

Latvijas Universitāte
Medicīnas fakultāte, Patoloģijas katedra



Tatjana Zablocka

**Klīnisko, histopatoloģisko un ģenētisko rādītāju
novērtējums un to saistība ar bezrecidīva periodu
ādas melanomas pacientiem agrīnā stadijā**

Promocijas darba kopsavilkums
zinātnes doktora grāda (*Ph. D.*) iegūšanai

Nozaru grupa – Medicīna un veselības zinātnes
Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācijā
Apakšnozare – patoloģija

Rīga 2024

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedrā, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā un Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Patoloģijas centrā. Darbs tapis ar projekta “LU doktorantūras kapacitātes stiprināšana jaunā doktorantūras modeļa ietvarā Nr. 8.2.2.0/20/I/006” atbalstu.

Promocijas darba kopsavilkums sastāv no vispārīgā pārskata, piecām sadaļām un literatūras saraksta. Promocijas darba forma: publikāciju kopā-starptautiski citētas zinātniskas publikācijas medicīnas bāzes zinātnēs, tai skaitā farmācijā, patoloģijas apakšnozarē

Form of the thesis: a collection of research papers in Basic Medicine and Pharmacy, in Pathology.

Darba vadītājs:

Dr. med. profesors **Sergejs Isajevs**

Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedra

Vadošā pētniece

Dr. biol. **Dace Pjanova**

Latvijas Biomedicīnas studiju un pētījumu centrs

Zinātniskie recenzenti:

Asoc. profesors, MD, PhD **Jānis Eglītis**

LU Medicīnas fakultātes Onkoloģijas katedra

Emeritētā profesore MD, PhD **Regīna Kleina**

Rīgas Stradiņa Universitāte

Dr.habil. med., MD, PhD profesore **Anna Szumera-Ciećkiewicz**

Patoloģijas un laboratorijas medicīnas katedra,

Marijas Sklodovskas-Kirī Valsts Onkoloģijas pētniecības institūts,

Varšava, Polija

Promocijas darbs tiks aizstāvēts Latvijas Universitātes Medicīnas, bioloģijas un farmācijas nozaru promocijas padome sēdē.

Ar promocijas darbu var iepazīties Latvijas Universitātes bibliotēkā, Raiņa bulvārī 19, Rīgā.

Doktorantūras komitejas priekšsēdētājs: Prof. Valdis Pirags, dr.med., MD, PhD.

Doktorantūras komitejas sekretārs: Līga Plakane, dr. biol., PhD.

ANOTĀCIJA

Ļaundabīgā melanoma ir viens no agresīvākajiem, pret zālēm rezistentākajiem cilvēku audzēja veidiem, un saslimstība ar to pēdējo desmitgažu laikā ir pastāvīgi pieaugusi, īpaši baltādainajā populācijā. Saskaņā ar GLOBOCAN datiem 2018. gadā visā pasaulē konstatēti vairāk nekā 287 723 jauni ādas melanomas gadījumi (1,6 % no visiem vēža veidiem), un reģistrēti aptuveni 60 712 nāves gadījumi.

Ļaundabīgās melanomas diagnostikā un prognozēšanā plaši izmanto tādus tradicionālos histopatoloģiskos raksturlielumus kā audzēja histoloģiskais apakštips, Klārka invāzijas līmenis, Breslova biezums, solārā elastoze, čūlojums, regresija, limfovaskulārā invāzija, mitožu skaits, peritumorālā limfocitārā infiltrācija (*TIL*). Ir ziņots, ka melanomas patoģenēzē ir iesaistīti vairāki audzēja supresoru gēni un/vai onkogēni. Liela interese ir par *RAS-RAF-MEK-ERK*, *PI3K/PTEN* un *c-Kit* ceļiem, jo pacientiem, kuriem ir aktivizētas mutācijas *BRAF*, *NRAS* un *KIT* gēnos, varētu būt izdevīgas mērķterapijas iespējas vai mērķterapijas un imūnterapijas pielāgotas kombinācijas. Audzēja genomikas pētījumos fundamentāli uzdevumi ir noteikt, kuras somatiskās mutācijas varētu būt patoģenēzes “virzītājspēki”, un noskaidrot, kā mutējušie gēni ietekmē konkrēta audzēja bioloģiju. Lai pareizi ārstētu progresējušu melanomu, jau tagad tiek ieteikti identificēt variantus, kas liecina par atbildes reakciju vai rezistenci pret sistēmisku ārstēšanu, un molekulārā testēšana ir prioritāte terapijas kursa noteikšanā. Patiešām, molekulārā testēšana, lai noteiktu iedarbīgas mutācijas, ir obligāta pacientiem ar progresējušu slimību (neresektējama III vai IV stadijas slimība un ļoti ieteicama augsta riska rezekcionētas slimības IIc stadijas, IIIb–IIIc stadijas slimībām). Pēdējos gados pasaulē strauji attīstās personalizētās medicīnas virziens, kas balstās uz specifisku, konkrētai slimībai mērķtiecīgu terapiju, kā arī agrīnu audzēju diagnostiku un augsta riska grupu identificēšanu. Invazīva melanoma ir audzējs ar lielu ietekmi, jo saslimstība ar to strauji pieaug, tai ir augsta mirstība, sarežģītība un lieli aprūpes izdevumi progresējošās stadijās. Nesenie pētījumi liecina, ka melanomai ir nozīmīgas gan tradicionālās histopatoloģiskās īpašības, gan ģenētiskās izmaiņas.

Līdz šim *BRAF* mutācijas statusu plaši pārbauda rutīnas klīniskajā praksē progresējušu slimību gadījumos (IIC, III un IV stadija), tomēr ne Eiropas Medicīniskās onkoloģijas biedrības (ESMO), ne *NCCN* (*Network N.C.C. Cutaneous Melanoma*) vadlīnijās nav ieteikts veikt *BRAF* testēšanu agrīnas stadijas melanomai (IA–IIB stadija). Turklāt citu melanomas gēnu (*NRAS*, *TERT*) vienlaicīga analīze joprojām ir pretrunīgi vērtējama, un histopatoloģisko, klīnisko un ģenētisko raksturlielumu salīdzinošā vērtība un to nozīme bezrecidīva perioda dzīvildzes noteikšanā ādas melanomas agrīnā stadijā joprojām ir nepietiekami izprasta.

SATURS

ANOTĀCIJA	3
ABREVIATŪRAS.....	5
VISPĀRĪGS PĀRSKATS	6
Pētījuma mērķis.....	9
Darba uzdevumi	9
Darba hipotēze.....	10
Pētījums novitāte	10
Metožu pārskats.....	10
Ar darbu saistīti zinātniskie projekti	11
Publikācijas par promocijas darba tēmu.....	11
1. TEORĒTISKAIS PAMATOJUMS	13
1.1.Melanomas histopatoloģiskais novērtējums	15
1.2.Audzēja infiltrējošie limfocīti melanomas progresēšanas riska stratifikācijai.....	16
1.3. <i>BRAF</i> gēna mutācijas novērtējums melanomas progresēšanas riska stratifikācijai	17
1.4. <i>NRAS</i> gēna mutācijas novērtējums melanomas progresēšanas riska stratifikācijai	18
1.5. <i>TERT</i> gēna mutācijas novērtējums melanomas progresēšanas riska stratifikācijai	19
2. MATERIĀLI UN METODES	21
2.1.Pētījuma struktūra	21
2.2.Ētika	21
2.3.Izslēgšanas kritēriji.....	21
2.4.Klīniskais raksturojums.....	23
2.5.Audzēju infiltrējošo limfocītu novērtēšana un vērtēšana ar punktiem.....	23
2.6. <i>BRAF</i> un <i>NRAS</i> mutāciju novērtēšana	23
2.7.NGS testēšana	24
2.8.Statistiskā analīze	25
3. REZULTĀTI.....	26
3.1.Klīniskais raksturojums.....	26
3.2.Histopatoloģiskās īpašības	27
3.3.TIL pacientiem ar nodulāru un virspusēji augošu melanomu.....	27
3.4. <i>BRAF</i> mutācijas statuss un korelācija ar klīniski patoloģiskiem rādītājiem	29
3.5. <i>NRAS</i> mutācijas statuss un saistība ar klīniski patoloģiskiem rādītājiem	30
3.6.Ģenētiskās mutācijas melanomā, izmantojot paneļa sekvencēšanu (nepublicēti dati) 31	
3.7. <i>TERT</i> mutācijas statuss un tā saistība ar klīniski patoloģiskiem rādītājiem.....	31
3.8.Histopatoloģiskā un <i>BRAF</i> , <i>NRAS</i> un <i>TERT</i> mutāciju statusa nozīme attiecībā uz bezrecidīva periodu	32
4. DISKUSIJA.....	36
5. SECINĀJUMI.....	43
LITERATŪRAS SARAKSTS.....	45
PATEICĪBAS	50

ABREVIATŪRAS

AJCC	-	Amerikas Apvienotā vēža komiteja (<i>American Joint Committee on Cancer</i>)
<i>BRAF</i>	-	B-Raf protoonkogēns
CAP	-	Amerikas Patologu kolēģija (<i>College of American Pathologists</i>)
DNS	-	deoksiribonukleīnskābe
ESMO	-	Eiropas Medicīniskās onkoloģijas biedrība (<i>European Society for Medical Oncology</i>)
HGVS	-	Cilvēka genoma variāciju biedrība (<i>Human Genome Variation Society</i>)
HPF	-	Lieljaudas lauks (<i>High-power field</i>)
KSK	-	kumulatīvais saules kaitējums ((<i>CSD</i>) <i>cumulative sun damage</i>)
LVI	-	limfovaskulāra invāzija
MAPK	-	mitogēnu aktivētā proteīnkināze
NCCN	-	ādas melanomas tīkls (<i>National Comprehensive Cancer Network</i>)
NF-1	-	Neirofibromīns-1
NGS	-	nākamās paaudzes sekvenčēšana (<i>Next Generation Sequencing</i>)
<i>NRAS</i>	-	Neiroblastomas RAS vīrusa onkogēna homologs
PVO	-	Pasaules Veselības organizācija
SLN	-	sardzes limfmezgls
SS	-	Sangera sekvenčēšana
<i>TERT</i>	-	Telomerāzes reversā transkriptāze
<i>TIL</i>	-	peritumorālā limfocitārā infiltrācija (<i>Tumor-infiltrating lymphocytes</i>)
UV	-	utravioletais starojums
WES	-	visa eksoma sekvenčēšana (<i>Whole Exome Sequencing</i>)
WGS	-	visa genoma sekvenčēšana (<i>Whole Genome Sequencing</i>)

VISPĀRĪGS PĀRSKATS

Pēdējo gadu laikā visā pasaulē ir palielinājusies saslimstība ar ļaundabīgo melanomu, un pašlaik tā ir nozīmīga sabiedrības veselības problēma ((Hessler *et al.*, 2020; Forsea *et al.*, 2020). Ultravioletais starojums ir nozīmīgs riska faktors melanomas patoģenēzē, kas tieši bojā DNS (Hessler *et al.*, 2020; Shellenberger *et al.*, 2016). Turklāt melanomas agrīnai atklāšanai un melanomas audu biomarķieru novērtēšanai ir svarīga nozīme pacientu riska stratifikācijā, personalizētā diagnostikā un ārstēšanā (Mandala *et al.*, 2014; Romaine *et al.*, 2026; Bastian *et al.*, 2014; Clark *et al.*, 1989).

