

Streszczenie

Biologia molekularna odgrywa coraz większą rolę w diagnostyce i leczeniu pacjentów z nowotworami złośliwymi, również wśród chorych z czerniakiem. Molekularny profil czerniaka jest trudny do określenia, głównie ze względu na brak kryteriów pozwalających na wyodrębnienie zmian inicjujących (ang. *driver*) od zmian wtórnych (ang. *passenger*). Dodatkowo, dane z wielkoskalowych projektów sekwencjonowania nowej generacji pokazują dużą zmienność genetyczną czerniaka.

Przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych są najczęstszą formą pierwszego nawrotu choroby po usunięciu zmiany pierwotnej. Mimo że w III stopniu zaawansowania klinicznego czerniaka chirurgiczne usunięcie zajętych węzłów chłonnych jest zabiegiem potencjalnie leczniczym, przeżycia pacjentów różnią się znacznie. Istnieje więc potrzeba wyodrębnienia markerów warunkujących przebieg choroby.

Celem pracy był opis zmian molekularnych w dużej i jednorodnej grupie czerniaków w IIIB/C stopniu zaawansowania klinicznego poddanych terapeutycznej limfadenektomii oraz ocena ich wpływu na przebieg kliniczny choroby.

Pierwszym etapem było oznaczenie statusu mutacyjnego genów *BRAF* i *NRAS* za pomocą sekwencjonowania sangerowskiego. Wśród badanych 250 przypadków obecność mutacji w genie *BRAF* wykazano u 154 (62%) (w tym 141 V600E i 9 V600K), a w genie *NRAS* u 42 (17%) chorych. Nie zaobserwowano żadnej korelacji między obecnością mutacji w genach *BRAF/NRAS* a RFS (ang. *relapse-free survival*, przeżycie wolne od nawrotu choroby) ani OS (ang. *overall survival*, przeżycie całkowite). W istotnym stopniu obecność mutacji *BRAF* korelowała z młodszym wiekiem pacjentów w momencie diagnozy. Przeżycie 5-letnie w badanej grupie wyniosło 33 i 44% licząc od daty pierwotnej diagnozy i limfadenektomii, odpowiednio; 5-letni RFS wynosił 25%. Czynniki negatywnie wpływającymi na prognozę były: płeć męska, więcej niż 1 zajęty węzeł chłonny oraz naciekanie torebki węzłowej.

Status mutacyjny genów *BRAF* i *NRAS* nie był również czynnikiem prognostycznym u pacjentów z makroprzerzutami czerniaka do węzłów chłonnych, ale może mieć znaczenie dla doboru terapii adjuwantowej.

Wyróżniono dodatkowo grupę 103 czerniaków o nieznanym ognisku pierwotnym, gdzie przerzut do węzłów chłonnych jest pierwszą kliniczną manifestacją choroby. Obecność mutacji w genie *BRAF* wykazano w 55 przypadkach (53%) (51 V600E i 4

inne), mutacje w genie *NRAS* wykazano w 14 przypadkach (14%). 5-letni OS dla badanej grupy wynosił 34%. Obecność mutacji w genie *BRAF* ani *NRAS* nie wykazywała korelacji z OS, obserwowano jednak istotny wpływ na skrócenie RFS (18 vs. 19 vs. 31% dla przypadków z mutacją *BRAF*, *NRAS* oraz bez mutacji w tych genach, odpowiednio; $p=0,04$). Ponownie, najbardziej istotnym czynnikiem wpływającym na przebieg kliniczny choroby była liczba zajętych węzłów chłonnych większa niż 1. Przeprowadzone badania wskazują, że pacjenci z czerniakiem o nieznanym ognisku pierwotnym wykazują podobną charakterystykę molekularną co pacjenci ze sporadycznym czerniakiem niezwiązanym z przewlekłym uszkodzeniem przez promieniowanie ultrafioletowe w podobnym stopniu zaawansowania. Obecność mutacji w *BRAF* i *NRAS* wykazuje negatywny wpływ na RFS, może mieć także znaczenie dla doboru terapii adjuwantowej.

W przeprowadzonych badaniach porównano również działanie dwóch popularnych metod oznaczania mutacji w genie *BRAF*: sekwencjonowania sangerowskiego i cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test. Za pomocą testu cobas® uzyskano wyniki dla wszystkich spośród badanych w tym etapie 232 przypadków, za pomocą sekwencjonowania nie było możliwe uzyskanie produktu w 6 z nich. Za pomocą obu metod spójne wyniki uzyskano dla 215/226 informatywnych wyników (95,2%). Sekwencjonowanie sangerowskie było metodą skuteczniejszą w przypadku mutacji innych niż V600E, test cobas® okazał się być mniej zależny od jakości materiału (degradacja DNA i niski poziom utkania nowotworowego w preparacie). Porównanie to udowodniła wysoką skuteczność oraz zgodność obu metod w rutynowej diagnostyce przy zachowaniu należytej staranności analizy.

W ostatnich latach nastąpił znaczny rozwój wiedzy na temat złożonego podłoża molekularnego czerniaka. Prowadzone jest wiele badań mających na celu identyfikację kluczowych czynników wpływających na agresywność czerniaka, umożliwiających skuteczną diagnostykę pacjentów, a wraz z rozwojem nowoczesnych inhibitorów drobnocząsteczkowych na zwiększenie możliwości skutecznej terapii. W tej pracy w grupie 102 pacjentów przeprowadzono analizę statusu mutacyjnego 50 genów powiązanych z rozwojem nowotworów za pomocą sekwencjonowania eksomowego. Otrzymane wyniki weryfikowano za pomocą sekwencjonowania sangerowskiego. Wykryto ponad 100 zmian w 29 genach. Obecność 75% z nich potwierdzono za pomocą sekwencjonowania sangerowskiego, co przekłada się na potwierdzenie wysokiej heterogenności zmian jak i stawia pytanie o ocenę znaczenia klinicznego rzadkich

klonów. Część mutacji wykazywała negatywny wpływ na rokowanie (*AKT*). W 16 przypadkach nie wyznaczono obecności mutacji w żadnych z badanych genów, co sugeruje rolę innych czynników molekularnych w rozwoju choroby.

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki sugerują, że do prawidłowej diagnostyki molekularnej należy wykorzystywać testy obejmujące szerszy profil genetyczny, jako że dodatkowe, nawet nie jednoznacznie onkogenne mutacje w genach kodujących kluczowe lub towarzyszące elementy różnych ścieżek sygnałowych mogą stanowić mieć wpływ na tok choroby i odpowiedź na terapię. Potrzebne są dalsze badania identyfikujące elementy zmienności genetycznej czerniaka i weryfikujące ich znaczenie w biologii nowotworu.