

*Е.И. Антонова¹, И.А.Балдуева², А.В. Соловьев¹, А.В. Баранов¹, А.В. Хамбикова¹,
Т.Л. Нехаева², L. Wayn³, A. Zamir³, I. Sinai³*

Инновационные подходы в диагностике меланомы кожи: векторы развития (промежуточные результаты)

¹Ульяновский государственный педагогический университет им. И. Н. Ульянова, Ульяновск,

²НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург,

³Emerald Medical Applications Ltd., Петах-Тиква

Настоящая статья представляет собой промежуточные результаты исследований международного проекта по направлению развития комплексной диагностики меланомы кожи. В этой первой статье по проекту проведено предварительное обследование пациентов, которое включало анализ молекулярно-генетических маркеров геномной ДНК венозной крови, обуславливающих развитие предрасположенности к развитию меланомы.

Всего в работе рассматривается 7 молекулярно-генетических полиморфизмов генов *CDKN2A* (ингибитор циклин-зависимых киназ 2A), *MC1R* (рецептор меланокортина 1) и *MITF* (ассоциированный с микрофталмией фактор транскрипции). Всего изучено 122 пациента.

Ключевые слова: меланома, SNP-полиморфизмы, частоты встречаемости

Меланома — одна из наиболее опасных и агрессивных злокачественных опухолей, она развивается практически бессимптомно, а прогрессирует стремительно, часто образуя метастазы лимфогенным или гематогенным путем. Диагностика меланомы кожи на ранних стадиях критична для выживания пациента. Меланома развивается из пигментсодержащих клеток меланоцитов. Типично встречается на коже, но также может быть во рту, кишечнике, глазах. Основной причиной развития заболевания является воздействие ультрафиолета.

По данным ВОЗ, около 132000 новых случаев меланомы диагностируются во всём мире каждый год. Наивысший процент меланомы приходится на Австралию и Новую Зеландию, но и на территории России заболевание меланомой кожи проявляет тенденцию к увеличению численности заболевших или находящихся в зоне риска.

К сожалению, в настоящее время не существует надежных способов диагностики меланомы, кроме гистологических исследований постоперационного биопсийного материала и изучения концентрации белка S-100, который,

однако, лишь косвенно может свидетельствовать как о меланоме, так и о ряде других заболеваний (например, о повреждении мозга). Этот белок может быть выявлен лишь на поздних стадиях развития меланомы, и поэтому часто используется для распознавания уже метастатических стадий меланомы, контроля терапии и прогноза течения заболевания.

Для ранней диагностики меланомы исторически привлекались самые разные способы — от спектрофотометрического анализа невусов «родинонок» до изучения молекулярно-генетических и белковых маркеров, однако следует констатировать факт, что в настоящее время нет надёжных способов выявления предрасположенности к развитию и ранней диагностики меланомы в пределах эпителиального пласта, несмотря на острую значимость заболевания и необходимость своевременного диагностирования.

Генетика онкологических заболеваний разнообразна: она может быть связана с мутациями в ДНК — как унаследованных от родителей, так и появившихся в процессе индивидуального развития организма, с эпигенетическими факторами, и действием некоторых патогенов вирусной природы. Именно генетический подход в ранней диагностике заболевания, позволяющий определить первопричину заболевания, является наиболее перспективным. Он позволяет оценить самые ранние генетические нарушения, выявить первые предпосылки развития заболевания и своевременно принять соответствующие меры и терапию. Особенно это актуально в диагностике меланомы — быстро текущей формы рака, часто рецидивирующей и образующей метастазы.

Для целей ранней диагностики и профилактики меланомы наиболее адекватным является комбинированный подход, включающий комплексный анализ биометрических данных пациента, результатов компьютеризированного обследования кожных покровов и молекулярно-генетических маркеров (ДНК и РНК маркеров как в крови и плазме, так и тканях). Именно

развитию такого подхода и посвящен настоящий проект, где данная статья является первой в цикле работ.

