нами комбинированное лечение, включающее наряду с системной медикаментозной терапией местное введение препаратов в полость матки и органы малого таза, существенно повышает имплантационный потенциал эндометрия за счет устранения или ослабления проявлений фиброза, воспаления.

Наиболее результативным показателем эффективности реабилитационной терапии у пациенток с хроническим эндометритом и бесплодием является наступление беременности. В течение года у 3 из 20 (15%) пациенток контрольной группы беременность наступила на фоне ИИСМ. В основной группе 7 из 25 (28%) пациенток забеременели на фоне 2-го этапа лечения без вспомогательных репродуктивных технологий, а 5 из 25 (20%) пациенток – на фоне ИИСМ по собственному настоянию. То есть беременность в основной группе наступила у 48% пациенток против 15% контрольной группы.

Таким образом, применение комбинированной терапии с локальным введением препаратов в полость матки и органы малого таза у пациенток с хроническим эндометритом и нарушениями репродуктивной функции достоверно повышает эффективность традиционного лечения, обеспечивает стойкий лечебный эффект и позволяет достичь наиболее полного восстановления фертильности.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бурлев В. А., Ильясова Н. А., Шишканова О. Л., Серов В. Н.* Хронический эндометрит: ангиогенные факторы роста в цервикальной слизи у больных с нарушениями репродуктивной функции на фоне импульсной электротерапии// Проблемы репродукции. – 2014. – № 3. – С. 10–15.

2. *Воропаева, С. Д.* Этиология, патогенез и антибактериальная терапия воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин // Consilium medicum. –2008. –Т. 10. № 1. – С. 25–31.

3. *Дубницкая, Л. В.* Хронический эндометрит: возможности диагностики и лечения/ Л. В. Дубницкая, Т. А. Назаренко // Consilium medicum. – 2007. – Т. 9. № 6. – С. 25–28.

4. *Зароченцева Н. В., Аршакян А. К., Меньшикова Н. С., Титченко Ю. П.* Хронический эндометрит: этиология, клиника, диагностика, лечение // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2013. – № 5. – С. 21–27.

5. *Краснопольский В. И., Серова О. Ф., Туманова В. А. и др.* Влияние инфекций на репродуктивную систему женщин // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2004. – № 5.

6. *Сухих, Г. Т.* Хронический эндометрит / Г. Т. Сухих, А. В. Шуршалина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 64 с.

7. *Унанян А. Л. Сидорова И. С., Аракелов С. Э., Полонская Л. С. и др*. Хронический цервицит и хронический эндометрит: общие аспекты патогенеза и патогенетической терапии // Медицинский совет 2013. – № 4–2. – С. 88–95.

8. *Цаллагова Л. В., Кабулова И. В., Золоева И. А.* Роль хронического эндометрита в генезе бесплодия // Кубанский научный медицинский вестник. – 2014. – № 4 (146). – С. 131–136.

9. *Tanrivcrdi H. A.* Is Pipeile biopsy really adequate for diagnosing endometrial disease / H. A. Tanriverdi. A. Baiut, B. D. Gun // Med sci monil. – 2004. Vol 10. № 6. – P. 271–274.

10. *Tuckennan E.* Markers of endometrial function in women with unexplained recurrent pregnancy loss: a comparison between morphologically normal and retarded endometrium / E. Tuckennan, S. M. Laird // Hum. reprod. –2004. Vol. 12. – P. 2624–2628.

Поступила 26.02.2016г.

О. И. КИТ, Д. И. ВОДОЛАЖСКИЙ, Е. Ю. ЗЛАТНИК, И. Ю. ЕФИМОВА, С. С. КОЧУЕВ, Ю. В. ПРЖЕДЕЦКИЙ

АССОЦИАЦИЯ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА ГЕНА BRAF И КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ

Лаборатория молекулярной онкологии ФБГУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,
Россия, 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я Линия, 63. E-mail: rnioi@list.ru

В данном исследовании определена ассоциация между мутационным статусом гена BRAF и клинико-морфологическими особенностями меланомы кожи у пациентов Юга России возрастной группы старше 55 лет. У 35 пациентов Юга России с морфологически подтвержденным диагнозом «меланома кожи» проведено молекулярно-генетическое исследование 15-го экзона гена BRAF методами прямого секвенирования по Сэнгеру и RT-PCR. В результате исследования установлено, что присутствие мутации в гене BRAF достоверно ассоциировано с увеличением толщины опухоли по Бреслоу. Также наблюдалось повышение частоты изъязвления опухоли на 21% у пациентов с активирующими мутациями V600. Частота обнаружения мутаций V600 в гене BRAF в тканях меланомы кожи составила 40%.