Pašreizējā Pasaules Veselības organizācijas (PVO) ādas audzēju klasifikācijā melanomu iedala pēc solārās elastozes, ko novērtē pēc ādas elastīgajām šķiedrām, lai noteiktu kumulatīvo saules kaitējumu (KSK) (Scolyer *et al.*, 2018). Saskaņā ar šo PVO klasifikāciju pašlaik ir trīs melanomu klases: melanomas, kas saistītas ar stipru KSK, melanomas, kas saistītas ar nelielu KSK, un nodulārās melanomas (Shellenberger *et al.*, 2016; Bastian *et al.*, 2014). Solārā elastoze parasti ir redzama virspusēji augošai un *lentigo maligna* melanomai, tā sauktai stipra KSK melanomai. Desmoplastiskā melanoma ir saistīta ar palielinātu solāro elastozī. Visbiežāk sastopamais stipra KSK melanomas apakštips ir virspusēji augoša melanoma, kas parasti sākas ar agrīnu radiālu augšanu, kam seko vertikāla augšana un invāzija dermā (Shellenberger *et al.*, 2016).

Akrālās, gļotādas, uveālās un špicoidālās melanomas nav saistītas ar KSK vai tām raksturīgs zems KSK. Nodulāro melanomu parasti raksturo kā zema KSK tipu ar agrīnu progresēšanu līdz vertikālai augšanai (Shellenberger *et al.*, 2016).

Lai gan pēdējās desmitgades laikā, ieviešot jaunu personalizētu melanomas ārstēšanu, kas balstīta uz *BRAF* inhibitoriem un imūnterapiju, ir samazinājies mirstības rādītājs, progresējošu un metastātisku melanomu joprojām ir grūti ārstēt (Clark *et al.*, 1989; Scolyer *et al.*, 2018; Azimi *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2017; Maibach *et al.*, 2020; Dougan *et al.*, 2018; Havel *et al.*, 2019; Ribas *et al.*, 2015., Cancer Genome Atlas Network, 2015). Tāpēc agrīna diagnostika un riska stratifikācija melanomas progresēšanai ir īpaši svarīga. Tomēr retie melanomas histopatoloģiskie apakštipi var apgrūtināt diagnostiku (Shellenberger *et al.*, 2016).

Tāpēc īpaši svarīgi ir noteikt agrīnas stadijas melanomas biomarķierus, lai prognozētu melanomas klīnisko uzvedību. Ir pierādīts, ka tādi klīniski patoloģiskie rādītāji kā audzēja izmērs, audzēja tips, audzēja invazivitāte (Breslova biezums, Klārka līmenis, limfovaskulāra invāzija, neirotropisms), čūlojums, audzēja mitotiskā aktivitāte ir nozīmīgi prognostiskie

faktori melanomas attīstībai un progresēšanai (Shellenberger et al., 2016; Bastian et al., 2014; Clark et al., 1989; Park et al., 2017). Turklāt ir pierādīts, ka peritumorālā limfocitārā infiltrācija var stratificēt melanomu zema un augsta progresēšanas riska grupās (Park et al., 2017; Scolyer et al., 2018; Azimi et al., 2012; Fortes et al., 2015).

Melanomas attīstība ir cieši saistīta ar somatiskām un epigēnētiskām izmaiņām. Tās patoģenēzē un evolūcijā ir iesaistītas dažādas mutācijas. Jaunākajā genomu klasifikācijā melanomu iedala četros galvenajos apakštipos, pamatojoties uz visbiežāk sastopamo nozīmīgi mutēto gēnu struktūru: mutēts *BRAF*, *RAS*, *NF1* un trīskāršais-*WT* (savvaļas tips). (Ribas et al., 2015; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Ny et al., 2020).

Molekulārās patoloģijas sasniegumi un ģenētisko biomarkķieru novērtēšana arvien biežāk tiek izmantota klīniskajā praksē melanomas diagnostikā, personalizētā ārstēšanā un prognozēšanā. Turklāt mūsdienu ārstēšanas vadlīnijās galvenā uzmanība pievērsta melanomas ģenētisko biomarkķieru novērtēšanai (Hessler et al., 2020; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Ny et al., 2020).

Ir izstrādātas vairākas klīniskās vadlīnijas, kurās galvenā uzmanība pievērsta ādas melanomas ģenētiskajai testēšanai (Michielin et al., 2019; Cancer Genome Atlas Network, 2020). Pašreizējās Eiropas Medicīniskās onkoloģijas biedrības ((*ESMO*) *European Society for Medical Oncology*) vadlīnijās noteikts, ka mutāciju testēšana jāveic visiem pacientiem ar progresējušu slimību, kas ietver III vai IV stadiju (rezekcionētu vai nerezekcionētu), un mutāciju testēšana ieteicama augsta riska patoloģiskās IIC stadijas melanomas pacientiem (Michielin et al., 2019). Tomēr *NCCN* vadlīnijās *BRAF* testēšana ir ieteicama III-IV stadijas melanomai. *NCCN* ekspertu grupa neiesaka *BRAF* testēšanu rezekcionētai I vai II patoloģiskās stadijas ādas melanomai (Cancer Genome Atlas Network, 2020).

Īpaši svarīgi ir novērtēt *BRAF* gēna mutāciju (Shellenberger et al., 2016; Cancer Genome Atlas Network, 2020). *BRAF* mutācijas novēro 40-60 % no visiem primārās ļaundabīgās melanomas gadījumiem (Cancer Genome Atlas Network, 2020; Ny et al., 2020; Rose et al., 2006; Michielin et al., 2019). *BRAF* mutāciju parasti novēro jaunākiem pacientiem, ādai bez KSK un virspusēji augošai melanomai, savukārt *NRAS* mutācijas melanomai raksturīgas nodulārajam apakštipam un KSK ādai (Hessler et al., 2020; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Ny et al., 2020; Rose et al., 2006; Michielin et al., 2019; Cancer Genome Atlas Network, 2020; Eigentler et al., 2016; Tas et al., 2019; Barnhill et al., 1996; Tuthill et al., 2002).

B-RAF ir viena no MAPK ceļā iesaistītajām signālkināzēm. *BRAF* mutācija izraisa MAPK signalizācijas kaskādes aktivizāciju. Visbiežāk sastopamā *BRAF* mutācija ir *V600E*,

kas veido 80 % gēna izmaiņu (Eigentler et al., 2016). Citas izplatītas *BRAF* gēna mutācijas ir *V600K* un *V600R* mutācijas (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Iepriekšējie pētījumi liecina, ka *BRAF V600E* mutācijas parasti novēro jaunākiem pacientiem un ekstremitātēs, savukārt *V600K* mutācijas ir saistītas ar vecāku pacientu vecumu un parasti tiek konstatētas galvā un kaklā (Cancer Genome Atlas Network, 2015; Ny et al., 2020; Michielin et al., 2019; Cancer Genome Atlas Network, 2020).

Jaunākie pierādījumi liecina, ka līdz pat 20-30 % gadījumu *NRAS* mutācijas pastāv vienlaikus ar *BRAF* mutācijām. Pacientiem, kuriem ir gan *BRAF*, gan *NRAS* mutācijas, ir sliktāka prognoze nekā pacientiem, kuriem ir tikai *BRAF* mutācijas melanoma (Tayloe et al., 2007; Raaijmakers et al., 2016).

Parasti *NRAS* mutācijas ir neatkarīgas no *BRAF* mutācijām, taču ir ziņots par dubulto ekspresiju (Tayloe et al., 2007). *NRAS* mutāciju saistība ar solārās elastozes pakāpi liecina, ka *NRAS* ir cieši saistīta ar UV starojuma izraisītajām mutācijām. Iepriekšējie pētījumi parādīja, ka *NRAS* mutācija ir saistīta arī ar samazinātu imūnreakciju peritumorālās melanomas audos un progresējošā audzēja stadijā (Raaijmakers et al., 2016).

Nesenie pierādījumi, kas iegūti, izmantojot visa eksoma un visa genoma sekvencēšanu (*WES* un *WGS*), norāda uz citu gēnu iesaistīšanos melanomas patoģenēzē, norādot, cik svarīgi ir vienlaikus pārbaudīt vairākus gēnus, lai labāk klasificētu trīs galvenos molekulāros melanomas apakštipus (*BRAFmut*, *NRASmut* un *ne-BRAFmut/ne-NRASmut*). [Scolyer et al., 2018; Fortes et al., 2015].

Līdz šim *BRAF* gēna mutāciju analīzei ir pieejamas dažādas molekulārās stratēģijas, piemēram, Sanger sekvencēšana (SS), reālā laika *PCR*, augstas izšķirtspējas kušanas analīze, ar peptīdu nukleīnskābes (*PNA*) starpniecību veikta reālā laika *PCR*, digitālā *PCR*, pirosekvencēšana un imūnhistoķīmija. Katra metode spēj noteikt mutācijas atsevišķos gēnos vienā sērijā ar noteiktu jutību, specifiskumu un noteikšanas robežu (Scolyer et al., 2018; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Ny et al., 2020; Rose et al., 2006; Michielin et al., 2019; Cancer Genome Atlas Network, 2020; Eigentler et al., 2016; Tas et al., 2019; Barnhill et al., 1996; Tuthill et al., 2002). Sākotnēji *Cobas 4800 BRAF V600* mutāciju tests (*Roche Molecular Systems*) un *THxID™-BRAF* komplekts (*BioMerieux, Inc.*) bija vienīgie FDA apstiprinātie testi *BRAF V600E* mutācijas noteikšanai un *BRAF V600E/V600K* mutāciju noteikšanai DNS paraugos, kas iegūti attiecīgi no cilvēka melanomas formalīnā fiksētiem un parafīnā iegultiem ((*FFPE*) *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) audiem (Scolyer et al., 2018).

Lieljaudas nākamās paaudzes sekvencēšanas (*NGS*) tehnoloģijas ieviešana ir revolucionizējusi izpratni par vēža bioloģiju un uzlabojusi personalizētas ārstēšanas stratēģijas

attiecībā uz daudziem un dažādiem cilvēku vēža veidiem, tostarp melanomu. NGS mērķtiecīgas gēnu sekvenēšanas paneļu izstrāde un izmantošana var būt pievilcīga metode slimnīcās un klīnikās, jo ar tiem var vienlaicīgi pārbaudīt ar slimību saistītas mutācijas vairākos gēnos vienā reizē, tādējādi samazinot gan reaģentu izmaksas, gan nepieciešamo DNS daudzumu, turklāt ar pietiekamu jutību un specifiskumu, lai noteiktu somatiskos variantus ar biežumu, kas pārsniedz 5 % (Romaine, et al., 2016).

TERT promotera mutācijas klātbūtne ir saistīta ar īsāku bezrecidīva periodu melanomas gadījumā (Scolyer *et al.*, 2018; Azimi *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2017; Maibach *et al.*, 2020). Šo efektu modificēja *TERT* promotera ietvaros izplatīts polimorfisms *rs2853669*, kas izjauc jau esošo nekanonisko *ETS2* vietu *TERT* promotera proksimālajā apgabalā, kas atrodas tieši blakus E-box (Maibach *et al.*, 2020). Turklāt tika ziņots, ka *TERT* promotera mutācijas špicoidālos melanocītiskos jaunveidojumos prognozē agresīvu klīnisko uzvedību Dougan, et al., 2018 ().

Iepriekšējos pētījumos tika konstatēta *NRAS*, *BRAF* un *TERT* gēnu mutāciju līdzāspastāvēšana, tomēr to klīniskā un prognostiskā nozīme joprojām tiek apspriesta (Hessler, et al., 2020; Forsea et al., 2020; Shellenberger et al., 2016; Mandala et al., 2014). Vienlaicīga *BRAF* un *NRAS* gēnu mutācija var izraisīt rezistenci pret *MEK* inhibīciju. Tomēr pašreizējie pierādījumi ir nepietiekami, lai liecinātu, ka kopmutācijas klātbūtne prasītu mainīt klīnisko novērošanu un ieteicamo ārstēšanu.