Предлагаемый нами компьютеризированный анализ фотографий кожных покровов пациентов с комбинированным изучением молекулярно-генетических полиморфизмов, обуславливающих повышенный риск развития меланомы, позволяет оценить риск развития опухоли, определить группу высокого риска. Привлекаемые компьютерные технологии для дерматоскопических исследований проводятся согласно системе “ABCDE”, согласно которой определяется степень опасности невусов «родинок» на основании:

А — асимметричность (от англ. asymmetry — асимметрия);

В — границы (контур): неровные или ровные, ясные (от англ. border — край);

С — цвет: одинаковый или нет в разных частях (от англ. color — цвет);

Д — диаметр (от англ. diameter — диаметр);

Е — изменчивость «родинок» (от англ. evolving — изменения).

Известно, что за «семейную» меланому отвечают отдельные полиморфизмы генов *MC1R*, *CDKN2A*, *MITF*, *CDK4* (всего по разным оценкам от 5 до 14 % случаев заболевания меланомой относятся к «семейной» линии).

Ген-супрессор *CDKN2A* (ингибитор циклин-зависимых киназ 2A) локализован на 9p21 и кодирует белки p16INK4a и p14ARF, принимающие участие в регуляции активности p53 и белка ретинобластомы. Мутации гена *CDKN2A* обнаруживают в 20–40 % случаев семейной меланомы. Мутации p16INK4a являются причиной возникновения 1400–2800 новых (2–4%) случаев меланомы в США ежегодно. Мутация *CDKN2A* (дупликация кодона R112), затрагивающая оба белка — p16INK4a и p14ARF, доминирует у носителей наследственной меланомы в шведских семьях. Мутации p14ARF приводят к недостатку p53, который контролирует целостность и репарацию ДНК.

Изучаемые нами мутации гена *MC1R* (рецептор меланокортина 1): p.V60L и p.R151C — ассоциируются с высоким риском развития меланомы; p.V92M и p.R160W — ассоциируются с рыжими волосами и плохо загораемой кожей; наличие данной мутации повышает риск развития меланомы; присутствие аллеля p.V92M связывается с повышенным риском развития болезни Альцгеймера; p.R163Q — значительно ассоциируется с риском развития меланомы. Пациенты с вариантами *MC1R* имеют в 5–15 раз больший риск развития меланомы с мутацией *BRAF* независимо от УФ-инсоляции.

Отдельные полиморфизмы гена *MITF* (ассоциированный с микрофтальмией фактор транскрипции) способны усилить риск развития меланомы и рака почек [1].

Материал и методика

Для полимеразной цепной реакции использовались оригинальные праймеры. Дизайн праймеров проводился с использованием программного обеспечения Unipro UGENE v1.29.0 и Mega 7 [2]. Анализ праймеров, расчёт температуры плавления, анализ вторичных структур выполнялись с помощью ресурса OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Синтез праймеров осуществлялся с помощью синтезатора ДНК/РНК ASM-800 (Биоссет, Россия).

Для проведения полимеразной цепной реакции использовалась SNP-detect полимеразы (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя; в качестве интеркалятора для ПЦР-РВ — краситель Sybr Green I.

Выделение ДНК из цельной крови (200 мкл), фиксированной в ЭДТА, проводилось с использованием коммерческого набора GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкции производителя; объём элюции — 100 мкл.

Полимеразная цепная реакция для выявления SNP-вариантов проводилась с использованием детектирующего амплификатора qTower 2.2 (Analytik Jena, Германия), анализ результатов ПЦР-РВ выполнялся с помощью программного обеспечения qPCRsoft 3.0 (Analytik Jena, Германия). Для некоторых образцов способ использовался электрофоретический способ детекции. Гель-электрофорез проводился в 1% агарозном геле при напряжении 100 В с использованием установки для горизонтального гель-электрофореза Biometra (Германия); электрофорезный буфер — однократный TAE. Система гель-документации: BioDocAnalyze (Analytik Jena, Германия). Маркер длин — GeneRuler Low Range DNA Ladder (Applied Biosystems).

Полимеразная цепная реакция для амплификации фрагментов ДНК для секвенирования проводилась с использованием набора реагентов DreamTaq Green PCR Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкции. Очистка целевого ПЦР-продукта из агарозного геля — с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкции. Сиквенсовая реакция проводилась с использованием реагентов BrightDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Nimagen). Очистка продуктов сиквенсовой реакции с помощью набора Optima DTR 8-well Strip Refill (Edge Bio).

