

Анализ BRAF-статуса у больных меланомой кожи

С.Н. Гырылова, Т.Г. Рукша, С.Н. Зобова, А.В. Комина, М.Б. Аксененко

Assessment of the BRAF status in patients with skin melanoma

S.N. GYRYLOVA, T.G. RUKSHA, S.N. ZOBOVA, A.V. KOMINA, M.B. AKSENIENKO

об авторах: ►

С.Н. Гырылова — ассистент кафедры патологической физиологии им. В.В. Иванова ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск
 Т.Г. Рукша — д.м.н., зав. кафедрой патологической физиологии им. В.В. Иванова, Красноярск
 С.Н. Зобова — к.м.н., ассистент кафедры патологической физиологии им. В.В. Иванова, Красноярск
 А.В. Комина — научный сотрудник кафедры патологической физиологии им. В.В. Иванова, Красноярск
 М.Б. Аксененко — очный аспирант кафедры патологической физиологии им. В.В. Иванова, Красноярск

Меланома кожи является агрессивным злокачественным новообразованием. Более чем в 70% меланом наблюдается мутация гена BRAF — BRAF V600E. Определение BRAF-статуса у пациентов с меланомой кожи является важным этапом скрининга пациентов для выбора последующей терапии.

Для выявления мутации BRAF V600E исследовали 27 гистологических препаратов, полученных от больных меланомой кожи жителей Красноярского края, путем определения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ).

Проведенные исследования выявили мутацию BRAF V600E в 26 из 27 гистологических образцов меланомы кожи. Показано, что наличие данной мутации не связано с половыми, возрастными, клинико-патологическими особенностями опухоли.

Ключевые слова: **меланома, BRAF-мутация V600E.**

Skin melanoma is an aggressive malignant neoplasm. Mutation of the BRAF gene, BRAF V600E, is observed in more than 70% of melanoma cases. Assessment of the BRAF status in patients suffering from skin melanoma is an important stage in patient screening for selection of further therapy.

To reveal the mutation of BRAF V600E, 27 histology samples taken from patients with skin melanoma residing in the Krasnodar territory were examined by means of defining the Restriction Fragment Length Polymorphism (PFLP assay). Our studies revealed the BRAF V600E mutation in 26 of 27 histology samples of skin melanoma. It was shown that the mutation is not associated with any sex-related, age-related, clinical and pathological features of the tumor.

Key words: **melanoma, BRAF V600E mutation.**

■ Меланома кожи является агрессивным злокачественным новообразованием, стремительный рост заболеваемости которым в последние десятилетия регистрируется во всем мире среди европеоидного населения, включая страны с исторически низким уровнем заболеваемости [1]. В России абсолютное число впервые выявленных случаев данного заболевания с 1982 г. увеличилось в 2 раза: заболеваемость на 100 000 населения в 2003 г. составляла у мужчин 3,2, у женщин — 3,6 [2]. В структуре всех опухолевых за-

болеваний кожи меланома составляет только 3—5% и, таким образом, занимает лишь третье место по частоте встречаемости, но именно это новообразование является главной причиной смерти больных с онкопатологией кожи [3].

Однако неясно, почему при наблюдающейся тенденции к улучшению диагностики меланомы на ранних стадиях заболевания и меланомы *in situ* снижения смертности от данного злокачественного новообразования кожи, к сожалению, не наблюдается. Возможно,

это связано с биологически агрессивным поведением опухоли с самого начала развития, что приводит к стремительному росту образования. Кроме того, метастазирующая меланома прогностически крайне неблагоприятна и резистентна ко всем видам традиционной химиотерапии и биологическим препаратам [4].

Среди терапевтических мишеней сигнальный механизм митоген-активированных протеинкиназ (МАРК) заслуживает более пристального внимания, так как этот путь активируется в большинстве случаев меланомы кожи [5]. Мутагенная активация МАРК-киназного пути наблюдается более чем в 90% случаев меланомы, и наиболее часто активация происходит через мутации генов NRAS или BRAF [5, 6]. Мутация гена BRAF ведет к стабильной активации сигнального механизма МАРК и также выявляется в доброкачественных меланоцитарных образованиях (невусах), что доказывает роль BRAF в качестве активатора клеточной пролиферации, но не злокачественной трансформации [7]. Поэтому полный онкогенный потенциал гена BRAF реализуется только при условии наличия или, наоборот, отсутствия других генетических нарушений. Более чем в 70% меланом наблюдается данная мутация [8], при этом меланомы и доброкачественные невусы наиболее часто имеют мутацию данного гена в позиции 600: смена валина на глутамин (BRAF V600E) [8].

