа в виде наличия лимфоидной инфильтрации (тенденция,  $p > 0,05$ ) и очагов регрессии ( $p < 0,05$ ) в тканях опухоли.
6. Наличие мутации в гене BRAF не может использоваться как самостоятельный прогностический фактор и не оказывает влияние на выбор тактики лечения.



## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Определение мутации в гене BRAF может быть рекомендовано в качестве диагностической процедуры для больных с меланомой кожи с перспективой назначения таргетной терапии.
2. Взаимосвязь мутаций в гене BRAF с активацией иммунной системы больного, которая проявляется более высокой частотой встречаемости признаков лимфоидной инфильтрации и очагов регрессии в опухолевой ткани, необходимо учитывать при планировании комбинированной лекарственной терапии больных с меланомой кожи.

## Список литературы

1. Аксененко, М.Б. Определение мутации BRAF V600E у пациентов с меланомой кожи: клинико-морфологические особенности / М.Б.Аксененко, С.С. Бекузаров, Т.Г. Рукша // Архив патологии. - 2014. - № 6. - С.38-43.
2. Анисимов, В.В. Меланома кожи: Части 1, 2 / В.В.Анисимов, Р.И.Вагнер, А.С.Барчук // СПб.: Наука. - 1995. - С.151.
3. Анисимов, В.В. Местные рецидивы и транзитные метастазы после хирургического лечения, первичных меланом кожи / В.В.Анисимов // Клиника и лечение меланомы кожи: Тез. Всесоюз. симпоз. – 1990. – С.4–5.
4. Гафтон, Г.И. Регионарная гипертермическая перфузия в онкологии / Г.И.Гафтон и соавт. // Вестник Московского онкологического общества. - 2013. № 1(594). - С.1.
5. Гафтон, Г.И. Регионарная химиотерапевтическая перфузия конечностей. Опыт НИИ онкологии им.Н.Н.Петрова, Санкт-Петербург / Г.И.Гафтон, Н.В. Татьяничева, К.Ю. Сенчик, В.М. Гельфонд, В.В. Егоренков, И.Г.Гафтон // Вестник Московского онкологического общества. - 2013. - № 1(594). - С.4.
6. Гребенников, О.П. Меланома. Онкология для практикующих врачей / О.П.Гребенников, В.Н. Прилепо; под общ.ред. С.С. Чистякова. - Москва; Товарищество научных издательств КМК, Авторская академия, 2009. – 632с.
7. Гырылова, С. Н. Роль Translocator protein (TSPO) в регуляции пролиферации и апоптоза опухолевых клеток при BRAF-положительной меланоме кожи: дис. канд.мед.наук: /Гырылова Светлана Николаевна. – Новосибирск, 2012. – 96с.
8. Демидов, Л. В. Совершенствование методов диагностики меланомы кожи / Л.В.Демидов, Д.В. Соколов, И.В. Булычева, Б.В. Шашков, А.Н. Махсон, Г.Н. Ворожцов, С.Г. Кузьмин, В.В. Соколов // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. - 2007. - т. 18. - №1.

9. Демидов, Л.В. Роль вемурафениба в лечении диссеминированной меланомы кожи / Л.В. Демидов, И.А. Утяшев, Г.Ю. Харкевич // Совр. Онкол. – 2013. – № 15(2). – С.58–61.
10. Демидов, Л.В. Меланома кожи: стадирование, диагностика и лечение [Электронный ресурс] / Л.В. Демидов, Г.Ю. Харкевич // Онкология и гематология. - 2003. - №11. – Режим доступа: <http://www.medlinks.ru/article.php?sid=12170>.
11. Демидов, Л. В Практические рекомендации по лекарственному лечению больных меланомой кожи. Версия 2014 г. [Электронный ресурс] / Под ред. Л.В.Демидова и др. - 2014. - Режим доступа: <http://www.rosoncweb.ru/standarts/RUSSCO/12.pdf>.
12. Зборовская, И.Б. Современные стратегии исследования маркеров опухолевого роста в клинической практике/ И.Б.Зборовская // Успехи молекулярной онкологии. - 2014. - № 2. - С.4–16.
13. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2014 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой // Москва; МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2015. – 250с.
14. Лемехов, В.Г. Эпидемиология, факторы риска, скрининг меланомы кожи / В.Г. Лемехов // Практическая онкология. - 2001. - №4(8). - С.3-11.
15. Мазуренко, Н.Н. Гетерогенность мишеней таргетной терапии различных субтипов меланомы / Н.Н. Мазуренко, И.В. Цыганова, Н.П. Герасимова и др. // Евразийский онкологический журнал. – 2013. – № 3(03) – С.106.
16. Мазуренко, Н.Н. Генетические особенности и маркеры меланомы кожи / Н.Н. Мазуренко // Успехи молекулярной онкологии. – 2014. - № 2. – С. 26 – 36.
17. Минздрав России. Государственный реестр лекарственных средств. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx?s=%D0%94%D0%B0%D0%B1%D1%80%D0%B0%D1%84%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B>