Секвенирование проведено с помощью генетического анализатора ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems). Анализ хроматограмм выполнен с помощью программного обеспечения Sequence Scanner 2 (Applied Biosystems).

Работа выполнена на базе Научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова».

Результаты и обсуждение

Генотипирование пациентов проводилось по следующим полиморфным маркерам: ген *CDKN2A*: полиморфизм p.G101W (c.301G>T) (rs104894094), *MC1R*: полиморфизмы p.V60L (c.178G>C), p.V60L/F (c.178G>T) (rs1805005), p.R160W/C/* (c.478C>T) (rs1805008), p.R163Q

(с.488G>A) (rs885479, rs1042809), p.V92M (с.274G>A) (rs2228479) и p.R151C (с.451C>T) (rs1805007, rs3212380), ген *MITF*: полиморфизм p.E318K (с.952G>A) (rs149617956). Эти аллельные варианты генов (SNP-полиморфизмы), унаследованные от родителей, определяют предрасположенность к развитию меланомы [1; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19].

Возраст обследованных пациентов: от 18 до 82 лет. Обследуемые были распределены по двум группам:

1 — группа с подтвержденным диагнозом меланомы кожи (20 человек);

2 — группа пациентов с высоким риском развития меланомы (102 человека).

Среди критериев отнесения пациентов к группе высокого риска:

- ранее была диагностирована меланома, но успешно вылечена;
- случаи заболевания меланомой в семье;

- большое число невусов на теле (более 50 шт.) или имеется крупный невус (диаметр более 2 см);

- диспластические или атипичные невусы;
- крупные врожденные и гигантские пигментные невусы (более 5% поверхности тела);
- светлая кожа, веснушки и светлые волосы;
- перенесенные сильные солнечные ожоги;
- инсоляция более 6 часов в день;
- пигментная ксеродерма.

В результате обследования пациентов, проводившегося как путем секвенирования фрагментов генов, так и с использованием оригинальных аллель-специфичных ПЦР-тест-систем, выявлены нормальные состояния по генам *CDKN2A* и *MITF* у всех пациентов, что связано с низкой частотой встречаемости полиморфизмов. У 26 пациентов выявлены гетерозиготные состояния по гену *MC1R* (11 пациентов с подтвержденным диагнозом меланомы и 15 — у пациентов из группы высокого риска) (таблица 2), что в целом

Таблица 1. Частоты встречаемости изучаемых полиморфизмов

Ген	Референсный номер однонуклеотидного полиморфизма в базе данных dbSNP, полиморфизм	Частота минорного аллеля согласно базе данных dbSNP	Частота аллеля у обследованных пациентов группы высокого риска (N = 102)	Частота аллеля у обследованных пациентов группы с подтвержденным диагнозом (N = 20)
<i>CDKN2A</i>	rs104894094 p.G101W, с.301G>T	0,00002 — 0,00004	0	0
<i>MC1R</i>	rs1805005 p.V60L/F, с.178G>C/T	0,0353 — 0,0961	0,0588	0,1500
<i>MC1R</i>	rs1805008 p.R160W/C/*, с.478C>T	0,0146 — 0,0556	0,0980	0,1500
<i>MC1R</i>	rs885479 / rs1042809 p.R163Q, с.488G>A	0,0371 — 0,1913	0,0196	0,1500
<i>MC1R</i>	rs2228479 p.V92M, с.274G>A	0,0633 — 0,0797	0,1176	0,1500
<i>MC1R</i>	rs1805007 / rs3212380 p.R151C, с.451C>T	0,0186 — 0,0562	0,0196	0,0500
<i>MITF</i>	rs149617956 p.E318K, с.952G>A	0,0008 — 0,0022	0	0