Rezumējot, pašreizējās klīniskās vadlīnijas neprasa veikt ģenētisko testēšanu agrīnas stadijas melanomai (IA-IIB stadija), turklāt *BRAF*, *NRAS* un *TERT* kopmutācijas nozīme melanomas prognozēšanā un ārstēšanas vadlīnijās joprojām tiek pētīta. Turklāt *BRAF*, *NRAS* un *TERT* mutācijas statusa salīdzinošā saistība ar agrīnas stadijas melanomas histopatoloģiskajām pazīmēm joprojām nav pietiekami izpētīta.

Pētījuma mērķis

Novērtēt *BRAF*, *NRAS*, *TERT* ģenētiskās mutācijas un to saistību ar klīniskajiem, histopatoloģiskajiem rādītājiem un slimības bezrecidīva periodu pacientiem ar agrīnu ādas invazīvu melanomu (IA–IIC stadijā).

Darba uzdevumi

- 1) Novērtēt klīniskos un histopatoloģiskos rādītājus pacientiem ar ādas invazīvu melanomu IA–IIC stadijā;

- 2) Novērtēt histopatoloģiskos rādītājus pacientiem ar ādas invazīvu melanomu IA–IIC stadijā;
- 3) Novērtēt *BRAF*, *NRAS* un *TERT* mutācijas pacientiem ar ādas invazīvu melanomu IA–IIC stadijā;
- 4) Novērtēt asociācijas starp klīniskajiem, histopatoloģiskajiem rādītājiem un *BRAF*, *NRAS*, *TERT* mutācijas stāvokli;
- 5) Novērtēt asociācijas starp slimības bezrecidīva periodu un klīniskajiem, histopatoloģiskajiem rādītājiem, *BRAF*, *NRAS*, *TERT* mutācijas stāvokli.

Darba hipotēze

Pašreizējās klīniskās vadlīnijas paredz melanomas audu testēšanu tikai pacientiem IIC, III un IV stadijā. Taču vadlīnijas neparedz ģenētisku testēšanu pacientiem ar agrīnu melanomu (IA–IIB klīniskā stadijā).

Mūsu darba hipotēze – dažādu ģenētisko mutāciju savstarpēja mijiedarbība pacientiem ar agrīnu melanomu (IA–IIC stadijā) ir saistīta ar melanomas klīniskajiem, histopatoloģiskajiem rādītājiem un korelē ar slimības prognozi (bezrecidīva periodu).

Pētījums novitāte

Asociāciju novērtēšana starp *BRAF*, *NRAS*, *TERT* mutāciju un klīniskajiem, histopatoloģiskajiem rādītājiem un bezrecidīva periodu.

Metožu pārskats

Pētījumā retrospektīvi tika iekļauti simt piecdesmit pacienti, kuriem 2012.-2018. gadā Rīgas Austrumu klīniskajā universitātes slimnīcā, Latvijas Onkoloģijas centrā tika veikta melanomas IA-IIC stadijas ķirurģiska ārstēšana. Šajā pētījumā tika iekļauti tikai pacienti ar primāru ādas nodulāru un virspusēji augošu ļaundabīgu invazīvu melanomu.

Tika analizēti tādi melanomas pacientu klīniskie rādītāji kā vecums, dzimums, audzēja atrašanās vieta, izmērs. Dažādi klīniskie faktori – vecums, dzimums, novērošanas ilgums pēc operācijas, recidīvs vai metastāzes – tika iegūti no medicīniskās dokumentācijas.

Melanomas histopatoloģiskās īpašības tika pārskatītas saskaņā ar pašreizējām PVO un CAP vadlīnijām (Scolyer et al., 2018). Tika vērtēti tādi raksturlielumi kā audzēja tips, čūlojums, peritumorālā limfocitārā infiltrācija, Klārka invāzijas līmenis, Breslova biežums, limfovaskulārā invāzija, neirotropisms, regresija un mitotiskā aktivitāte. Turklāt tika reģistrētas izgriešanas līnijas un attālums no audzēja. Pamatojoties uz histopatoloģisko novērtējumu, tika noteikta pTNM stadija.

BRAF un *NRAS* mutācijas statusu novērtēja, izmantojot digitālo pilienu *PCR* (*ddPCR*), izmantojot *BRAF* V600 (#12001037 un #1863100, *NRAS* Q61 (#12001006) un *NRAS* G12/G13 (#12001627) skrīninga testus (visi *Bio-Rad*, ASV) saskaņā ar ražotāja instrukcijām. *TERT* mutācijas statusu novērtēja, izmantojot nākamās paaudzes sekvencēšanu (NGS). Tika izmantots *Qiagen pac-cancer-multimodal* paneļa gēnu komplekts (kat. Nr. / ID: 334942).

Ar darbu saistīti zinātniskie projekti

Pētījums tika atbalstīts projekta “Doktorantūras kapacitātes stiprināšana Latvijas Universitātē jaunā doktorantūras modeļa ietvaros”, identifikācijas Nr. 8.2.2.0/20/I/006.

Publikācijas par promocijas darba tēmu

Zinātnisko rakstu krājumā iekļautie zinātniskie raksti

1. **Zablocka, T.**, Kreismane, M., Pjanova, D., Isajevs, S. (2022). Effects of BRAF V600E and NRAS mutational status on the progression-free survival and clinicopathological characteristics of patients with melanoma. *Oncol Lett.*; 25(1):27..
2. **Zablocka, T.**, Nikolajeva, A., Kreismane, M., Pjanova, D., Isajevs, S. (2021). Addressing the importance of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes in disease progression and clinicopathological characteristics. *Mol Clin Oncol.*;15(6):255.
3. **Zablocka, T.**, Isajevs, S. (2023). The value of histopathological characteristics, BRAF and NRAS mutation for the diagnosis, risk stratification and prognosis of malignant invasive melanoma. *InTech Open*, 45-57.
4. **Zablocka, T.**, Pjanova, D., Isajevs, S. (2023). The value of BRAF, NRAS and TERT co-mutations on histopathological characteristics and progression free survival in early stage cutaneous melanoma. *Virchows Archiv*. (iesniegts 29. oktobrī, 2023).

Prezentācijas zinātniskās konferencēs ar publicētiem kopsavilkumiem

7 ziņojumi starptautiskās zinātniskās konferencēs:

1. The value of peritumoral lymphocyte infiltration in progression free survival in BRAF and NRAS mutant stage I and II melanoma: a retrospective cohort study / T. Zablocka, V. Kregere, S. Savcenko, L. Sulca, M. Kreismane, D. Pjanova, S. Isajevs // *Virchows Archiv* Vol. 481, S1: 34th European Congress of Pathology: Abstracts (2022), Abstract Number PS-12-004, p.S130.
2. Comparative Study of NRAS and BRAF Mutation Status with Clinical and Histopathological Characteristics of Melanoma. Zablocka Tatjana, Kreismane Madara, Pjanova Dace, Isajevs Sergejs. *Medicina*, 2022, Vol.58, Suppl.1., 59.
3. BRAF V600 E mutational status correlated with increased numbers of tumour - infiltrating lymphocytes in patients with melanoma / Anna Nikolajeva, Dace Pjanova, Sergejs Isajevs, Tatjana Zablocka // *Medicina* (Kaunas) Nr.56, Suppl.1: Abstracts of the 78th International Scientific Conference of the University of Latvia Riga, Latvia (2020), p.161.
4. Clinicopathological significance of tumor-infiltrating lymphocytes in cutaneous melanoma / Anna Nikolajeva, Dace Pjanova, Sergejs Isajevs, Tatjana Zablocka (Operative Dermatologie) // *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* Vol. 18, Supplement 1: Abstractband der Dermatologie Kompakt & Praxisnah, 07.-08. Februar 2020, Dresden (2020), p. A35, Meeting Abstract: P074.

5. Zablocka T, Ozola A, Mohamed O, Savčenko S, Isajevs S, Pjanova D. The correlation of BRAF V600 Mutational Status with tumour infiltrating lymphocytes in melanoma. *Modern Pathology*, 2020, S345.
6. The correlation of BRAF V600 Mutational Status with histopathological characteristics in melanoma / Tatjana Zablocka, Aija Ozola, Mohamed Omar, Selga Savčenko, Sergejs Isajevs, Dace Pjanova// 59th IAP Thailand Annual Meeting, November 6-9, 2019, Bangkok: Abstracts Bangkok, 2019 P.45.
7. BRAF V600 mutational status in melanoma Correlates with tumour histopathological characteristics / Oksana Isankova, Renāte Novicka, Aija Ozola, Omar Mohamed, Selga Savčenko, Miķelis Pūķis, Tatjana Zablocka, Sergejs Isajevs, Dace Pjanova// *Medicina (Kaunas)* Vol. 55, Suppl.1: International Scientific Conference on Medicine, 77th International Scientific Conference of the University of Latvia, Riga, February 22, 2019: Abstracts (2019), p.86.

1. TEORĒTISKAIS PAMATOJUMS

Ļaundabīgās melanomas saslimstība visā pasaulē pieaug, un pašlaik tā ir nozīmīga sabiedrības veselības problēma (Hessler et al., 2020; Forsea et al., 2020). Vairāk nekā 97 % visu melanomu diagnosticē zināmajā primārajā vietā, visbiežāk ādā (3). Turklāt melanoma var rasties arī acī vai iekšējo orgānu gļotādā (Shellenberger et al., 2016). Reti melanoma tiek diagnosticēta bez acīmredzamas primārās vietas, un to sauc par nezināmas primārās vietas melanomu (*MUP melanoma of unknown primary*) [Shellenberger et al., 2016].

Galvenā MUP hipotēze ir saistīta ar spontānu melanomas regresiju no zināmās primārās vietas (Shellenberger et al., 2016). Metastātiska melanoma var attīstīties sinhroni ar subklīnisku vai citādi neatpazītu ādas, acu vai gļotādas melanomu.

Ultravioletais starojums ir nozīmīgs riska faktors melanomas patoģenēzē, kas tieši bojā DNS (Hessler et al., 2020; Forsea et al., 2020; Shellenberger et al., 2016).

Melanomas patoģenēzē ir iesaistītas vairākas somatiskās un epiģenētiskās izmaiņas. Turklāt melanomas patoģenēzē nozīmīga loma ir arī imūnreakcijai un imunoloģiskās tolerances traucējumiem (Shellenberger *et al.*, 2016; Mandala *et al.*, 2014).

Ļaundabīgo audzēju skrīnings, agrīna diferenciāldiagnostika, personalizēta ārstēšanas izvēle un ārstēšanas ietekmes novērtēšana līdz šim ir bijis svarīgs jautājums gan medicīnas, gan sociālajā jomā. Meklējot instrumentus un/vai diagnostikas rīkus, kas spēj atklāt vēzi agrīnā stadijā, ir apsvērta izelpotā gaisa, asins biomarķieru, urīna testēšanas, kā arī attēlveidošanas metožu izmantošana. Tomēr ir maz pierādījumu par ļaundabīgās melanomas agrīnu atklāšanu un riska stratifikāciju (Mandala et al., 2014; Romaine et al., 2016). Histopatoloģiskajai diagnozei un biomarķieru kvalitatīvai un kvantitatīvai novērtēšanai ir ievērojama starpnovērotāju mainība, kas ierobežo to lietderību individuāliem pacientiem. Turklāt specializētiem dermatopatologiem ir lielāka atbilstība; tomēr šādas zināšanas nav plaši pieejamas. Tāpēc ir svarīgi standartizēt novērtējumu (Shellenberger *et al.*, 2016).

Dziļā mācīšanās – automatizēta pieeja, kas izmanto marķētus attēlus un pamatojas uz mākslīgu intelektu, lai apmācītu tīklu bez citiem pieņēmumiem, – ir izrādījusies noderīga daudzās līdzīgās digitālās patoloģijas jomās.