18. Моисеенко, В.М. МЕГЕЙС® (Мегестерол ацетат) в клинической онкологии [Электронный ресурс] / В.М. Моисеенко // НИИ онкологии им. проф. Н.Н.Петрова МЗ РФ. Режим доступа: <http://medi.ru/doc/04382.htm>.
19. Наседкина, Т.В. Биологические микрочипы в лабораторной диагностике злокачественных новообразований / Т.В.Наседкина, М.А.Емельянова, И.С.Абрамов // Злокачественные опухоли. - 2012. - № 2(2) - С. 77-80.
20. Семилетова, Ю.В. Лечение больных первичной меланомой кожи. Современное состояние проблемы/ Ю.В.Семилетова, В.В.Анисимов, Р.И.Вагнер // Сибирский онкологический журнал. – 2010. - № 4 (40) – С.71-77.
21. Солодянкина, Т.Н. Дерматоскопия как метод диагностики меланомы кожи / Т.Н.Солодянкина, В.И. Апанасевич, Л.И. Гурина // Сибирский онкологический журнал. - 2009. - №5 (35). - С.63-66.
22. Трапезников, Н.Н. Вопросы онкологии и радиологии /Н.Н.Трапезников. - Алма-Ата, 1962. - С. 151-152.
23. Трапезников, Н.Н. Регионарная химиотерапия злокачественных опухолей / Н.Н.Трапезников, В.В.Яворский. - М., 1967, - С. 6174.
24. Франк, Г.А. Первое Всероссийское молекулярно-эпидемиологическое исследование меланомы: результаты анализа мутаций в гене BRAF / Г.А.Франк, Л.Э.Завалишина, Т.В.Кекеева, С.Н.Алексахина и др. // Архив патологии. - 2014. - № 3 (76).
25. Харатишвили, Т.К. Регионарная химиотерапевтическая перфузия конечностей. Опыт РОНЦ им.Н.Н.Блохина / Т.К.Харатишвили, Д.В.Мартынков, С.В.Ширяев, Б.Ю.Наркевич, Ю.В.Буйденко, А.А.Феденко, Б.Ю.Бохян, Я.В.Вишневская, Н.С.Петроченко, Л.В.Демидов, М.Д.Алиев // Вестник Московского онкологического общества. - 2013. - № 1(594). - С.3-4.
26. Черненко, П.А. Изучение клинико-генетической гетерогенности при наследственной и спорадической формах меланомы кожи: дис. канд. мед. наук: 14.01.12 / Черненко Полина Андреевна. - М., 2012. – 150 с.
27. Чиссов, В.И. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность) / Под.ред. В.И.Чиссова, В.В.Старинского,