Таблица 2. Распределение SNP-полиморфизмов гена *MC1R* у обследованных пациентов

	Группа пациентов с высоким риском развития меланомы			Группа пациентов с подтвержденным диагнозом меланомы		
	возраст			возраст		
	ВСЕ	18-39	40-78	ВСЕ	18-39	40-82
Количество пациентов в группе	102	40	62	20	3	17
Соотношение мужчин и женщин	36 : 66	14 : 26	22 : 40	7 : 13	1 : 2	8 : 11
Количество пациентов, имеющих SNP-варианты гена <i>MC1R</i> , абсолютное число	15	7	8	11	1	10
Количество пациентов, имеющих SNP-варианты гена <i>MC1R</i>	29,4 %	35,0 %	25,8 %	55,0 %	33,3 %	58,5 %
Количество пациентов с SNP-полиморфизмом p.V60L/F (с.178G>T)	6		6	3		3
Количество пациентов с SNP-полиморфизмом p.R160W/C/* (с.478C>T)	10	6	4	3		3
Количество пациентов с SNP-полиморфизмом p.R163Q (с.488G>A)	2	2		3	1	2
Количество пациентов с SNP-полиморфизмом p.V92M (с.274G>A)	12	6	6	3		3
Количество пациентов с SNP-полиморфизмом p.R151C (с.451C>T)	2		2	1		1

подтверждает существующую статистику (Мазуренко, 2014; Новик, 2011; Böhm et al., 2016; Botezatu et al., 2015;

Davies, Samuels, 2010; Delaunay, 2017; Fargnoli et al., 2010; Harlanda et al., 2008; Hayward et al., 2017; Helgadottir et al., 2017; Helgadottir et al., 2016; Leachman et al., 2017; Levin, Mæhle, 2017; Lynch, Shaw, 2016; Mangas et al., 2016; Melamed et al. 2017; Soura et al., 2016; Taylor et al., 2017). Отмечается, что частоты изучаемых полиморфизмов гена *MC1R* чаще встречаются у пациентов, имеющих заболевание меланому (табл. 1). Так, у 55% обследованных пациентов с диагнозом меланомы отмечено наличие таких полиморфизмов, при частоте 29,4% у пациентов группы высокого риска (табл. 2).

Таким образом, разработан подход, комбинирующий изучение молекулярно-генетических полиморфизмов, определяющих наследственную предрасположенность к меланоме, и компьютеризированные дерматографические исследования кожных покровов. Подход может быть внедрен в практику для проведения массовых исследований населения и определения группы повышенного риска развития меланомы.

В последующих циклах статей будет представлена динамика исследуемых параметров с расширенным спектром генетических полиморфизмов, выявления мутаций *de novo*, микроРНК венозной крови и плазме, а также тканях.