Хотя BRAF кажется наиболее очевидной мишенью для лечения меланомы, большинство онкогенных эффектов опосредованы через киназу MEK (МАРК-киназа, или ER-киназа, митогенактивированная протеинкиназа, или внеклеточная протеинкиназа, регулирующая передачу сигналов), эффекторную протеинкиназу МАРК сигнального механизма. Препараты, содержащие ингибиторы MEK, уже проходят доклинические и клинические испытания. Повышение концентрации специфического ингибитора MEK, UO126, снижают рост клеток меланомы разных клеточных линий. Недавние исследования показали, что BRAF-статус ассоциируется с селективной терапией ингибиторами MEK, то есть чувствительность к лечению ингибитором MEK коррелирует с BRAF-статусом, а клеточные линии, в которых ингибирование MEK было неэффективно и не происходило снижения роста, имели дикий тип гена BRAF и N-Ras [9].

Наиболее эффективным признано сочетанное применение нескольких терапевтических агентов, действующих на разные патогенетические мишени. Перспективен выбор персонализированного лечения злокачественных новообразований. В отношении меланомы этот подход можно осуществить путем генетического скрининга пациентов для выявления мутации гена BRAF V600E, приводящей к неконтролируемой пролиферации клеток меланомы. И в дальнейшем — применение у пациентов, имеющих данную мутацию, блокаторов сигнального каскада МАРК в сочетании

с модуляторами клеточной пролиферации, воздействующими на другие белки-регуляторы клеточной пролиферации.

Таким образом, определение BRAF-статуса у пациентов с меланомой кожи является важным этапом скрининга пациентов с меланомой кожи для выбора последующей терапии. Целью настоящей работы было определение мутации BRAF V600E у жителей Красноярского края, больных меланомой кожи, а также выявление связи между ее наличием и особенностями клинико-патологических вариантов меланомы.

Материал и методы

Образцы тканей. Гистологические срезы меланомы кожи были получены из архива КГУЗ «Красноярское краевое патологоанатомическое бюро». Для выделения ДНК использовали биопсийный материал, полученный от 27 пациентов с верифицированным патологоанатомическим диагнозом меланомы кожи. Процедура проводилась согласно стандартной методике с использованием комплекта реагентов ДНК-сорб (AmpliSens, ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Выделенные образцы ДНК хранились при температуре -20 °С.

ПДРФ-анализ. Для выявления мутации использовался метод определения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ, RFLP-restriction fragment length polymorphism), описанный T. Nagasaka и соавт. [10]. Праймеры Mt-F, Wt-R и Mt-R (ООО «Сибэнзим», Новосибирск) были созданы для представления сайта рестрикции BstI (New England BioLabs, Ipswich, MA) в диком аллеле для анализа 600 кодона гена BRAF. Амплификация проводилась на амплификаторе BIS Thermocycler в объеме 25 мкл, содержащем ПЦР-буфер, 1,5 ммоль/л MgCl₂ (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора), 0,2 мкмоль/л каждого праймера Mt-F и Wt-R, 0,1 ммоль/л dNTPs (5x dNTPs mix, ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора), 0,625 ед. TaqF полимеразы (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) и 50 нг выделенной ДНК. Условия ПЦР были следующими: 95 °С — 11 мин. и 30 циклов: 95 °С — 30 с., 58 °С — 30 с., 72 °С — 30 с. и 5 мин. при 72 °С. Полученные ампликоны переосаждались по стандартной методике и подвергались рестрикции с помощью рестриктазы BstI при 55 °С в течение 6 ч. Далее проводился второй этап анализа со второй парой праймеров Mt-F и Mt-R, в тех же условиях. После ампликации продукты второго этапа ПЦР переосаждались и подвергались рестрикции в тех же условиях. В случае присутствия мутации гена BRAF в 600-м кодоне ПЦР-продукты размером 130 нуклеотидных пар (н.п.) разрезались на фрагменты размером 112 и 18 н.п. В случае отсутствия данной мутации получали продукты рестрикции размером 78, 34 и 18 н.п.