- Г.В.Петровой // ФГБУ МНИОИ им. Герцена П.А. Минздравсоцразвития России.- М., 2015. – 250 с.
28. A Study Comparing Trametinib and Dabrafenib Combination Therapy to Dabrafenib Monotherapy in Subjects With BRAF-mutant Melanoma [Электронный ресурс] // Режим доступа: URL: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01584648>.
29. A Study of RO5185426 in Comparison With Dacarbazine in Previously Untreated Patients With Metastatic Melanoma (BRIM 3) [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01006980>.
30. Aranha, G.V. Adjuvant immunotherapy of malignant melanoma / G.V.Aranha, C.F.McKhann, T.B.Grage, A.Gunnarsson, R.L.Simmons // *Cancer*. -1979. – P.1297 – 1303.
31. Argenziano, G. Epiluminescence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. Comparison of the ABCD rule of dermatoscopy and a new 7-point checklist based on pattern analysis / G.Argenziano, G.Fabbrocini, P.Carli et al. // *Arch. Dermatol.* - 1998. - Vol. 134. - P. 1563 - 1570.
32. Ascierto, P.A. Epiluminescence microscopy as a useful approach in the early diagnosis of cutaneous malignant melanoma / P.A.Ascierto, R.A.Satriano, G.Palmieri et al. // *Melanoma Res.* - 1998. - № 8 (6). - P. 529–537.
33. Ascierto, P.A. Sequencing of BRAF inhibitors and ipilimumab in patients with metastatic melanoma: a possible algorithm for clinical use / P.A.Ascierto, E.Simeone, D.Giannarelli et al. // *Journal of Translational Medicine.* - 2012. - №10. - P.107.
34. Ascierto, P.A. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study / P.A.Ascierto, D.Schadendorf, C.Berking, S.S.Agarwala et al. // *The Lancet Oncology.* – 2013. – №2.
35. Austin, D. Occupation and malignant melanoma. Epidemiology of malignant melanoma / D.Austin, P.Reynolds. - Berlin, 1986. – P. 98–107.
36. Bello, D.M. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling / D.M.Bello, C.E.Ariyan, R.D.Carvajal // *Cancer Control.* - 2013. - № 20(4) - P.261-281.
37. Berger, M. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations / M.Berger, E.Hodis, T.Heffernan et al. // *Nature.* - 2012.- № 485(7399) - P.502 - 506.

38. Bertolotto, C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options / C.Bertolotto // *Scientifica*. - 2013. - P.635203.
39. Bourillon, A. Genetic variation at KIT locus may predispose to melanoma / A.Bourillon, H.H.Hu, G.Hetet et al. // *Pigment Cell Melanoma Res.* - 2013. - №26(1). - P.88–96.
40. Bowyer, S.E. Activity of trametinib in K601E and L597Q BRAF mutation-positive metastatic melanoma / S.E.Bowyer, A.D.Rao, M.Lyle et al. // *Melanoma Res.* – 2014. - №24(5) - P. 504 - 508.
41. Brest, P. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease / P.Brest, P.Lapaquette, M.Souidi, K.Lebriand et al. // *Nat. Genet.* - 2011. - № 43 (3). - P.242 - 245.
42. Bystryn, J.C. Double-blind trial of a polyvalent, shed-antigen, melanoma vaccine / J.C.Bystryn, A.Zeleniuch-Jacquotte, R.Oratz, R.L.Shapiro et al. // *Clin Cancer Res.* – 2001. - № 7. – P.1882 – 1887.
43. Carlino, M.S. F-labelledfluorodeoxyglucose-positron emission tomography (FDG-PET) heterogeneity of response is prognostic in dabrafenib treated BRAF mutant metastatic melanoma / M.S.Carlino, C.A.Saunders, L.E.Haydu et al. // *European Journal of Cancer.* - 2013. - № 49 (2). - P.395-402.
44. Carvajal, R.D. Mucosal melanoma: a clinically and biologically unique disease entity / R.D.Carvajal et al. // *J. Natl.Compr.Canc Netw.* – 2012. - №10. – P.345-356.
45. Casagrande, F. P21CIP1 is dispensable for the G2 arrest caused by genistein in human melanoma cells / F.Casagrande, J.M.Darbon // *Exp. Cell Res.* - 2000. - №258. - P.101 – 108.
46. Chakraborty, R. Molecular targeted therapies in metastatic melanoma / R.Chakraborty, C.N.Wieland, N.I.Comfere // *Pharmgenomics Pers. Med.* - 2013. -№6. - P.49–56.
47. Chapman, P.B. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation / P.B.Chapman, A.Hauschild, C.Robert et al. // *N Engl J Med.* - 2011. - №364(26). - P.2507-2516.