Ключевые слова: меланома кожи, мутации, BRAF.

УДК 616.34/35-006.6:575 /24(470 /6)

O. I. KIT, D. I. VODOLAZHSKY, E. Yu. ZLATNIK,
I. Yu. EFIMOVA, S. S. KOCHUEV, Yu. V. PRZHDETSKY

ASSOCIATION BETWEEN BRAF GENE MUTATION STATUS AND CLINICAL-MORPHOLOGICAL FEATURES OF CUTANEOUS MELANOMA

Rostov research institute of oncology,
Russia, 344037, Rostov-on-Don, the 14th line, 63. E-mail: rnioi@list.ru

This study identified associations between mutation status of the BRAF gene and the clinico-morphological features of melanoma patients in the South of Russia of the age group over 55 years. It was carried out molecular genetic study of exon 15 of the BRAF gene sequencing method of Sanger and by RT-PCR in 35 patients in Southern Russia with morphologically confirmed diagnosis of skin melanoma. The study found that the presence of mutations in the gene BRAF was significantly associated with increasing tumor thickness according to Breslow. We also observed an increase in the frequency of ulceration of the tumor by 21% in patients with an activating V600 mutation. The frequency of detection of V600 mutations in the BRAF gene in tissues of melanoma was 40%.

Key words: melanoma, mutations, BRAF.

Введение

Меланома – опасное злокачественное заболевание кожи человека с высоким риском метастазирования. Заболеваемость меланомой составляет менее 2% от общего числа онкозаболеваний: в 2012 г. в мире зарегистрировано 232 130 случаев меланомы из 14,1 млн. вновь выявленных онкологических больных. Однако рост заболеваемости меланомой отмечен почти во всех странах мира и за 40 лет составил примерно 5% в год [4]. По прогнозу Всемирной организации здравоохранения, заболеваемость меланомой в мире в течение ближайших 10 лет вырастет на 25%. В России в 2013 г. зарегистрировано 8974 новых случая меланомы при общем числе новых онкозаболеваний 535 887 [2]. С 2008 г. по 2013 г. в России абсолютный прирост числа заболевших меланомой составил 15,9% [2]. Составляя не более 10% от злокачественных новообразований кожи, меланома ответственна за 80% смертей от заболеваний этой группы [4].

В развитие меланомы вовлечены как внешние (ультрафиолетовое облучение), так и внутренние (наследственные) факторы. В молекулярном патогенезе спорадической меланомы основную роль играют онкогены и гены-супрессоры различных сигнальных каскадов. В 75% случаев меланомы кожи наблюдается гиперактивация сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK. Одним из его ключевых факторов – серин-треониновая киназа, кодируемая геном BRAF. Мутации в гене BRAF становятся основополагающими в 40–80% случаев меланомы кожи. На сегодняшний день известно около 40 соматических мутаций в гене BRAF [6]. В 80% случаев выявляется нуклеотидная замена T1799A в 15-м экзоне BRAF, приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту в 600-м кодоне (V600E) [5]. В 20% случаев мутации кодона-600 представлены заменой V600K, редко встречаются замены V600R/D/M [9].

Оценка ряда морфологических характеристик новообразования имеет существенное значение при определении прогноза и формировании групп риска среди больных меланомой кожи. Отмечается корреляция глубины инвазии опухолей по Кларку, как и их толщины по Бреслоу, с послеоперационной выживаемостью [3]. Ухудшение прогноза у больных меланомой кожи отмечается также при изъязвлении опухоли [8].

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

Цель настоящего исследования заключалась в определении ассоциаций между мутационным статусом гена BRAF и клинико-морфологическими особенностями меланомы кожи у пациентов Юга России возрастной группы старше 55 лет.