Pēdējos gados ir panākts ievērojams progress proteomikas, metabolomikas un genomikas jomā, tomēr histopatoloģiskā izmeklēšana joprojām ir melanomas diagnozes un prognozes zelta standarts (Shellenberger *et al.*, 2016; Mandala *et al.*, 2014; Romaine *et al.*, 2016; Bastian *et al.*, 2014; Clark et al., 1989; Scolyer *et al.*, 2018).

Pašreizējā Pasaules Veselības organizācijas (PVO) ādas audzēju klasifikācijā melanoma iedalīta, pamatojoties uz solāro elastozi, ko novērtē pēc ādas elastīgajām šķiedrām, lai noteiktu kumulatīvo saules kaitējumu (Scolyer *et al.*, 2018). Pamatojoties uz šo PVO klasifikāciju, melanomu no jauna iedalīja trīs klasēs: melanomas, kas saistītas ar kumulatīvo saules kaitējumu (KSK), melanomas, kas nav saistītas ar KSK, un nodulāro melanomu (Scolyer *et al.*, 2018). Ar KSK saistītās melanomas ceļi ir virspusēja augšana, *lentigo maligna* un desmoplastiskās melanomas. Virspusēji augoša melanoma ir visbiežāk sastopamais apakštips, un tai raksturīga agrīna radiāla augšana, kam seko vertikāla augšana un vēlāka invāzija dermā (Shellenberger *et al.*, 2016; Bastian *et al.*, 2014). Melanomas, kas nav saistītas ar KSK, iedala špicoidālās, akrālās, gļotādas un uveālās melanomās, kā arī melanomās, kas rodas iedzimtos un zilos nevos. Visbeidzot, nodulārajai melanomai ir raksturīga agrīna pāreja uz vertikālu augšanu (Shellenberger *et al.*, 2016).

Melanomas attīstība ir cieši saistīta ar somatiskām un epigēnētiskām izmaiņām. Melanomas patogēnēzē un evolūcijā ir aprakstītas dažādas mutācijas. Jaunākajā genomu klasifikācijā melanoma iedalīta četros apakštipos, pamatojoties uz visbiežāk sastopamo nozīmīgi mutēto gēnu struktūru: mutētais *BRAF*, *RAS*, *NF1* un trīskāršais-WT (savvaļas tips) [Shellenberger *et al.*, 2016; Romaine *et al.*, 2016].

BRAF, *CDKN2A* un *NRAS* mutācijas ir vissvarīgākās un klīniski nozīmīgākās. Lai gan pēdējās desmitgades laikā, ieviešot jaunu personalizētu melanomas ārstēšanu, kas balstīta uz *BRAF* inhibitoriem un imūnterapiju, ir samazinājies mirstības rādītājs, progresējošu un metastātisku melanomu joprojām ir grūti ārstēt (Scolyer *et al.*, 2018; Azimi *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2015).

Turklāt melanomas progresēšanā liela nozīme ir imunoloģiskās tolerances mehānismiem (Taylor *et al.*, 2007; Raaijmakers *et al.*, 2016).

Ģimenes melanomu vidū bieži tiek konstatētas ciklīnneatkarīgā kināzes inhibitora 2A gēna (*CDKN2A*) dzimtas mutācijas, un to izplatība ģimenēs, kurās trīs vai vairāk locekļiem diagnosticēta melanoma, svārstās no 20 % līdz 50 % (Park *et al.*, 2017). *CDKN2A* ģenētiskās mutācijas ir saistītas arī ar ģenētisku atipisku multiplo dzimumzīmju melanomu (*FAMMM*) sindromu – autosomāli dominējošu stāvokli, ko raksturo melanoma ģimenē un liels skaits atipisku dzimumzīmju (Mandala *et al.*, 2014). Atklājums, ka 1. programmētās šūnu nāves proteīna 1 ligandu (PDL1) un PDL2 ekspresē melanomas šūnas, T šūnas, B šūnas un dabiskās nāvējošās šūnas, noveda pie tā, ka nesen tika izstrādātas 1. programmētās šūnu nāves proteīna (PD1) specifiskas antivielas (piemēram, nivolumabs un pembrolizumabs). Melanomas

ārstēšanā labvēlīgu ietekmi uzrādīja dažādi mērķēti līdzekļi, tostarp PD-L1, CTLA4 mērķēšana (Havel *et al.*, 2019; Ribas *et al.*, 2015).

Turklāt tika pierādīts, ka pacientiem ar lokāli progresējušu un metastātisku melanomu ir vērtīga imunoterapija ar onkolītisko ECHO-7 vīrusu *Rigvir* (Sorokins *et al.*, 2020).

Ir pierādīts, ka tādi klīniski patoloģiskie rādītāji kā audzēja izmērs, audzēja tips, audzēja invazivitāte (Breslova biezums, Klārka invāzijas līmenis, limfovaskulārā invāzija, neirotropisms), čūlojums, audzēja mitotiskā aktivitāte ir nozīmīgi prognostiskie faktori melanomas attīstībai un progresēšanai (Clark *et al.*, 1989; Scolyer *et al.*, 2018; Dougan *et al.*, 2018; Platz *et al.*, 2008; Yaman *et al.*, 2015; Bezic *et al.*, 2019; Spathis *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2015; Estrozi *et al.*, 2014; Aksenenko *et al.*, 2015; Leslie *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2021; Ardekani *et al.*, 2013; Nagore *et al.*, 2014)). Turklāt ir pierādīts, ka peritumorālā limfocitārā infiltrācija var stratificēt melanomu zema un augsta progresēšanas riska grupās (Burton *et al.*, 2011; Mandala *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2013; Clemente *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 2016; Tas *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2016; Weiss *et al.*, 2016; Platz *et al.*, 2008).

Melanomas histopatoloģiskajā novērtēšanā aizvien biežāk tiek izmantoti diagnostikas un ārstēšanas molekulārie marķieri (Mandala *et al.*, 2014). Šie marķieri ne tikai palīdz diagnosticēt melanomu, bet arī atšķirt dažus apakštīpus, kurus citādi varētu būt grūti noteikt (Cancer Genome Atlas Network, 2015; Ny *et al.*, 2020; Rose *et al.*, 2006; Michielin *et al.*, 2019; Cancer Genome Atlas Network, 2020; Eigentler *et al.*, 2016; Tas *et al.*, 2019; Barnhill *et al.*, 1996). *BRAF* mutācijas melanomai galvenokārt raksturīga virspusēji augoša melanoma, jaunāks pacientu vecums, āda bez KSK, savukārt *NRAS* mutācijas melanomai raksturīgs nodulārs apakštīps un KSK āda (Raaijmakers *et al.*, 2016).

Parasti *NRAS* mutācijas rodas neatkarīgi no *BRAF* mutācijām, taču ir ziņots par dubulto izpausmi (Raaijmakers *et al.*, 2016). *NRAS* un ādas saistība ar KSK liecina, ka šādu mutāģenēzi izraisa UV starojums. Pozitīva *NRAS* ekspresija bija saistīta arī ar zemāku audzēju infiltrējošo limfocītu līmeni un vēlīnāku audzēja stadiju Raaijmakers *et al.*, 2016 (). Tomēr *NRAS* mutācijas noteikšanas prognostiskā vērtība nav skaidra.

1.1. Melanomas histopatoloģiskais novērtējums

Mūsdienās melanomas histopatoloģiskā izmeklēšana ir balstīta uz pašreizējo PVO klasifikāciju un *CAP* vadlīnijām (Scolyer *et al.*, 2018). Pastāvīgi tiek vērtēti tādi kritēriji kā audzēja tips, čūlojums, peritumorālā limfocitārā infiltrācija (*TIL*), Klārka invāzijas līmenis, Breslova biezums, limfovaskulārā invāzija, neirotropisms, regresija, mitotiskā aktivitāte.

Turklāt tiek reģistrētas izgriešanas līnijas un attālums no audzēja. Pamatojoties uz histopatoloģisko novērtējumu, novērtē pTNM stadiju (Scolyer *et al.*, 2018).

Tā kā Breslova biežumam ir īpaša nozīme TNM stadijā, digitālo priekšmetstikliņu analīze varētu sniegt labākus pierādījumus invāziju noteikšanai, jo īpaši robežgadījumos. Melnomas amelanotiskais izskats apgrūtina diagnostiku. Imunohistoķīmiskā krāsošana, kas ir pozitīva attiecībā uz S100, SOX-10, HMB-45, Melan-A, Mart-1 un tirozināzi, atbalsta melanomas diagnozi (Shellenberger *et al.*, 2016).

Dažas melanomas, īpaši regresējušas un metastātiskas, var zaudēt HMB-45, *Melan A* un tirozināzes ekspresiju, un šādā gadījumā melanomas imūnhistoķīmiskais novērtējums ir vienkāršs. Šādos gadījumos parasti ir raksturīga tikai S-100 un vimentīna ekspresija.

Nesen tika atklāts, ka p16 ekspresija melanomā ir ievērojami samazināta salīdzinājumā ar dzimumzīmi (Dougan *et al.*, 2018). Turklāt preferenciāli izteikts antigēns melanomā (*PRAME*) *preferentially expressed antigen in melanoma* ir pierādīts kā imūnhistoķīmiskais marķieris, kas palīdz diagnosticēt ļaundabīgu melanomu (Yang *et al.*, 2020).

1.2. Audzēja infiltrējošie limfocīti melanomas progresēšanas riska stratifikācijai

Audzēju infiltrējošos limfocītus (*TIL*) uzskata par saimnieka imūnās atbildes reakcijas uz audzēju izpausmi (Dougan *et al.*, 2018; Havel *et al.*, 2019; Ribas *et al.*, 2015).

Audzējiem piemīt dažādi ar šūnu membrānu saistīti antigēni, kurus imūnsistēma atpazīst kā ne savu, un tas stimulē citotoksisku imūno reakciju, ko raksturo CD4, CD8, antigēnu pārstāvošās šūnas un citu iekaisuma šūnu infiltrācija. Šīs infiltrējošās šūnas tiek atpazītas kā atbildes reakcija ar imūnās uzraudzības mehānismiem, kas paredzēti, lai kavētu audzēja augšanu un izplatīšanos. Pretvēža imunitātē ir plaši aprakstīti peritumorālā limfocitārā infiltrācija (*TIL*), galvenokārt CD4 un CD8 T šūnas. T-regulējošie limfocīti nomāc imūnsistēmas atbildes reakciju un parasti ekspresē FOXP3, CD4 un CD25 (Dougan *et al.*, 2018; Havel *et al.*, 2019; Ribas *et al.*, 2015).

Iepriekš ir pierādīts, ka *TIL* pakāpe ir neatkarīgs dzīvildzes un sargmezglu (SLN) statusa rādītājs melanomas pacientiem. Pacientiem ar izteiktu *TIL* infiltrātu ir labāka prognoze (Fortes *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2017; Maibach *et al.*, 2020). Turklāt augstāks *TIL* līmenis primārās invazīvās melanomas paraugos ir saistīts ar zemāku ļaundabīgā audzēja izraisītas nāves risku (Leslie *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2021).

Tomēr literatūrā nav atrisinātas diskusijas par to, vai *TIL* pakāpe ir pietiekami stabils prognostisks rādītājs, lai to iekļautu stadijas noteikšanā pēc *AJCC* klasifikācijas (Scolyer *et al.*, 2018). Imūnsistēmas rādītāji, jo īpaši *TIL* pakāpe, nav standarta melanomas patoloģijas

ziņojumu sastāvdaļas, jo tie vēl nav apstiprināti un novērtēti kā būtiski ietekmējoši kopējo dzīvildzes ilgumu vai klīnisko pārvaldību (Shellenberger *et al.*, 2016)). Turklāt *TIL* saistība ar labāku melanomas prognozi joprojām ir pretrunīga (Clemente *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 2016; Tas *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2016).

Nesenie pētījumi liecina, ka palielināts *TIL* infiltrāts ir saistīts ar labvēlīgākiem dzīvildzes rezultātiem (Weiss *et al.*, 2016).