48. Chaudhuri, A. Successful Treatment of Widespread Cutaneous Metastases from Melanoma using HDR Mould Brachytherapy: Hope Where Previously There Was None / A.Chaudhuri, C.De-Groot, M.Seel, M.Jolly et al. // International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics. - 2010. - № 78 (3P). - P.619 – 619.
49. Colombino, M. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma / M.Colombino, M.Capone, A.Lissia, A.Cossu et al. // Journal of Clinical Oncology. - 2012. - №30(20). - P. 2522-2529.
50. Colston, K .1,25-dihydroxyvitamin D3 and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture / K.Colston, M.J.Colston, D.Feldman // Endocrinology. - 1981. - № 108(3). - P.1083-1086.
51. Dai, B. Analysis of KIT expression and gene mutation in human acral melanoma: with a comparison between primary tumors and corresponding metastases/recurrences / B.Dai, X.Cai, Y.Y.Kong et al. // Hum Pathol. -2013. -№44(8). - P.1472-1478.
52. Davies, H. Mutations of the BRAF gene in human cancer / H.Davies, G.R.Bignell, C.Cox, P.Stephens et al. // Nature. - 2002. - №414. – P.949-954.
53. Deeba, N. Botanicals for the prevention and treatment of cutaneous melanoma / N.Deeba, S.Mukhtar, H.Mukhtar // Pigment Cell Melanoma Res. - 2011. - 24(4). - P. 688 – 702.
54. Douglas, J.G. The treatment of brain metastases from malignant melanoma / J.G. Douglas, K.Margolin // Semin Oncol. - 2002. - № 29(5). - P.518-524.
55. Drané, P. Selective regulation of vitamin D receptor-responsive genes by TFIID / P.Drané, E.Compe, P.Catez, P.Chymkowitch et al. // Molecular cell. - 2004. - №16. - P. 187 – 197.
56. FDA approve 'game-changing' drug for advanced melanoma [Электронный ресурс] // Режим доступа: URL: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/282101.php>
57. FDA approves Opdivo for advanced melanoma [Электронный ресурс] // Режим доступа: URL: <http://www.medicalnewstoday.com/releases/287399.php>
58. Fecher, L. Toward a molecular classification of melanoma / L.Fecher, S.Cummings, M.Keefe, R.Alani // J Clin Oncol. – 2007. - №25 (12). - P.1606–1620.

59. Fedorenko, I.V. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management / I.V.Fedorenko, G.T.Gibney, S.M.Keiran // *Oncogene*. - 2013. - №32(25). - P.3009 - 3018.
60. Fisher, R.I. Adjuvant immunotherapy or chemotherapy for malignant melanoma. Preliminary report of the National Cancer Institute randomized clinical trial / R.I.Fisher, W.D.Terry, R.J.Hodes et al. // *Surg Clin North Am*. - 1981. - №61. - P.1267 - 1277.
61. Flaherty, K.T. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma / K.T.Flaherty, I.Puzanov, K.B.Kim et al. // *N Engl J Med*. - 2010. - №363(9). - P.809 - 819.
62. Florin, V. Topical treatment of cutaneous metastases of malignant melanoma using combined imiquimod and 5-fluorouracil / V.Florin, E.Desmedt, S.Vercambre-Darras, L.Mortier // *Invest New Drugs*. – 2012. - №30(4). - P. 1641-1645.
63. Forbes, S.A. COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer / S.A.Forbes, G.Tang, N.Bindal, S.Bamford et al. // *Nucleic. Acids Res*. - 2008. - № 10.11.
64. Friedman, R. Early detection of malignant melanoma: role of physician examination and self-examination of the skin / R.Friedman, D.Rigel, A.Kopf // *CA Cancer J. Clin*. - 1985. - № 35. - P. 130 - 151.
65. Garnett, M.J. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene / M.J.Garnett, R.Marais // *Cancer Cell*. - 2004. - № 6 (4). – P.313-319.
66. Gartner, J.J. Whole-genome sequencing identifies a recurrent functional synonymous mutation in melanoma [Электронный ресурс] / J.J.Gartner, S.C.Parker, T.D.Prickett, K.Dutton-Regester et al // *Proc. Natl. Acad. Sci*. – 2013. – Режим доступа: [http:// www.pubmedcentral.nih.gov/3746936](http://www.pubmedcentral.nih.gov/3746936)
67. Gibson, S.C. Ten-year experience of carbon dioxide laser ablation as treatment for cutaneous recurrence of malignant melanoma / S.C.Gibson, D.S. Byrne, A.J.McKay // *The British journal of surgery*. - 2004. - №91(7). - P. 893-905.
68. Giovannucci, E. Prospective Study of Predictors of Vitamin D Status and Cancer Incidence and Mortality in Men /E.Giovannucci, Y.Liu, E.B. Rimm, B.W.Hollis, et al. // *Journal of National Cancer Institute*. – 2006. - №98 (7) - P.451 - 459.