Материалы и методы исследования

В исследовании участвовали 35 пациентов Юга России: 22 мужчины и 12 женщин в возрасте старше 55 лет с морфологически подтвержденным диагнозом «меланома кожи». Для молекулярно-генетического исследования использовали 3-мкм. срезы парафиновых блоков (FFPE), содержащие не менее 20% опухолевых клеток. Экстракция ДНК включала стандартную процедуру депарафинирования в ортоксилоле, лизис в 2%-ноль SDS-буфере в присутствии протеиназы К и дополнительную очистку от ингибиторов на колонках «QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit» (IQIAGENE», Германия). Для проведения ПЦР концентрацию ДНК нормализовывали до величины 2 нг/мкл. Полимеразная цепная реакция для 15-го экзона гена BRAF проводилась с использованием пары праймеров: F 5'-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATGAGA-3' и R 5'-AACTCAGCAGCATCTCAGGG-3'. Амплификация

проводилась на программируемом термоциклере «MaxyGene Gradient» («Axygen», США) по программе, включавшей: первичную денатурацию при 95°С – 5 минут и 40 циклов в режиме: денатурация – 95°С – 15 сек., отжиг – 66°С – 15 сек., синтез при 72°С – 20 сек. и заключительная элонгация 72°С – 30 мин. Секвенирующая амплификация проводилось по стандартному протоколу для набора «ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits ver. 3.1» на термоциклере «MaxyGene Gradient» («Axygen», США) по следующей программе: первичная денатурация при 96°С – 1минута и 30 циклов в режиме: денатурация – 96°С – 10 сек., отжиг – 50°С – 5 сек., синтез при 72°С – 4 мин [1]. Прямое секвенирование исследуемых ампликонов по методу Сэнгера проводили с использованием генетического анализатора ABI Prism 3500 («Life Technologies», США).

Скрининг мутаций V600E в гене BRAF в 35 исследуемых препаратах суммарной ДНК опухолей параллельно определяли методом Real-TimePCR (RT-PCR). Для этого были использованы термоциклер «CFX96 Touch™ Real-Time PCR System» («Bio-Rad», США) и набор реагентов «Real-Time-PCR-BRAF-V600E» («Биолинк», Россия).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни, точного критерия Фишера и таблиц сопряженности с применением критерия χ^2 для порогового уровня $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Для изучения мутационного статуса гена BRAF в зависимости от клинико-морфологических характеристик меланомы кожи больные были разделены на 2 группы: с наличием мутаций в гене BRAF – mtBRAF (n=14) и без наличия мутаций – wtBRAF (n=21). В результате проведенного исследования была определена общая частота проявления активирующих мутаций V600 в гене BRAF, которая составила 40% (14/35 пациентов) (рис. 1).

Статистически достоверной разницы между медианой возраста пациентов групп mtBRAF и wtBRAF выявлено не было ($p>0,05$) (табл. 1). Присутствие мутаций в гене BRAF было достоверно ассоциировано с увеличением толщины опухоли по Бреслоу ($p<0,05$) (табл. 1), что является определяющим, поскольку эта характеристика признана одним из наиболее точных прогностических факторов на ранних стадиях развития меланомы кожи [7]. Так, в группе mtBRAF толщина опухоли >4 мм наблюдалась на 40% чаще, чем в группе wtBRAF. Близко к статистически достоверным отличиям ($p=0,07$) наблюдалось повышение частоты изъязвления опухоли в группе mtBRAF по сравнению с wtBRAF на 20%.

Клиническими характеристиками, статистически достоверно не связанными с мутацией в гене BRAF,

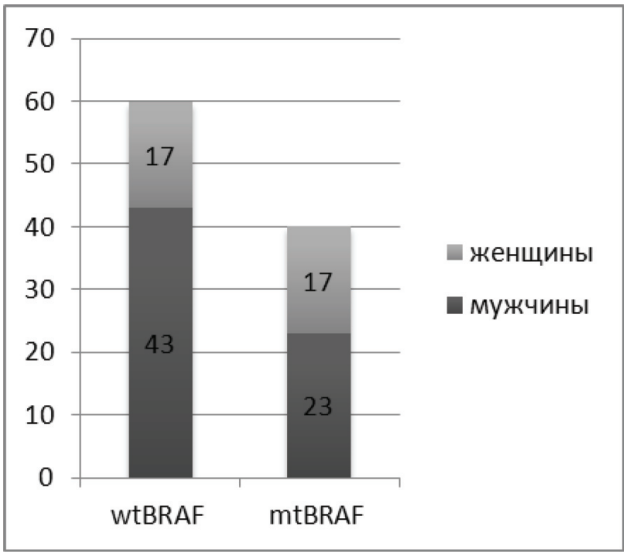

Рис. 1. Частота активирующих мутаций (%) V600 в гене BRAF у пациентов Юга России

оказались: наличие метастазов в лимфоузлы, клинические варианты меланомы кожи, уровень инвазии по Кларку и локализация опухоли ($p>0,05$).

Полученные данные наглядно демонстрируют, что наличие мутации в гене BRAF является прогностически неблагоприятным фактором, однако мутантный статус этого гена является значимым, но не ведущим фактором, предсказывающим исход этого заболевания.