Mūsu iepriekšējos pētījumos tika konstatēts, ka melanomas pacientiem ar augstu *TIL* pakāpi ir ievērojami labāks bezrecidīva periods nekā pacientiem ar zemu *TIL* pakāpi [48]. Balstoties uz mūsu pētījuma rezultātiem, *TIL* vērtējumu iesakām iekļaut šādā vērtēšanas sistēmā no 0 līdz 3. Tā tika definēta šādi: 0 = limfocītu neesamība audos, 1 = limfocītu klātbūtne, kas aizņem < 25 % audu, 2 = limfocītu klātbūtne, kas aizņem no 25 līdz 50 % audu, un 3 = limfocītu klātbūtne, kas aizņem > 50 % audu. Zema *TIL* infiltrācija tika definēta kā 0 un 1. Augsta *TIL* infiltrācija tika definēta kā 2 un 3 punkti [Zablocka *et al.*, 2021].

1.3. *BRAF* gēna mutācijas novērtējums melanomas progresēšanas riska stratifikācijai

B-RAF ir viena no signalizācijas kināzēm, kas darbojas pa MAPK ceļu. *BRAF* mutācijas ir visbiežāk sastopamās ģenētiskās izmaiņas ādas melanomas gadījumā, un tās sastopamas 40–60 % gadījumu (Forsea *et al.*, 2020; Elder *et al.*, 2020; Fong *et al.*, 2008; Hodi *et al.*, 2010; Topalian *et al.*, 2014; Dummer *et al.*, 2018; Melis *et al.*, 2017; Pracht *et al.*, 2015; Davies *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2011; Menzies *et al.*, 2012; Colebatch *et al.*, 2019; Chiappetta *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2011; Tas *et al.*, 2019; Jakob *et al.*, 2012). Mutācijas šajā onkogēnā izraisa konstitutīvu MAPK ceļa aktivāciju. Visbiežāk sastopamā *BRAF* mutācija ir *V600E*, kas veido 80 % gēna izmaiņu (Ny *et al.*, 2020; Rose *et al.*, 2006; Miechielin *et al.*, 2019). Citas zināmās *BRAF* mutācijas ir *V600K* un *V600R* mutācijas (Ny *et al.*, 2020; Rose *et al.*, 2006; Miechielin *et al.*, 2019).

Pētījumi liecina, ka *V600E* ir saistīta ar virspusējas izplatīšanās apakštipu, jaunāku pacientu vecumu un ādas vietām bez hroniskiem saules iedarbības izraisītiem bojājumiem, piemēram, ekstremitātēm, savukārt *V600K* mutācijas ir saistītas ar ādas vietām ar KSK, piemēram, galvu un kaklu, un gados vecākiem pacientiem (Ny *et al.*, 2020; Rose *et al.*, 2006; Miechielin *et al.*, 2019; Jakob *et al.*, 2012; Ugurel *et al.*, 2007; Devitt *et al.*, 2011; Heppt *et al.*, 2017). Turpretī *V600K* mutācijas ir saistītas ar ādas vietām ar KSK, piemēram, galvu un kaklu, un gados vecākiem pacientiem (Menzies *et al.*, 2012).

Nesen labdabīgu melanocītisku dzimumdziedzeru visa genoma sekvencēšana parādīja, ka papildus *NRAS* mutācijām ir arī *BRAF* mutācijas, kuru mutācijas slodze pozitīvi korelē ar UV starojuma iedarbību, savukārt iedzimtiem nevi tika novērota mazāka mutācijas slodze (Colebatch *et al.*, 2019).

Mūsu iepriekšējos pētījumos tika atklāta saistība starp *BRAF V600* mutācijas statusu un pacientu jaunāku vecumu, Klārka invāzijas līmeni, Breslova biezumu, limfovaskulāro invāziju, sieviešu dzimumu un *TIL* (Ny *et al.*, 2020; Rose *et al.*, 2006; Chiappetta *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2011; Tas *et al.*, 2019; Jakob *et al.*, 2012; Ugurel *et al.*, 2007; Devitt *et al.*, 2011; Heppt *et al.*, 2017).

1.4. *NRAS* gēna mutācijas novērtējums melanomas progresēšanas riska stratifikācijai

NRAS mutācijas nozīme melanomas progresēšanā ir pretrunīga. Dažos pētījumos tika konstatēta saistība starp *NRAS* mutāciju un melanomas prognozi, savukārt citos pētījumos *NRAS* mutācijas nozīme melanomas prognozes novērtēšanā netika konstatēta (Jakob *et al.*, 2012; Ugurel *et al.*, 2007; Devitt *et al.*, 2011; Heppt *et al.*, 2017; Ellerhorst *et al.*, 2011; Schlaak *et al.*, 2013; Bucheit *et al.*, 2013).

RAS proteīni ir mazas intracelulāras *GTP*, un normālos cilvēka melanocītos pastāv gan ar *GTP* saistītas aktīvās, gan ar *GDP* saistītas neaktīvās formas. Receptoru tirozīnkināzes (RTK) signāli izraisa pāreju uz *NRAS* aktīvu stāvokli, ko nodrošina gvanīnnukleotīdu apmaiņas faktoru piesaistīšana. *NRAS* mutantām melanomām bieži ir traucēta šūnu cikla regulācija, ko raksturo ciklīna D1 paaugstināta regulācija un audzēja supresora p16INK4A zudums (Forsea *et al.*, 2020).

NRAS gēns visbiežāk mutē 2. eksona (12. un 13. kodons) un 3. eksona (61. kodons) karstajos punktos [Jakob *et al.*, 2012; Ugurel *et al.*, 2007; Devitt *et al.*, 2011; Heppt *et al.*, 2017; Ellerhorst *et al.*, 2011; Schlaak *et al.*, 2013; Bucheit *et al.*, 2013]. *NRAS* mutācijas iepriekš tika saistītas ar primārā audzēja nodulāro apakštipu un lokalizāciju saules bojātā ādā [Jakob *et al.*, 2012; Ugurel *et al.*, 2007; Devitt *et al.*, 2011).].

Daži pētījumi liecina, ka *NRAS* mutācija ir saistīta ar labvēlīgu prognozi (Ellerhorst *et al.*, 2011). Turpretī citos pētījumos pierādīts, ka *NRAS* gēna mutācija ir saistīta ar sliktāku prognozi (Jakob *et al.*, 2012; Ugurel *et al.*, 2007; Devitt *et al.*, 2011). Savukārt dažos pētījumos netika konstatēta būtiska saistība starp *NRAS* mutāciju un melanomas prognozi (Heppt *et al.*, 2017; Ellerhorst *et al.*, 2011). *NRAS* mutācijas novērtēšana ir lietderīga, jo tiek apsvērta melanomas ar *NRAS* mutāciju mērķtiecīga ārstēšana (Grimaldi *et al.*, 2017).

1.5. *TERT* gēna mutācijas novērtējums melanomas progresēšanas riska stratifikācijai

Nesen Nagore *et al.* sniedza provizoriskus pierādījumus, ka I/II stadijas melanomas pacientiem *TERT* promotera statusu kombinācijā ar *BRAF/NRAS* mutācijām var izmantot, lai identificētu pacientus ar agresīvas slimības risku un turpmākas prognozes precizēšanas iespēju, novērtējot *rs2853669* polimorfismu *TERT* promotera ietvaros (Nagore *et al.*, 2014).

Nesen mērķtiecīga molekulārā terapija ir revolucionizējusi solīdo audzēju ārstēšanu, tāpēc ir nepieciešama klīniskā līmenī veikta, kvalitātes ziņā kontrolēta audzēju molekulārā profilēšana. Papildus ārstēšanas vadlīnijām molekulārās testēšanas dati sniedz arī ieskatu par slimības patoģenēzi un rezistenci pret ārstēšanu. Piemēram, sarkomu un leukēmiju/limfomu gadījumā molekulārā testēšana jau sen ir nepieciešama visprecīzākās diagnozes noteikšanai (Forsea *et al.*, 2020; Elder *et al.*, 2020; Fong *et al.*, 2008; Hodi *et al.*, 2010; Topalian *et al.*, 2014; Dummer *et al.*, 2018; Melis *et al.*, 2017; Pracht *et al.*, 2015). Uz NGS balstītu molekulāro profilēšanu tagad izmanto, lai vienlaicīgi iegūtu diagnostisku un prognozējošu informāciju, kas palīdz vadīt klīnisko aprūpi. Genomikas dati melanomas gadījumā lielākoties iegūti no Vēža genoma atlasa ((*TCGA*) *The Cancer Genome Atlas*). Šie dati lielākoties attiecas tikai uz lieliem un metastātiskiem audzējiem, tāpēc primārās ādas melanomas ir nepietiekami pārstāvētas *TCGA*, jo melanomas primāro audzēju izmēri ir salīdzinoši mazi. Tā kā *TCGA* netika sekvencētas labdabīgas melanocītu proliferācijas, mazāk zināms par genomu izmaiņu spektru, kas var būt sastopams šādos bojājumos (Ribas *et al.*, 2015; Cancer Genome Atlas Network, 2015).

TERT promotera mutācijas esamība ir saistīta ar īsāku bezrecidīva periodu melanomas gadījumā (Scolyer *et al.*, 2018; Maibach *et al.*, 2020). Šo efektu modificēja *TERT* promotera ietvaros izplatīts polimorfisms *rs2853669*, kas izjauc jau esošo nekanonisko *ETS2* vietu *TERT* promotera proksimālajā apgabalā, kas atrodas tieši blakus *E-box* (Nagore *et al.*, 2014). Turklāt tika ziņots, ka *TERT* promotera mutācijas špicoidālos melanocītiskos jaunveidojumos prognozē agresīvu klīnisko uzvedību (Dougan *et al.*, 2018). Mūsu rezultāti liecina, ka *TERT* promotera karstā punkta mutācijas statuss var būt noderīgs palīgparametrs melanomas diagnostikā.

Ir labi zināms, ka *TERT* mutācijas pastiprina *TERT* gēna ekspresiju, radot *de novo* saistīšanās vietas dažādiem transkripcijas faktoriem, kas iesaistīti audzēju izraisošos mehānismos, bet tā prognostiskā nozīme ir diskutējama (Scolyer *et al.*, 2018). Vairāki autori ir ziņojuši par *TERT* promotera mutāciju prognostisko nozīmi primārajās melanomās (Eigentler *et al.*, 2016; Tas *et al.*, 2019; Bucheit *et al.*, 2013; Jakob *et al.*, 2012; Grimaldi *et al.*, 2017;

Horn *et al.*, 2013), savukārt citos pētījumos *TERT* promotera mutāciju ietekme uz primāro un metastātisko melanomu nav konstatēta (Barnhill *et al.*, 1996; Tuthill *et al.*, 2002).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Pētījuma struktūra

Pētījumā retrospektīvi tika iekļauti simt piecdesmit pacienti, kuriem 2012.–2018. gadā Rīgas Austrumu klīniskajā universitātes slimnīcā, Latvijas Onkoloģijas centrā tika veikta melanomas IA–IIC stadijas ķirurģiska ārstēšana. Šajā pētījumā tika iekļauti tikai pacienti ar primāru ādas nodulāru un virspusēji augošu ļaundabīgu invazīvu melanomu. Pētījuma struktūra atspoguļota 1. tabulā.