69. Hauschild, A. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, openlabel, phase 3 randomised controlled trial / A.Hauschild, J.J.Grob, L.V.Demidov et al. // *Lancet*. - 2012. - № 380(9839). - P.358 - 365.
70. Hersey, P. Adjuvant immunotherapy of patients with high-risk melanoma using vaccinia viral lysates of melanoma: results of a randomized trial / P.Hersey, A.S.Coates, W.H.McCarthy et al. // *J Clin Oncol*. - 2002. - №20. - P. 4181- 4190.
71. Hodi, F.S. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma / F.S.Hodi, S.J.O'Day, D.F.McDermott et al. // *New England Journal of Medicine*. - 2010. - № 363 (8). - P.711-723.
72. Hodi, F.S. Imatinib for Melanomas Harboring Mutationally Activated or Amplified KIT Arising on Mucosal, Acral, and Chronically Sun-Damaged Skin / F.S.Hodi, C.L.Corless, A.Giobbie-Hurder, J.A.Fletcher et al. // *J of Clinical Oncology*. - 2013. - №31(26). – P. 3182-3190.
73. Houben, R. Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis / R.Houben, J.C. Becker, A.Kappel, P.Terheyden et al. // *J Carcinog*. – 2004. - № 3(1). – P.6.
74. Hutchinson, K.E. BRAF fusions define a distinct molecular subset of melanomas with potential sensitivity to MEK inhibition / K.E.Hutchinson, D.Lipson, P.J.Stephens et al. // *Clin Cancer Res*. - 2013. - №19(24). – P. 696–702.
75. Jakob, J.A. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma / J.A.Jakob, R.L.Jr.Bassett, C.S.Nq et al. // *Cancer*. - 2012. - №118(16). - P.4014 - 4023.
76. Johnson, D.B. Combined BRAF (Dabrafenib) and MEK Inhibition (Trametinib) in patients with BRAF V600-mutant melanoma experiencing progression with single-agent BRAF inhibitor/ D.B.Johnson, K.T.Flaherty, J.S.Weber et al. // *J Clin Oncol*. - 2014. - №57. - P.3535.
77. Karachaliou, N. Melanoma: oncogenic drivers and the immune system / N.Karachaliou, S.Pilotto, C.Teixidó, S.Viteri et al. // *Ann Transl Med*. - 2015. - №3(18). - P.265.

78. Kelleher, F.C. Targeting NRAS in melanoma / F.C.Kelleher, G.A.McArthur // *Cancer J.* - 2012. - №18(2). - P.132 - 136.
79. Kiguchi, K. Genistein-induced cell differentiation and protein-linked DNA strand breakage in human melanoma cells / K.Kiguchi, A.I.Constantinou, E.Huberman // *Cancer Communications.* - 1990. - №2. - P.271 - 277.
80. Kirkwood, J.M. Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial / J.M.Kirkwood, G.V.Long, U.Trefzer et al. // *Lancet Oncol.* - 2012. - №13(11). - P.1087 - 1095.
81. Kittler, H. Follow-up of melanocytic skin lesions with digital epiluminescence microscopy: patterns of modifications observed in early melanoma, atypical nevi, and common nevi / H.Kittler, H.Pehamberger, K.Wolff, M.Binder // *J. Am. Acad. Dermatol.* - 2000. - №43 (3). - P. 467 - 476.
82. Krauthammer, M. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma / M.Krauthammer, Y.Kong, B.H.Ha, P.Evans et al. // *Nat. Genet.* - 2012. - №44 (9). - P.1006 - 1014.
83. Kristensen, T. Low incidence of minor BRAF V600 mutation-positive subclones in primary and metastatic melanoma determined by sensitive and quantitative realtime PCR / T.Kristensen, O.Clemmensen, L.Hoejberg // *The Journal of molecular diagnostics.* - 2013. - №15 (3). - P. 355 – 361.
84. Laennec, R.T.H. Sur les melanoses / R.T.H.Laennec // *Bulletin de la Faculte de Medecine de Paris.* - 1806. - №1. - P.24-26.
85. Larkin, J.M.G. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma / J.M.G. Larkin, P.A.Ascierto, B.Dreno et al. // *New England Journal of Medicine.* - 2014. - №9.
86. Larkin, J.M.G. Update of progression-free survival and correlative biomarker analysis from coBRIM: cobimetinib plus vemurafenib in advanced BRAF-mutated melanoma [Электронный ресурс] / J.M.G.Larkin, Y.Yan, G.A.McArthur, P.A.Ascierto // *ASCO, Chicago, IL, USA.* - 2015. - abstract №9006. - Режим доступа: <http://meetinglibrary.asco.org/node/2002036>.