Детекция мутации V600E в гене BRAF в 35 образцах была проведена с использованием двух методов: прямого секвенирования по Сэнгеру и метода аллельной дискриминации RT-PCR. Методом прямого секвенирования мутация V600E была обнаружена у меньшего количества пациентов в отличие от RT-PCR (табл. 2).

Так, методом прямого секвенирования мутация V600E определялась у шести пациентов (17%), а методом RT-PCR – у девяти пациентов (26%). Расхождение в результатах было выявлено в 3 образцах, что составило 33% от общего количества образцов с подтвержденной методом RT-PCR мутацией V600E. Это, очевидно, связано с различной чувствительностью использованных методов при обнаружении соматической мутации V600E. Однако метод секвенирования по Сэнгеру обнаружил и другие варианты активирующих мутаций V600. Так, общее количество пациентов с выявленными мутациями V600 по методу Сэнгера составило 28,5%, а методом RT-PCR – 26%.

Поэтому необходимо учесть, что любой набор для обнаружения мажорной мутации V600E не предназначен для детекции других замен в этой точке. Особенно актуальным это становится для группы пациентов старше 55 лет, где частота V600K генотипов увеличивается с возрастом. Для обнаружения «не V600E» мутаций необходимо использовать наборы, определяющие и другие замены в этой точке, либо дополнительно проводить

Таблица 1

Ассоциация между клинико-морфологическими особенностями меланомы кожи и мутационным статусом гена BRAF

	wtBRAF (n=21)		mtBRAF (n=14)		
Характеристики	**Абс.**	**%**	**Абс.**	**%**	**p**
Пол					0,22
Женский	6	29	6	43	
Мужской	15	71	8	57	
Возраст					0,555
Средний возраст	67		68,6		
Диапазон	58-78		59-83		
Локализация					p>0,05
Конечности	7	33	3	21	
Туловище	7	33	5	36	
Голова и шея	5	24	4	29	
Акральная	1	5	0	0	
Не известно	1	5	2	14	
Толщина по Бреслоу, мм					p<0,01
0,01-1,0	1	5	0	0	
1,01–2,0	7	33	2	14,4	
2,01–4,0	8	38	3	21,3	
>4	5	24	9	64,3	
Уровень инвазии по Кларку					p>0,05
II	3	14	0	0	
III	13	62	7	50	
IV	2	10	3	21	
V	3	14	4	29	
Клинические варианты					p>0,05
Поверхностно-распространенная	1	5	2	14	
Узловая	15	71	7	43	
Не известно	5	24	5	14	
Изъязвление					p=0,07
Присутствует	6	29	7	50	
Отсутствует	15	71	7	50	
Кожа с хроническим солнечным повреждением					p=0,155
Да	8	38	7	50	
Нет	12	57	5	36	
Не известно	1	5	2	14	
Наличие метастазов в лимфоузлы					0,0926
Да	2	9,5	0	0	
Нет	19	90,5	14	100	

Таблица 2

Частота встречаемости мутаций в 15 экзоне гена BRAF при использовании методов Real-Time PCR и секвенирования по Сэнгеру

	Секвенирование по Сэнгеру	**Real-Time PCR**
WT	71,5% (25)	74% (26)
Всего с мутацией	28,5% (10)	26% (9)
V600E	17% (6)	26% (9)
V600K	11,5% (4)	0

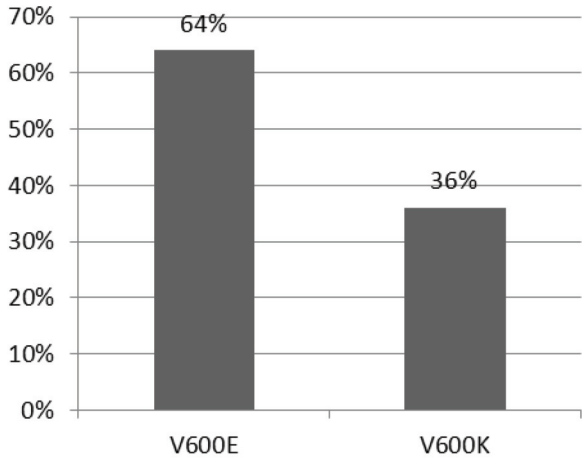

Рис. 2. Мутационный статус гена BRAF по данным методов прямого секвенирования по Сэнгеру и RT-PCR

секвенирование по методу Сэнгера 15-го экзона гена BRAF. Все это является немаловажным при решении вопроса о назначении таргетной терапии больным, имеющим активирующие мутации V600.