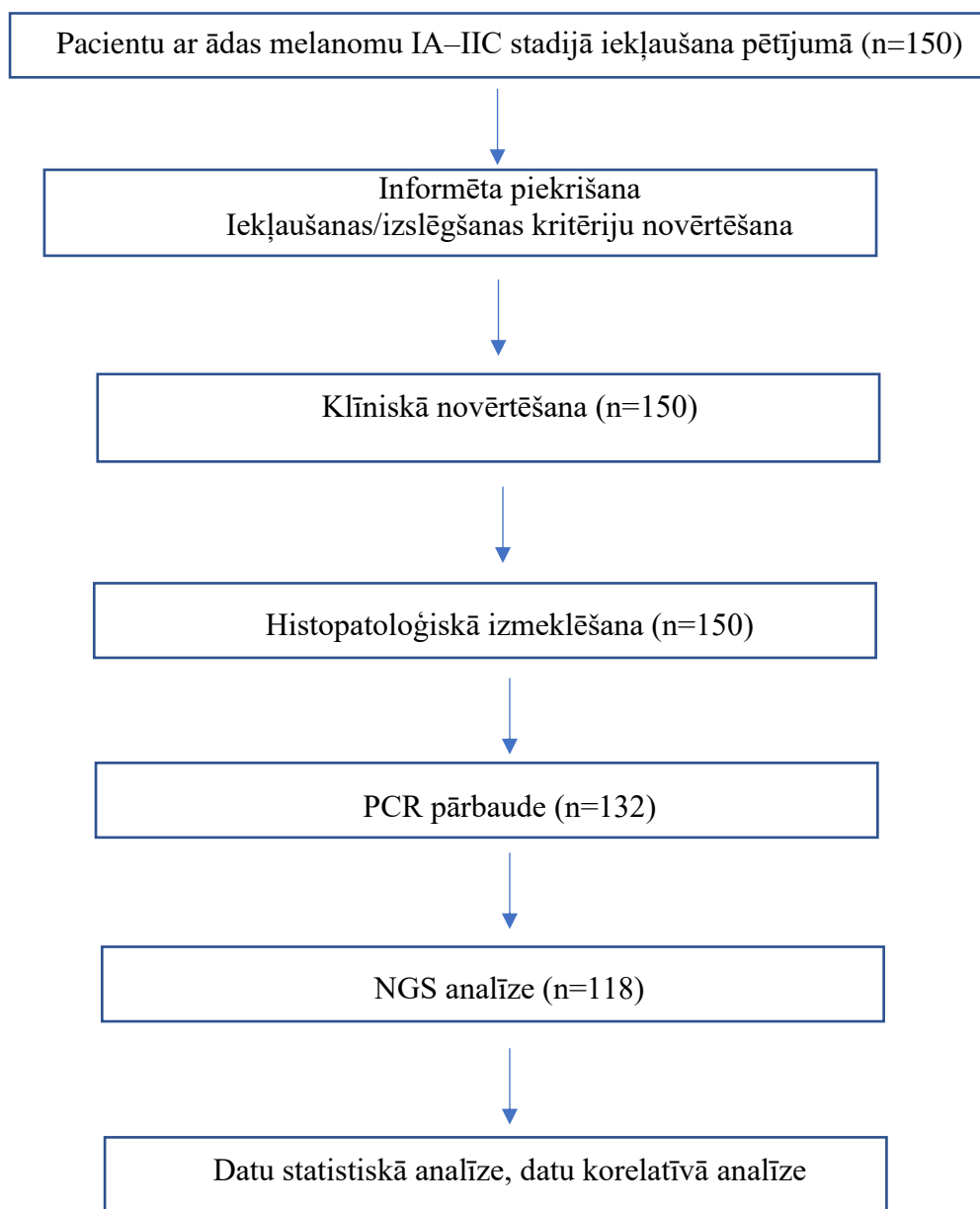
2.2. Ētika

Pētījuma protokolu apstiprināja Latvijas Centrālā medicīnas ētikas komiteja (Nr. 01-29.1/2016-1-1 no 2016. gada janvāra) un Latvijas Universitātes Kardioloģijas un reģeneratīvās medicīnas institūta Ētikas komiteja (no 2019. gada septembra; Nr. 12/2019). Pētījums veikts saskaņā ar Helsinku deklarāciju un Oviedo konvenciju. Visi pacienti parakstīja informētu piekrišanu piedalīties pētījumā.

2.3. Izslēgšanas kritēriji

No pētījuma tika izslēgti pacienti ar *lentigo maligna*, akrālām lentiginām melanomām, ar ādu nesaistītu melanomu un metastātisku melanomu, kā arī pacienti, kuriem bija III un IV stadijas melanoma vai kuriem bija veikta neoadjuvanta ārstēšana.

1. tabula. Pētījuma dizains



2.4. Klīniskais raksturojums

Tika analizēti tādi melanomas pacientu klīniskie rādītāji kā vecums, dzimums, audzēja atrašanās vieta, izmērs. Dažādi klīniskie faktori – vecums, dzimums, novērošanas ilgums pēc operācijas, recidīvs vai metastāzes – tika iegūti no medicīniskās dokumentācijas. Dzīvildzes laiks bez progresēšanas tika definēts kā lokālas, reģionālas vai sistēmiskas metastāzes vai nāve no audzēja ķirurģiskās izgriešanas datuma, kas aprēķināts no ķirurģiskās rezekcijas datuma līdz pirmajai lokālai vai sistēmiskai metastāzei, vai nāve bez jebkāda veida recidīva. Pacienti tika novēroti līdz 2022. gada 1. martam. Novērošanas laikā slimības progresēšanu definēja, ja tika novērota vismaz viena no šādām pazīmēm – lokāls recidīvs, reģionālo limfmezglu metastāzes, attālinātas metastāzes.

Histopatoloģiskās īpašības

Melanomas histopatoloģiskās īpašības tika pārskatītas saskaņā ar pašreizējām PVO un CAP vadlīnijām (7). Tika vērtēti tādi raksturlielumi kā audzēja tips, čūlojums, peritumorālā limfocitārā infiltrācija, Klārka invāzijas līmenis, Breslova biežums, limfovaskulārā invāzija, neurotropisms, regresija un mitotiskā aktivitāte. Turklāt tika reģistrētas izgriešanas līnijas un attālums no audzēja. Pamatojoties uz visu paraugu atkārtotu histopatoloģisko novērtējumu, tika noteikta pTNM stadija. Visi histopatoloģiskie slaidi tika atkārtoti pārskatīti un novērtēti saskaņā ar pašreizējo PVO klasifikāciju (Scolyer *et al.*, 2018).

2.5. Audzēju infiltrējošo limfocītu novērtēšana un vērtēšana ar punktiem

Par audzēju infiltrējošiem limfocītiem tika uzskatīti limfocīti, kas ieskauj audzēja masu. Audzēju infiltrējošos limfocītus (*TIL*) vērtēja no 0 līdz 3 punktiem: 0 = *TIL* audzēja audos nav, 1 = *TIL* infiltrāts mazāk nekā 25 % audu, 2 = *TIL* infiltrāts no 25 līdz 50 % audu un 3 = *TIL* infiltrāts vairāk nekā 50 % audu.

2.6. *BRAF* un *NRAS* mutāciju novērtēšana

BRAF un *NRAS* mutācijas statuss tika novērtēts 132 pacientiem. Genomiskā DNS tika izolēta no 10 µm bieziem, formalīnā fiksētiem, parafīnā iestrādātiem audiem, izmantojot *GeneRead*TM DNA FFPE komplektu (*Qiagen*, Vācija).

Melanomas *BRAF* un *NRAS* mutāciju statusu novērtēja, izmantojot digitālo pilienu *PCR* (*ddPCR*), izmantojot *BRAF V600* (#12001037 un # 1863100), *NRAS Q61* (#12001006) un *NRAS G12/G13* (#12001627) skrīninga testus (visi *Bio-Rad*, ASV) saskaņā ar ražotāja instrukcijām.

BRAF V600-V600E (NM_004333.4(*BRAF*):c.1799T>A (p.Val600Glu)), V600K (NM_004333.4(*BRAF*):c.1798-1799GT>AA (p.Val600Lys)) un V600R (NM_004333.4(*BRAF*):c.1798-1799GT>AG (p.Val600Arg)). Turklāt *BRAF V600* pozitīvos paraugus pārbaudīja uz *BRAF V600E* mutācijas esamību, izmantojot *BRAF V600E* mutācijas pārbaudes komplektu (#1863100, *Bio-Rad*, ASV), kas īpaši atpazīst NM_004333.4(*BRAF*):c.1799T>A (p.Val600Glu) mutāciju.

Attiecībā uz *NRAS G12/G13* tika novērtētas astoņas šādas mutācijas G12A (NM_002524.5(*NRAS*):c.35G>C (p.Gly12Ala) G12C (NM_002524.5(*NRAS*):c.34G>C (p.G>T (p.Gly12Cys)), G12D (NM_002524.5(*NRAS*):c.35G>A (p.Gly12Asp)), G12S (NM_002524.5(*NRAS*):c.34G>A (p.Gly12Ser)), G12V (NM_002524.5(*NRAS*):c.35G>T (p.Gly12Val)), G13D (NM_002524.5(*NRAS*):c.38G>A (p.Gly13Asp)), G13R (NM_002524.5(*NRAS*):c.37G>C (p.Gly13Arg)) , G13V (NM_002524.5(*NRAS*):c.38G>T (p.Gly13Val)).

Attiecībā uz *NRAS Q61* tika novērtētas piecas *NRAS* mutācijas – Q61K, (NM_002524.5(*NRAS*):c.181C>A (p.Gln61Lys), Q61L. (NM_002524.5(*NRAS*):c.182A>T (p.Gln61Leu), Q61R, NM_002524.5(*NRAS*):c.182A>G (p.Gln61Arg), Q61H, (NM_002524.5(*NRAS*):c.183A>T (p.Gln61His) un Q61H 183A>C, NM_002524.5(*NRAS*):c.183A>C (p.Gln61His).

Dropleti tika ģenerēti, izmantojot *Biorad QX200* pilienu ģeneratoru, un analizēti ar *QX200* pilienu lasītāju (*Bio-Rad*, ASV). Mutantu un savvaļas tipa alēļu absolūto daudzumu aprēķināja, modelējot Poissona sadalījumu, izmantojot *QuantaSoft™* analīzes programmatūras 1.7. versiju (*Bio-Rad*, ASV).

Mutāciju nomenklatūra atbilst pašreizējām Cilvēka genoma variāciju biedrības ((*HGVS*) *Human Genome Variation Society*) vadlīnijām (den Dunnen *et al.*, 2016). Norādītā nukleotīdu un aminoskābju numerācija attiecas uz transkripcijas sākuma vietu (+1), kas atbilst ATG A attiecīgajā *GenBank* atsauces secībā.

2.7. NGS testēšana

TERT mutācijas statuss tika novērtēts 118 pacientiem. Tika analizēta C228T (NM_198253.3(*TERT*):c.-124C>T) punktmutācija (*chr5*; 1,295,228 (-124) pirms transkripcijas sākuma kodona)) un C250T aizvietošana (*chr5*; 1,295,250 (-146) pirms transkripcijas sākuma kodona)), NM_198253.3(*TERT*):c.-146C>T.

No formalīna fiksētajiem parafīna ieguldītajiem (FFPE) paraugiem tika izolēta genomiskā DNS, lai sagatavotu NGS bibliotēku. DNS atšķaidīja zemas TE buferšķīdumā [10

mM Tris-HCl (pH 8,0) ar 0,1 mM EDTA] un ar ultraskaņu (*Covaris E220*; *Covaris*, Čikāga, IL, ASV) sagrieza līdz aptuveni 200 bp fragmentiem, ko pārbaudīja, izmantojot *Agilent High Sensitivity DNA Kit 2100 Bioanalyzer* (*Agilent*, Santa Clara, CA, ASV). Turpmākā adapteru galu labošana, A-galu veidošana un saistīšana tika veikta, izmantojot KAPA HTP bibliotēkas sagatavošanas komplektu (*Roche*, Bāzele, Šveice) saskaņā ar ražotāja norādījumiem, izmantojot pašu sagatavotus adapterus. Apstrādātie fragmenti tika atlasīti pēc izmēra (250–450 bp fragmenti) un primitizēti ar svītrkodiem (identiski *Illumina TruSeq* HT indeksam i7 un i5), izmantojot ligācijas mediētu PCR (LM-PCR), izmantojot pašu sagatavotus dubultindeksēšanas praimerus, lai atšķirtu atsevišķus paraugus turpmākajā apvienošanā. Fragmentu lielumu un kvalitāti pēc dubultās izmēru atlasēs un LM-PCR kontrolēja, izmantojot *Agilent* augstas jutības DNS komplektu.