87. Lázár, V. Marked genetic differences between BRAF and NRAS mutated primary melanomas as revealed by array comparative genomic hybridization / V.Lázár, S.Ecsedi, L.Vízkeleti et al. // *Melanoma Res.* - 2012. - №22(3). - P.202 - 214.
88. Lejeune, F.J. An assessment of DTIC versus levamisole or placebo in the treatment of high risk Stage I patients after surgical removal of a primary melanoma of the skin / F.J.Lejeune, E.Macher, U.Kleeberg et al. // *Eur J Cancer Clin Oncol.* - 1988. - №24. - P. 81 - 90.
89. Lens, M. B. Use of tamoxifen in the treatment of malignant melanoma / M.B.Lens, T.Reiman, A.F.Husain // *Cancer.* - 2003. - №98. - P. 1355–1361.
90. Long, G.V. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma / G.V.Long, A.M.Menzies, A.M. Nargial et al. // *J Clin Oncol.* - 2011. - №29(10). - P.1239 - 1246.
91. Loutfi, A. Double blind randomized prospective trial of levamisole/placebo in Stage I cutaneous malignant melanoma / A.Loutfi, A.Shakr, M.Jerry, J.Hanley et al. // *Clin Invest Med.*- 1987. - №10. - P.325 - 328.
92. Lovly, C.M. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype – driven therapeutic trials / C.M.Lovly, K.B.Dablman, L.E.Fobn et al. // *PLoS One.* - 2012. - №7(4). - P.35309.
93. Ly, D. Local control after stereotactic radiosurgery for brain metastases in patients with melanoma with and without BRAF mutation and treatment / D.Ly, H.P.Bagshaw, C.J.Anker, J.D.Tward et al. // *J Neurosurg.* - 2015. - №123(2). - P.395-401.
94. Markovic, S.N. Malignant melanoma in the 21<sup>st</sup> century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis / S.N.Markovic et al. // *Mayo Clin Proc.* - 2007. - №82. - P.364 - 380.
95. Markovic, S. Randomized, Placebo-Controlled, Phase III Surgical Adjuvant Clinical Trial of Megestrol Acetate (Megace) in Selected Patients With Malignant Melanoma / S.Markovic, V.J.Suman, R.J.Dalton, J.E. Woods et al. // *American Journal of Clinical Oncology.* - 2002. - № 25(6). - P. 552-556.