Статистический анализ. Для обработки полученных данных использовали пакет программ Statistica 6.0.

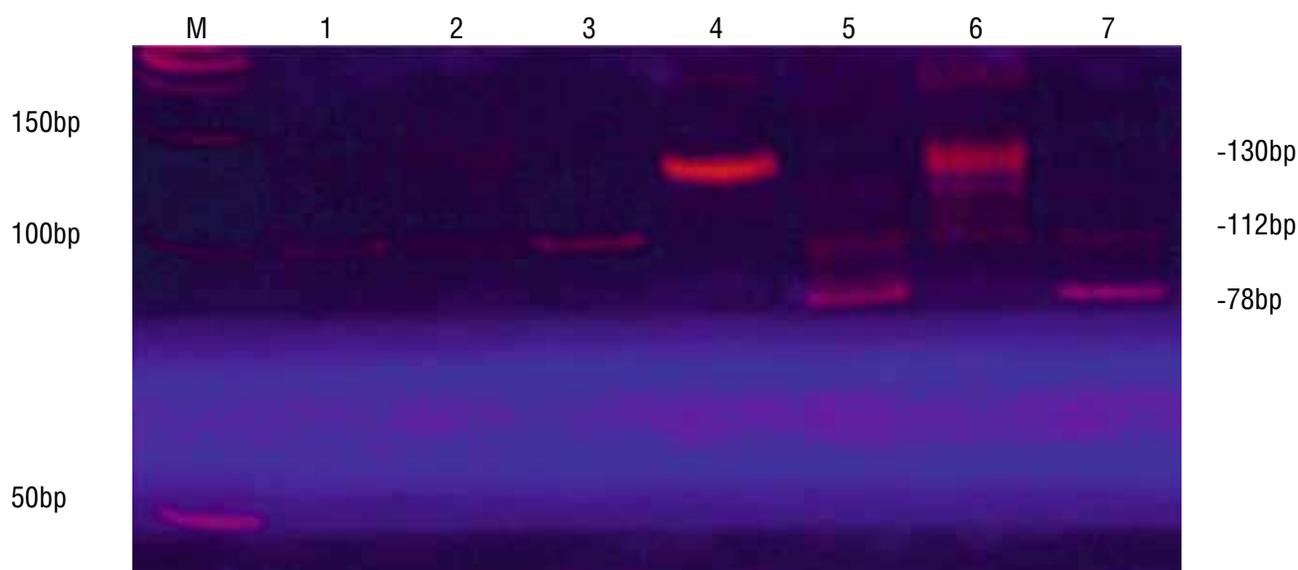


Рис. ПДРФ-анализ мутации BRAF V600E.

М — маркер молекулярной массы; 1, 2, 3 — фрагменты ДНК после рестрикции, 112bp (свидетельствующие о гомозиготном генотипе); 4, 6 — фрагменты ДНК 130bp (определяется у гомозиготных и гетерозиготных носителей мутантного аллеля); 5, 7 — фрагменты ДНК 78bp, определяемые у гетерозигот по BRAF-мутации

ТАБЛИЦА
Ассоциация между клиничко-патоморфологическими особенностями и BRAF V600E статусом у больных меланомой кожи

	BRAF-mt, гетерозиготы (n=13)		BRAF-mt, гомозиготы (n=13)	
	абс.	%	абс.	%
Возраст, годы				
>50	7	53,75	7	53,75
<50	6	46,25	6	46,25
Пол				
Женщины	8	61,75	7	53,75
Мужчины	5	38,25	6	46,25
Локализация				
Верхние конечности	5	38,75	3	23,25
Нижние конечности	2	15	1	7,5
Акральная	1	7,5	0	0
Лицо, шея	5	38,75	8	61,75
Туловище	0	0	1	7,5
Уровень инвазии по Кларку				
II	6	46,25	5	38,75
III	5	38,75	5	38,75
IV	2	15	2	15
V	0	0	1	7,5
Клинические варианты				
Поверхностно-рапространяющаяся меланома	11	85	11	85
Узловая	1	7,5	1	7,5
Лентиго-меланома	1	7,5	1	7,5

Результаты

При определении BRAF-статуса методом ПДРФ-анализа мутация была выявлена у 26 (96%) из 27 обследованных пациентов. Из них 13 (48%) пациентов были гетерозиготными и 13 (48%) гомозиготными носителями мутантного аллеля (см. рисунок). Поскольку данная мутация является активирующей, даже в случае гетерозиготного генотипа происходит активация сигнального каскада MAPK, что приводит к неограниченной пролиферации меланоцитов.