Работа выполнена в рамках проекта «Нанобиотехнологические методы в системе комплексного подхода совершенствования молекулярно-генетической диагностики, с целью повышения эффективности противоопухолевого лечения меланомы», поддержанного фондом РОСНАНО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мазуренко Н.Н. Генетические особенности и маркеры меланомы кожи // Успехи молекулярной онкологии. — 2014. — № 2. — С. 36–43.
2. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // Molecular Biology and Evolution. — 2016. — Vol. 33. — P. 1870–1874.
3. Новик А.В. Меланомы кожи: новые подходы // Практическая онкология. — 2011. — Т. 2. — № 1. — С. 36–42.
4. Böhm M., Jagirdar K., Sturm R.A. et al. Lack of protection from development of multiple melanomas by an injected melanocortin analogue in a combined high-risk *MC1R*/*CDKN2A* genotype patient // Journal of European Academy of Dermatology and Venereology. — 2016. — Vol. 30, Iss. 10. — P. 65–67.
5. Botezatu I.V., Nechaeva I.O., Stroganova A.M. et al. Optimization of melting analysis with Taqman probes for detection of *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* mutations // Analytical Biochemistry. — 2015. — Vol. 491. — P. 75–83.
6. Davies M.A., Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma // Oncogene. — 2010. — Vol. 29 (41). — P. 5545–5555.
7. Delaunay J., Martin L., de Paillerets B.D. et al. Improvement of Genetic Testing for Cutaneous Melanoma in Countries With Low to Moderate Incidence. The Rule of 2 vs the Rule of 3 // JAMA Dermatology. — 2017. — Vol. 153 (11). — P. 1122–1129.
8. Fargnoli M.C., Gandini S., Peris K. et al. *MC1R* variants increase melanoma risk in families with *CDKN2A* mutations: A meta-analysis // European Journal of Cancer. — 2010. — Vol. 46. — P. 1413–1420.
9. Harlanda M., Goldstein A.M., Kukulizcha K. et al. A comparison of *CDKN2A* mutation detection within the Melanoma Genetics Consortium (GenoMEL) // European Journal of Cancer. — 2008. — Vol. 44 (9). — P. 1269–1274.
10. Hayward N.K., Wilmott J.S., Waddell N. et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes // Nature. — 2017. — Vol. 545 (7653). — P. 175–180.
11. Helgadottir H., Tuominen R., Olsson H. et al. Cancer risks and survival in patients with multiple primary melanomas: Association with family history of melanoma and germline *CDKN2A* mutation status // Journal of American Academy of Dermatology. — 2017. — Vol. 77 (5). — P. 893–901.
12. Helgadottir H., Höiom V., Tuominen R. et al. Germline *CDKN2A* Mutation Status and Survival in Familial Melanoma Cases // Journal of the National Cancer Institute. — 2016. — Vol. 108 (11). — doi: 10.1093/jnci/djw135.
13. Leachman S.A., Olivia M., Lucero O.M. et al. Identification, genetic testing, and management of hereditary melanoma // Cancer Metastasis Rev. — 2017. — Vol. 36. — P. 77–90.
14. Levin T., Mæhle L. Uptake of genetic counseling, genetic testing and surveillance in hereditary malignant melanoma (*CDKN2A*) in Norway // Familial Cancer. — 2017. — Vol. 16. — P. 257–265.
15. Lynch H.T., Shaw T.G. Familial atypical multiple mole melanoma (FAMMM) syndrome: history, genetics, and heterogeneity // Familial Cancer. — 2016. — Vol. 15 (3). — P. 487–491.
16. Mangas C., Potrony M., Mainetti C. et al. Genetic susceptibility to cutaneous melanoma in southern Switzerland: role of *CDKN2A*, *MC1R* and *MITF* // British Journal of Dermatology. — 2016. — Vol. 175 (5). — P. 1030–1037.
17. Melamed R.D., Aydin I.T., Rajan G.S. et al. Genomic Characterization of Dysplastic Nevi Unveils Implications for Diagnosis of Melanoma // The Journal of Investigative Dermatology. — 2017. — Vol. 137 (4). — P. 905–909.
18. Soura E., Eliades P.J., Shannon K. et al. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management. Emerging melanoma cancer complexes and genetic counseling // Journal of American Academy of Dermatology. — 2016. — Vol. 74. — P. 411–420.
19. Taylor N.J., Mitra N., Goldstein A.M. et al. Germline variation at *CDKN2A* and associations with nevus phenotypes among members of melanoma families // The Journal of Investigative Dermatology. — 2017. — Vol. 137 (12). — P. 2606–2612.

Поступила в редакцию 08.11.2018 г.

*E.I. Antonova¹, I.A. Badueva², A.V. Solovyev¹,
A.V. Baranov¹, A.V. Hambikova¹, T.L. Nehaeva²,
L. Wayn³, A. Zamir³, I. Sinai³*

**Innovative approaches to the diagnosis
of skin melanoma: development vectors
(intermediate results)**

¹Ulyanovsk State Pedagogical University, Ulyanovsk,

²N.N. Petrov National Medical Research Center of
Oncology, St. Petersburg,

³Emerald Medical Applications Ltd., Petach Tikva

This article represents intermediate results of the research of the international project on the direction of complex diagnostics of skin melanoma. A preliminary screening of patients was carried out, which included the analysis of molecular markers of genomic DNA causing the development of susceptibility to the development of melanoma.

In this paper, 7 gene polymorphisms of *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), *MC1R* (melanocortin 1 receptor) and *MITF* (microphthalmia transcription factor) are considered. In total, 122 patients were studied.

Key words: melanoma, hereditary, screening, SNP, frequencies