96. McArthur, G.A. LBA5\_PR – Phase 3, Double-blind, Placebo-controlled Study of Vemurafenib Versus Vemurafenib + Cobimetinib in Previously Untreated BRAFV600 Mutation-Positive Patients With Unresectable Locally Advanced or Metastatic Melanoma / G.A. McArthur, P.A. Ascierto, J. Larkin, A. Ribas // *Annals of Oncology*. - 2014. - № 25 (5). - P.1-41.
97. McIllmurray, M.B. Controlled trial of active immunotherapy in management of Stage IIB malignant melanoma / M.B.McIllmurra, M.J.Embleton, W.G.Reeves, M.J.Langman et al. // *BMJ*. - 1977. - № 1. - P. 540 - 542.
98. Menzies, S.W. Frequency and morphologic characteristics of invasive melanomas lacking specific surface microscopic features / S.W.Menzies, C.Ingvar, K.Crotty et al. // *Arch. Dermatol*. - 1996. - № 132. - P. 1178–1182.
99. Michaloglou, C. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi / C.Michaloglou, L.C.Vredeveld, M.S.Soengas et al. // *Nature*. - 2005. - №436(7051). – P.720–724.
100. Morton, D.L. Adjuvant immunotherapy of malignant melanoma: results of a randomized trial in patients with lymph node metastases / D.L.Morton, F.C.Holmes, F.R.Eilber, K.P.Ramming // Terry WD, Rosenberg SA, editors. *Immunotherapy of human cancer*. New York: Excerpta Medica. - 1982. - P. 245–249.
101. NCCN Clinical practice guidelines in oncology TM Melanoma // National Comprehensive Cancer Network. - 2013. - №2.
102. Newton-Bishop, J. A. Serum 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> Levels Are Associated With Breslow Thickness at Presentation and Survival From Melanoma / J.A.Newton-Bishop S.Beswick, J.Randerson-Moor, Y.M. Chang etc. // *Journal of Clinical Oncology*. - 2009. - № 27(32). - P. 5439 - 5444.
103. Norris, W. Eight cases of Melanosis with pathological and therapeutical remarks on that disease / W.Norris // London. Longman. -1857.
104. Pehamberger, H. In vivo epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions. Pattern analysis of pigmented skin lesions / H.Pehamberger, A.Steiner, K.Wolff // *J. Am. Acad. Dermatol*. - 1987. - №17. - P. 571 - 583.

105. Platz, A. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site / A.Platz, S.Egyhazi, U.Ringborg, J.Hansson // *Mol Oncol.* - 2008. - № 1(4). - P.395 - 405.
106. Pritchard, A.L. Molecular pathways: mitogen – activated protein kinase pathway mutations and drug resistance. / A.L.Pritchard A.L., N.K.Hayward // *Clinical Cancer Research.* - 2013. - № 19(9). - P.2301-2309.
107. Quirt, I.C. Improved survival in patients with poor-prognosis malignant melanoma treated with adjuvant levamisole: a Phase III study by the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group / I.C.Quirt, W.E.Shelley, J.L.Pater et al. // *J Clin Oncol.* - 1991. - № 9. - № 729 -735.
108. Richtig, E. BRAF mutation analysis of only one metastatic lesion can restrict the treatment of melanoma: a case report / E.Richtig, D.Schrama, S.Ugurel, I.Fried et al. // *British Journal of Dermatology.* - 2013. - №168(2). - P. 428 - 430.
109. Robert, C. LBA4\_PR – COMBI-V: A randomised, open-label, Phase III study comparing the combination of dabrafenib (D) and trametinib (T) to vemurafenib (V) as first-line therapy in patients (pts) with unresectable or metastatic BRAF V600E/K mutation-positive cutaneous melanoma / C.Robert, B.Karaszewska, J.Schachter // *Annals of Oncology.* - 2014. - №25 (5). - P 1-41.
110. Roche reports promising Phase II results with new targeted approach in advanced melanoma. New Data on Inhibition of Advanced BRAF Mutated Melanoma // *Media Release.* - 2010.
111. Safaee, A.G. The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis / A.G.Safaee et al. // *PLOS One.* - 2012. - №7 (10). - P.47054.
112. Sekulic, A. Melanoma Study Group of Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape / A.Sekulic, P.Jr.Haluska, A.J.Miller et al. // *Mayo Clin Proc.* – 2008. - №83(7). – P. 825–846.
113. Singh, A.D. Uveal melanoma: epidemiologic aspects/ A.D.Singh et al. // *Ophthalmol Clin North.Am.* - 2005. - №18 (1). - № 75-84.