Tika izmantots *Qiagen* pac-cancer-multimodāls paneļa gēnu komplekts (kat. Nr. / ID: 334942). Komplektā tika analizēti 523 DNS gēnu mērķi, 56 RNS saplūšanas mērķi, 26 mikrosatelītu nestabilitātes (MSI) mērķi. Tika veikta 150 pāru sekvencēšana (300 cikli).

Trīsdesmit atsevišķus paraugus (33 ng katrā) apvienoja bagātināšanai un 72 h hibridizēja ar CZMELAC paneļa zondēm (*SeqCap EZ Choice Library*; *Roche*, Bāzele, Šveice). Bagātinātās mērķa sekvences tika amplificētas ar pēcieguves PCR, lai izveidotu galīgo sekvencēšanas bibliotēku. Bagātināšanu kontrolēja, izmantojot qPCR (*NimbleGen SeqCap EZ* bibliotēkas SR lietotāja rokasgrāmatu). Bibliotēkas inserta lielums bija aptuveni 150 bp. Galīgo 15 μM bibliotēku sekvencēja ar *MiSeq*, izmantojot *MiSeq* Reagent Kit v. 3 (150 cikli; *Illumina*, San Diego, Kalifornija, ASV) ar mērķi panākt 100× vidējo pārklājumu uz paraugu.

Datu analīzei un interpretācijai tika izmantota *QIAGEN* Clinical Insight (*QCI*) *Interpret* programmatūra.

2.8. Statistiskā analīze

Rezultāti tika sniegti kā mediāna (diapazons). Histopatoloģiskie un klīniskie rādītāji tika analizēti, izmantojot Hī-kvadrāta, Manna-Vitnija U testu un/vai Kruskala-Valisa rangū testu. Mutācijas statusa saistība ar klīniskajiem un histopatoloģiskajiem raksturlielumiem tika analizēta, izmantojot Pearson X², lai aprēķinātu statistisko nozīmīgumu. Bezrecidīva periods tika novērtēts, izmantojot Kaplana-Meiera metodi ar *log-rank* testu. Laiks tika definēts kā slimības progresēšanas gadījums vai pēdējais kontroles apmeklējums (cenzēts).

Statistiskie aprēķini tika veikti ar SPSS 21.0 versiju (SPSS Inc., Čikāga, Ilinoisa, ASV). Par statistiski nozīmīgām tika uzskatītas P vērtības, kas mazākas par 0,05.

3. REZULTĀTI

3.1. Klīniskais raksturojums

Kopumā pētījumā piedalījās 150 pacienti. 12 pacientiem melanoma bija IA stadijā, 20 pacientiem – IB stadijā, 32 pacientiem – IIA stadijā, 34 pacientiem – IIB stadijā un 52 pacientiem – IIC stadijā. Pacientu vidējais vecums bija 67 gadi (diapazons 24–87 gadi). 69 pacienti bija vīrieši un 81 pacients bija sieviete. Primārā audzēja lokalizācija bija galva/kakls, ekstremitātes un rumpis attiecīgi 22,0 %, 38,0,0 % un 40,0 % pacientu (2. tabula).

2. tabula. Pētījumā iekļauto pacientu klīniski patoloģiskie rādītāji

Rādītājs	Pacienti, n
Vecuma mediāna, gadi, n (diapazons)	67 (24–87)
Dzimums, vīrietis/sieviete	69/81
Breslova biezuma mediāna, mm, n (diapazons)	2.4 (0,1–20)
Klārka līmeņa mediāna, n (diapazons)	3 (1–5)
Čūlojums, ir/nav	71/79
LVI, ir/nav	89/61
Neirotropisms, ir/nav	6/141
Solārā elastoze, mediāna, n (diapazons)	1 (0–3)
Audzēja izmēra mediāna, cm, n (diapazons)	1.5 (0,2–20,0)
Mitožu skaita mediāna, 10 HPF, n (diapazons)	2 (1–18)
TIL mediāna, rezultāts (diapazons)	2 (0–3)
IA stadija	12
IB stadija	20
IIA stadija	32
IIB stadija	34
IIC stadija	52

TIL – peritumorālā limfocitārā infiltrācija

LVI – limfovaskulāra invāzija

3.2. Histopatoloģiskās īpašības

Tika konstatēti 89 nodulāras melanomas gadījumi un 61 gadījums ar virspusēji augošu melanomu. Nodulārajai melanomai salīdzinājumā ar virspusēji augošo melanomu bija augstāks Klārka invāzijas līmenis ($P = 0,04$), lielāks Breslova biežums ($P = 0,04$), biežāk sastopams čūlojums ($P = 0,01$), lielāks mitožu skaits ($P < 0,0001$) un lielāks audzēja izmērs ($P = 0,002$). Nodulārā melanoma biežāk tika konstatēta vīriešiem nekā sievietēm ($P = 0,0083$). Limfovaskulārā invāzija, neirotropisms un solārā elastoze starp grupām būtiski neatšķīrās. Tomēr, analizējot visus pacientus kopā, tika novērota saistība starp solāro elastozi un Klārka līmeni ($R^2 = 0,08$; $P = 0,02$) (3. tabula).

3. tabula. Pacientu klīniski patoloģiskie rādītāji

Rādītājs*	Nodulārā melanoma (n=89)	Virspusēji augošā melanoma (n=61)	P vērtība
Vecuma mediāna (diapazons), gadi	67 (27–87)	64 (24–83)	0,23
Dzimums, vīrieši/ sievietes	33/56	17/44	0,0083*
Breslova biežuma mediāna (diapazons), mm	3.0 (0,1–20,0)	1.3 (0,1–14.9)	0,04**
Klārka līmeņa mediāna (diapazons)	3.0 (2–5)	3 (1–5)	0,04**
Čūlojums, ir/nav	56/33	15/46	0,002*
LVI, ir/nav	71/18	39/22	0,64
Neirotropisms, ir/nav	9/80	7/54	0,72
Solārās elastoze mediāna, diapazons	1.6 (0–3)	1.2 (0–3)	0,32
Audzēja izmēra mediāna (diapazons), cm	1.7 (0,4–6.6)	1.2 (0,2–6.1)	0,002**
Mitožu skaita mediāna, (diapazons), 10 HPF	4.0 (1–7)	2.0 (1–4)	<0,0001**

* Pacientu skaits katrā grupā ir norādīts 1. tabulā. LVI – limfovaskulāra invāzija; HPF – augsta palielinājuma redzes lauks (x 400), TIL – peritumorālā limfocitārā infiltrācija; $P \leq 0,05$ ir norādīts treknrakstā.

*Hī-kvadrāta tests.

**Manna-Vitnija U tests.

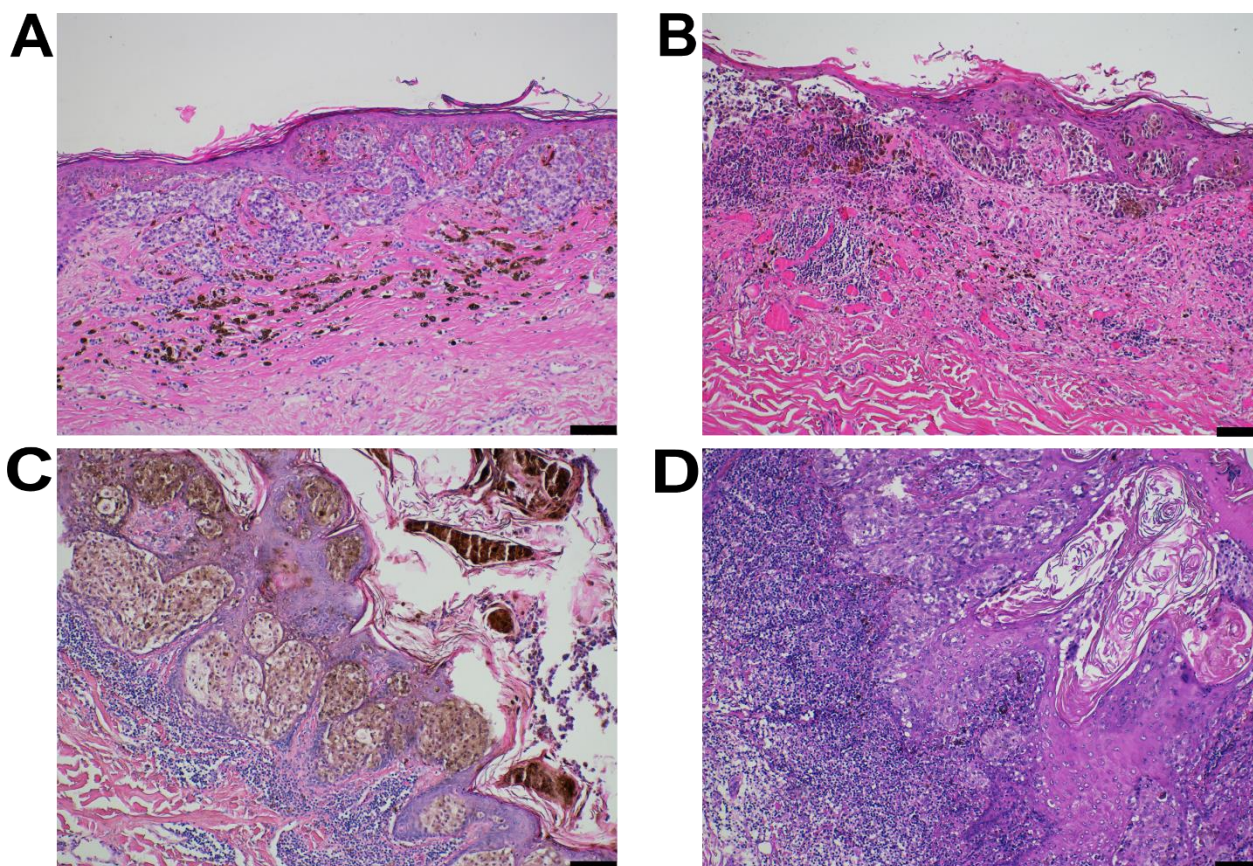
3.3. TIL pacientiem ar nodulāru un virspusēji augošu melanomu

Peritumorālā limfocitārā infiltrācija (TIL) tika identificēti 132 pacientiem (88,0 %). Reprezentatīva melanomas TIL mikrofotogrāfija ir sniegta 1. attēlā. Pacientiem ar nodulāru melanomu pārsvarā bija zemas pakāpes TIL infiltrācija (1 punkts) salīdzinājumā ar pacientiem ar virspusēji augošu melanomu ($P = 0,004$). Nozīmīga korelācija starp TIL vērtējumu (gan zems, gan augsts) un sieviešu dzimumu ($R^2 = 0,06$; $P = 0,0248$) un audzēja lielumu ($R^2 = 0,02$; $P = 0,0047$) tika novērota nodulārajai melanomai un starp TIL un mitožu skaitu ($R^2 = 0,02$; $P = 0,018$) virspusējās izplatīšanās melanomai (4. tabula).