В единственном случае (4%) не была выявлена данная мутация. У больного 63 лет с акральной меланомой (в области ногтевого ложа) гистологически был установлен диагноз поверхностно-распространяющейся меланомы, III уровень инвазии по Кларку. Известно, что акральная меланома характеризуется достаточно низкой частотой выявления данной мутации, что согласуется с данным наблюдением, однако во втором случае акральной меланомы в обследованной выборке эта же мутация присутствовала (см. таблицу).

Также были проанализированы клинические данные в соответствии с BRAF-статусом больных. Образцы, полученные от пациентов, разделили на две группы меланом кожи, имеющих BRAF-мутацию (BRAF-mt): гетерозиготные и гомозиготные. Анализ возрастных категорий, распределения по полу, гистологическим вариантам и уровню инвазии по Кларку не выявил значимых различий между двумя вышеуказанными группами, во всех группах сравнения $p > 0,05$ (см. табл.). Таким образом, отсутствие значи-

мых различий между группами сравнения говорит об универсальности мутации BRAF V600E, т. е. активация каскадного пути MAPK происходит вне зависимости от пола и в любом возрасте.

Выводы

Полученные результаты ПДРФ-анализа, проведенного для выявления мутации BRAF V600E на материале 27 биоптатов меланомы кожи, выбранных случайным образом, говорят о наличии BRAF-позитивных меланом у жителей Красноярского края в подавляющем большинстве случаев. Кроме того, отсутствие значимых различий между группами сравнения гетерозиготных и гомозиготных носителей мутации BRAF V600E говорит об ее универсальности, т. е. в случае ее присутствия мутагенез не обусловлен ни полом, ни возрастом, ни клинико-патологическими особенностями опухоли. Полученные результаты демонстрируют роль активации MAPK-киназного каскада в патогенезе развития различных клинических вариантов меланомы кожи, а также необходимость дальнейшего изучения данного сигнального пути с целью идентификации новых молекулярных мишеней для специфической терапии и преодоления химиорезистентности меланомы кожи.

Настоящая работа проведена при финансовой поддержке КГАУ «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности», Дополнительное соглашение № 07/10 от 30.09.2010 г. к Соглашению № 11 от 12.08.2009 г. ■

Литература

1. Losina E., Walensky R.P., Geller A. et al. Visual Screening for Malignant Melanoma. A Cost-effectiveness Analysis. *Arch Dermatol* 2007; 143: 21—28.
2. Merabishvili V.M. Malignant Melanoma-up-to-date tendencies (the morbidity, the mortality, the diagnostics). *Oncological issues* 2006; 3: 275—87.
3. Пак Д.Д., Белова Е.А., Лазутина Т.Н. Исследование сторожевых лимфатических узлов у больных с меланомой кожи. *Росс. онкол. журн.* 2008; 4: 22—28.
4. Garbe C., Eigentler T.K. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. *Melanoma Research* 2007; 17: 117—27.
5. Atkins M.B., Elder D.E., Essner R., et al. Innovations and challenges in melanoma: summary statement from the first Cambridge conference. *Clinical Cancer Research* 2006; 12: 2291—6s.
6. Hingorani S.R., Jacobetz M.A., Robertson G.P. et al. Suppression of BRAF (V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer Research* 2003; 63: 5198—202.
7. Satyamoorthy K., Li G., Gerrero M.R., et al. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Research* 2003; 63: 756—9.
8. Veenman L., Papadopoulos V., Gavish M. Channel-Like Functions of 18-kDa Translocator Protein (TSPO): Regulation of Apoptosis and steroidogenesis as Part of the Host-Defense Response. *Current Pharmacology Design* 2007; 13: 2385—2405.
9. Nagasaka T., Sasamoto H., Notohara K., et al. Colorectal Cancer with Mutation in BRAF, KRAS, and Wild-Type with respect to Both Oncogenes Showing Different Patterns of DNA Methylation. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4584.
10. Solit D.B., Garraway L.A., Pratilas C.A., et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 2006; 439: 358—62.