114. Sobin, L.H. International Union Against Cancer (UICC). TNM Classification of Malignant Tumours, 7th ed. / Sobin, L.H. ,Gospodarowicz M.K., Wittekind Ch. et al. // New York: Wiley-Blackwell. - 2009. - 310 p.
115. Sondak, V.K. Significant impact of HLA Class I allele expression on outcome in melanoma patients treated with an allogeneic melanoma cell lysate vaccine. Final analysis of SWOG-9035 / V.K.Sondak, J.Sosman, J.M.Unger et al. // Am Soc Clin Oncol. - 2004. - №14S. - P.22.
116. Spitler, L.E. A randomized trial of levamisole versus placebo as adjuvant therapy in malignant melanoma / L.E. Spitler // J Clin Oncol. - 1991. -№9. - P. 736 - 740.
117. Stolz, W. ABCD rule of dermatoscopy: new practical method for early recognition of malignant melanoma / W.Stolz, A.Riemann, A.Cognetta et al. // Eur. J. Dermatol. - 1994. - № 4. - P.521 - 527.
118. Thatcher, N. Randomized study of Corynebacterium parvum adjuvant therapy following surgery for (stage II) malignant melanoma / N.Thatcher, A.Mene, S.S. Banerjee, P.Craig et al. // Br J Surg. - 1986. - №73(2). - P. 111-115.
119. Toma, S. Tamoxifen in the treatment of metastatic malignant melanoma: still a controversy? (Review) / S.Toma, D.Ugolini, R.Palumbo // International journal of oncology. - 1999. - №15(2). - P. 321 - 358.
120. Trotter, S.C. A Global Review of Melanoma Follow-up Guidelines / S.C.Trotter, N.Sroa, R.R.Winkelmann et al. // J Clin Aesthet Dermatol. - 2013. - №6(9). - P.18 - 26.
121. Trunzer, K. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma / K.Trunzer, A.C.Pavlick, L.Schuchter et al. // J Clin Oncol. - 2013. - № 31(14). - P.1767 - 1774.
122. Verma, S. Systematic Review of Systemic Adjuvant Therapy for Patients at High Risk for Recurrent Melanoma / S.Verma, I.Quirt, D.McCready, K.Bak et al. // Cancer. - 2006. - №106(7). - P. 1431-1442.
123. Wallack, M.K. Surgical adjuvant active specific immunotherapy for patients with Stage III melanoma: the final analysis of data from a Phase III, randomized, double-blind, multicenter vaccinia melanoma oncolysate trial / M.K.Wallack, M.Sivanandham, C.M.Balch et al. // J Am Coll Surg. - 1998. - №187. - № 69 - 77.

124. Wan, P.T. Mechanism of activation of the RAF–ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF/ P.T.Wan, M.J.Garnett, S.M.Roe et al. // *Cell*. - 2004. - №16(6). - P.855 - 67.
125. Weber, J. Immunotherapy for melanoma / J.Weber // *Current Opinion in Oncology*. - 2011. - №23 (2). - P.163-169.
126. Wei, X. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma / X.Wei, V.Walia, J.C.Lin, J.K.Teer et al. // *Nat. Genet.* – 2011. - №43 (5). - P.442 - 446.
127. Wellbrock, C. BRAF as therapeutic target in melanoma / C.Wellbrock, A.Hurlstone // *Biochem Pharmacol.* - 2010. - №80(5). - P.561 - 567.
128. Willmore-Payne, C. BRAF and c-kit gene copy number in mutation positive malignant melanoma / C.Willmore-Payne, J. A.Holden, S.Hirschowitz, L.J.Layfield // *Hum Pathol.* - 2006. - №37(5). - P.520 - 527.
129. World Health Organization. Skin cancers. Cancer Incidence and Mortality Worldwide [Электронный ресурс] // GLOBOCAN. - Режим доступа: <http://globocan.iarc.fr/>.
130. Xia, J. A meta-analysis of somatic mutations from next generation sequencing of 241 melanomas: a road map for the study of genes with potential clinical relevance / J.Xia, P.Jia, K.E.Hutchinson et al. // *Mol Cancer Ther.* - 2014. - №13(7). - P.1918 - 1928.
131. Yudoh, K. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits in vitro invasiveness through the extracellular matrix and in vivo pulmonary metastasis of B16 mouse melanoma / K.Yudoh, H.Matsuno, T.Kimura // *The Journal of laboratory and clinical medicine.* - 1999. - №133(2). - P.120 - 128.
132. Zebary, A. KIT, NRAS and BRAF mutations in sinonasal mucosal melanoma: a study of 56 cases / A.Zebary, M.Jangard, K.Omholt et al. // *Br J Cancer.* - 2013. - №109(3). - P.559 - 564.