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

p.V600E (64%), характеризующаяся нуклеотидной заменой T на A в положении 1799, в результате чего происходит замена аминокислотного остатка валина на глутаминовую кислоту в 600-м положении (рис. 2);

мутация p.V600K (36% от общего количества мутаций), характеризующаяся заменой двух нуклеотидов GT на AA в положении 1798–1799 и приводящая к замене аминокислоты валина на аминокислоту аспарагин в положении 600 (рис. 2).

Относительно низкий процент мутаций V600E (64%) и высокий p.V600K (36%), по-видимому, связан с возрастной особенностью выборки, включавшей пациентов старше 55 лет, что соответствует литературным данным [10]. Согласно исследованию, проведенному A. Menzies и др., в группе mtBRAF частота проявления «не V600E» генотипов (в том числе и V600K) возрастала с увеличением возраста. Так, «не V600E» мутации встречались в < 20% случаев у пациентов моложе 50 лет и в > 40% случаев у пациентов старше 70 лет. Медиана возраста пациентов в исследовании A. Menzies и др. с мутацией V600E составила 53 года, а с V600K – 61 год. Эти данные позволяют предположить, что этиология мутации V600E отличается от этиологии V600K меланомы кожи [10].

Таким образом, при определении взаимосвязи между мутационным статусом гена BRAF и клинико-морфологическими особенностями меланомы кожи у пациентов Юга России возрастной группы старше 55 лет с помощью непараметрического критерия χ^2, нами установлена статистически достоверная связь ($p<0,05$) между наличием активирующей мутации в гене BRAF и толщиной опухоли по Бреслоу. Следовательно, наличие мутации можно считать неблагоприятным прогностическим фактором для пациентов с меланомой кожи. Также при проведении молекулярно-генетического скрининга мутаций в 15-м экзоне гена BRAF (секвенирование ДНК по Сэнгеру и RT-ПЦР) у 35 больных Юга России с меланомой кожи нами выявлены два варианта мутаций в 15-м экзоне гена BRAF: p.V600E и p.V600K. Частота обнаружения мутантного типа гена BRAF у пациентов составила 40%, из них p.V600E – в 64% и p.V600K – в 36% случаев. Для детекции соматической мутации V600E предпочтительно пользоваться методом RT-PCR, так как он имеет чувствительность приблизительно в три раза большую по сравнению с методом прямого секвенирования по Сэнгеру. Для возрастной группы старше 55 лет при отрицательном результате детекции мутации V600E методом RT-PCR необходимо продолжить диагностический поиск других замен в данном экзоне.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кит О. И, Водолажский Д. И, и др.* Сравнительная характеристика мутационного статуса гена BRAF в зависимости от клинико-морфологических особенностей меланомы кожи // Современные проблемы науки и образования. – 2005. – № 5.

2. Злокачественные новообразования в России. Обзор статистической информации за 1993–2013 гг. / Под общей редакцией чл. – корр. РАН, проф. А. Д. Каприна, проф. В. В. Старинского. М., 2015. – 511 с.

3. *Balch C. M., Soong S.-J., Gershenwald J. E. et al.* Prognostic factors analysis of 17600 melanoma patient: validation of the American Joint Committee on cancer melanoma staging system // J. clin. oncol. – 2001. – Vol. 19. – P. 3622–3634.

4. *Bertolotto C.* Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options // Scientifica. – 2013. 2013:635203.

5. *Davies H., Bignell G. R., Cox C. et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer // Nature. – 2002. – № 417(6892). – P. 949–954.

6. Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma // Oncogene. – 2010 – № 29 (41). – P 5545–5555.

7. *Elder D. E., Van Belle P., Elenitsas R., et al.* Neoplastic progression and prognosis in melanoma // Semin. cutan. med. surg. – 1996. – №15. – P. 336–348.

8. *Hmonen S.* Prognosis of primary melanoma // Scand. j. surg. – 2002. – Vol. 91. – P. 166–171.

9. *Long G. V., Menzies A. M., Nargial A. M. et al.* Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma // J. clin. oncol. – 2011. – № 29. – P. 1239–1246.

10. *Menzies A., Haydu E., Visintin L et al.* Distinguishing Clinicopathologic Features of Patients with V600E and V600K BRAF-Mutant Metastatic Melanoma // J. clin. cancer. res. – June. 2012. – № 18. – P. 3242–3249.

Поступила 25.01.16