4. tabula. TIL saistības ar klīniski patoloģiskiem rādītājiem analīze

Rādītājs*	Virspusēji augoša melanoma	Nodulāra melanoma
Vecums, gadi	$P = 0,1$	$P = 0,8$
Sieviešu dzimums	$P = 0,2$	$R^2 = 0,06; P=0,0248$
Breslova biezums	$P = 0,2$	$P = 0,1$
Klārka līmenis	$P = 0,3$	$P = 0,5$
Čūlojums	$P = 0,09$	$P = 0,09$
LVI	$P = 0,1$	$P = 0,2$
Solārā elastoze	$P = 0,2$	$P = 0,5$
Audzēja izmēra mediāna	$P = 0,4$	$R^2 = 0,02; P=0,0047$
Mitožu skaita mediāna	$R^2 = 0,02; P = 0,018$	$P = 0,5$

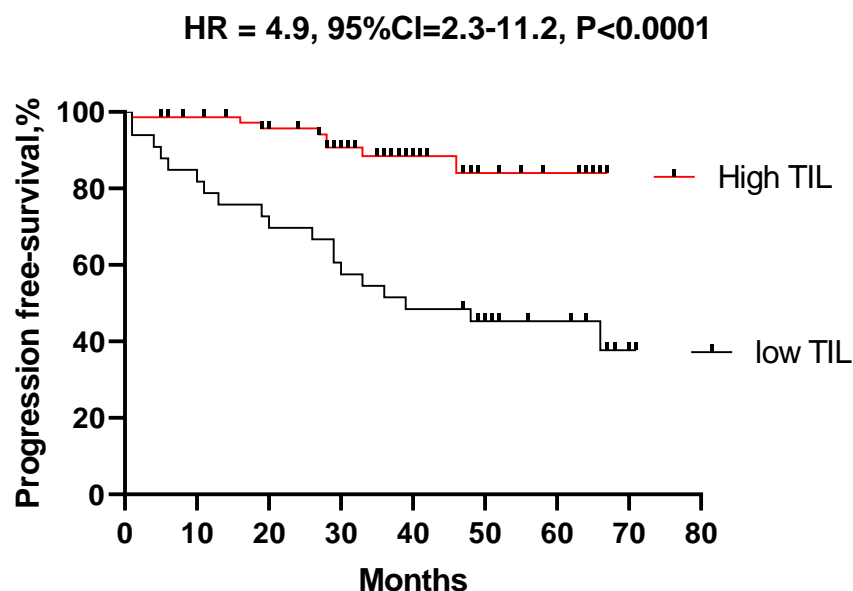
* Pacientu skaits katrā grupā ir norādīts 1. tabulā. TIL – peritumorālā limfocitārā infiltrācija; LVI – limfovaskulāra invāzija; Pīrsona Hī-kvadrāta tests; $P \leq 0,05$ ir norādīts treknrakstā.



1. attēls. Reprezentatīva mikrofotogrāfija, kurā redzama peritumorālā limfocitārā infiltrācija (TIL) ļaundabīgā melanomā

(A) nav TIL infiltrācijas, 0 punkti; (B) viegla TIL infiltrācija, 1 punkts; (C) mērena TIL infiltrācija, 2 punkti; (D) izteikta TIL infiltrācija, 3 punkti. Hematoksilīna-eozīna krāsošanas metode, palielinājums $\times 100$, skalas josla = 100 μm .

Turklāt, salīdzinot pacientu bezrecidīva periodu atkarībā no *TIL* esamības (gan zemas, gan augstas pakāpes), pacientiem ar augstu *TIL* bija ievērojami labāka prognoze salīdzinājumā ar pacientiem ar zemu *TIL* pakāpi (2. attēls).



2. attēls. **Bezrecidīva periods pacientiem ar nelielu un izteiktu *TIL* infiltrāciju**
Kaplana-Meiera diagramma analizēta, izmantojot *log-rank* (Mantela-Koksa) testu. $P < 0,0001$.
TIL – peritumorālā limfocitārā infiltrācija.

3.4. *BRAF* mutācijas statuss un korelācija ar klīniski patoloģiskiem rādītājiem

BRAF mutāciju pārbaude tika veikta 132 pacientiem. 70 pacientiem tika konstatētas *BRAF* mutācijas (53,3 %). No tiem 67 pacientiem bija *BRAF V600E* mutācija (NM_004333.6(BRAF):c.1799_1800delinsAA (p.Val600Glu)) un 4 pacientiem bija *BRAF V600K* (NM_004333.6(BRAF):c.1798_1799delinsAA (p.Val600Lys)) vai *V600R* mutācija (NM_004333.6(BRAF):c.1798_1799delinsAG (p.Val600Arg)).

Tika novērota saistība starp *BRAF V600* mutācijas statusu un Breslova biežumu ($P = 0,020$; $\chi^2 = 0,07$), pacienta dzimumu ($P = 0,009$; $\chi^2 = 0,09$), Klārka līmeni ($P = 0,005$; $\chi^2 = 0,11$) un peritumorālo limfocītu infiltrāciju *TIL* ($P = 0,045$; $\chi^2 = 0,06$). Tomēr saistība starp slimības stadiju, pacienta vecumu, solāro elastozī, čūlojumu, vidējo audzēja izmēru un *BRAF* mutācijas statusu netika pierādīta (5. tabula).

5. tabula. *BRAF* (V600) mutācijas saistības ar klīniski patoloģiskiem rādītājiem analīze

Rādītājs*	Pīrsona R ²	P vērtība
Vecums, gadi	R ² = 0,12	P = 0,002
Sieviešu dzimums	R ² = 0,09	P = 0,009
Breslova biezums	R ² = 0,07	P = 0,02
Klārka līmenis	R ² = 0,11	P = 0,005
Čūlojums	R ² = 0,03	P = 0,15
LVI	R ² = 0,07	P = 0,02
Solārā elastoze	R ² = 0,03	P = 0,2
Audzēja izmēra mediāna	R ² = 0,001	P = 0,8
Mitožu skaita mediāna	R ² = 0,06	P = 0,04
TIL	R ² = 0,06	P = 0,045

* Pacientu skaits katrā grupā ir norādīts 1. tabulā. *TIL* – peritumorālā limfocitārā infiltrācija; LVI – limfovaskulāra invāzija; Pīrsona Hī-kvadrāta tests; $P \leq 0,05$ ir norādīts treknrakstā.

3.5. *NRAS* mutācijas statuss un saistība ar klīniski patoloģiskiem rādītājiem

NRAS mutācijas testi tika veikti 132 pacientiem. *NRAS* mutācija tika konstatēta 39 no 132 pacientiem (29,6 %). Divdesmit astoņām melanomām bija gan *NRAS*, gan *BRAF* kopmutācija. Divdesmit deviņiem pacientiem bija *NRAS Q61* mutācija un 10 pacientiem – *NRAS G12*, *G13* mutācijas.

NRAS mutācijas statuss bija saistīts ar Breslova biezumu ($P = 0,04$; $\chi^2 = 0,16$), slimības stadiju ($P = 0,02$; $\chi^2 = 0,20$), mitotisko aktivitāti ($P = 0,030$; $\chi^2 = 0,190$) un limfovaskulāro invāziju ($P = 0,020$; $\chi^2 = 0,200$). Tomēr netika pierādīta saistība starp Klārka invāzijas līmeni, solāro elastozi, *TIL*, pacienta vecumu, pacienta dzimumu un *NRAS* mutācijas statusu (6. tabula).

6. tabula. *NRAS* (kodona *Q61* un kodona *G12/G13*) mutācijas saistības ar klīniski patoloģiskiem rādītājiem analīze

Rādītājs*	Pīrsona χ^2 vērtība	P vērtība
Vecums, gadi	0,007	0,760
Dzimums	0,006	0,960
Breslova biezums	0,160	0,040
Klārka līmenis	0,009	0,260
Čūlojums	0,006	0,400
LVI	0,200	0,020
Solārā elastoze	0,004	0,800
Audzēja izmēra mediāna	0,026	0,080
Mitožu skaita mediāna	0,190	0,030
<i>TIL</i>	0,050	0,420
Slimības stadija (pTNM)	0,200	0,020

* Pacientu skaits katrā grupā ir norādīts 1. tabulā. *TIL* – peritumorālā limfocitārā infiltrācija; LVI – limfovaskulāra invāzija; Pīrsona Hī-kvadrāta tests. $P \leq 0,05$ ir norādīts treknrakstā.

3.6. Ģenētiskās mutācijas melanomā, izmantojot paneļa sekvencēšanu (nepublicēti dati)

Citas biežāk sastopamās melanomas mutācijas bija *TP53*, *CDK4*, *NF1* un *FGFR1* (7. tabula). Saistība starp klīniski patoloģiskiem rādītājiem un *NF1*, *ARID1A*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *DDR1*, *EFGR1*, *EZH2*, *ROS1*, *SLX4*, *EBB3*, *MET*, *MDM2* nav pierādīta. Tomēr tika novērota saistība starp *TP53* mutāciju un Breslova biežumu un *TIL* infiltrāciju ($P = 0,02$ un $P = 0,01$). Turklāt tika novērota saistība starp *CDK4* mutāciju un solāro elastozī ($P = 0,02$). Tika novērota saistība starp *FGFR1* mutāciju un limfovaskulāro invāziju un *TIL* infiltrāciju ($P = 0,002$ un $P = 0,004$).

3.7. *TERT* mutācijas statuss un tā saistība ar klīniski patoloģiskiem rādītājiem

TERT mutācijas statuss tika novērtēts 118 pacientiem. *TERT* mutāciju konstatēja 38 pacientiem no 118 (32,2 %). Punktveida mutācija C228T (*NM_198253.3(TERT):c.-124C>T*) (*chr5; 1,295,228 (-124)*) tika konstatēta 12/38 (31,6 %) gadījumos, savukārt C250T aizvietošana, *NM_198253.3(TERT):c.-146C>T* (*chr5; 1,295,250 (-146)* augšpus transkripcijas sākuma kodona) tika novērota 26/38 (68,4 %) gadījumos. *TERT* mutācijas saistība ar Breslova biežumu, pacientu vecumu, mitotisko aktivitāti un *TIL* infiltrāciju tika novērota (attiecīgi $P = 0,02$; $P = 0,004$; $P = 0,007$ un $P < 0,0001$).

7. tabula. Ģenētiskās mutācijas melanomā (izņemot *BRAF*, *NRAS* un *TERT*)

Gēns	Pacienti, n (mutācijas)
<i>NF1</i> , <i>NM_001042492.3(NF1):c.3871-2A>G</i>	5
<i>ARID1A</i> , <i>NC_000001.11:g.26695829G>A</i>	4
<i>BRCA1</i> , <i>NM_007294.3(BRCA1):c.*6207C>T</i>	3
<i>BRCA2</i> , <i>NM_001136571.2(ZARIL):c.-390+372T>C</i>	3
<i>CHEK2</i> , <i>GRCh38/hg38 22q12.1(chr22:27557778-28988149)x3</i>	4
<i>DDR1</i> , <i>NM_001297654.2(DDR1): c.49A>G (p.Ser17Gly)</i>	3
<i>EFGR1</i> , <i>NM_005228.5(EGFR):c.5G>A (p.Arg2Gln)</i>	3
<i>EZH2</i> , <i>NM_004456.4(EZH2):c.*275A>G</i>	2
<i>ROS1</i> , <i>NM_001378902.1(ROS1): c.7012G>A (p.Asp2338Asn)</i>	2
<i>SLX4</i> , <i>NM_032444.4(SLX4):c.*1150G>C</i>	2
<i>TP53</i> , <i>NM_000546.5(TP53):c.*1701G>T</i>	18
<i>CDK4</i> , <i>NM_005981.5(TSPAN31):c.*470dup</i>	7
<i>FGFR1</i> , <i>NM_023110.3(FGFR1):c.*2445A>G</i>	5
<i>MET</i> , <i>NM_000245.4(MET):c.-157T>G</i>	2
<i>MDM2</i> , <i>NM_002392.6(MDM2):c.-94A>G</i>	2
<i>TERT</i> , <i>NM_198253.2:c.1574-3235G>T</i>	38

8. tabula. *TERT* promotera mutācijas saistības ar klīniski patoloģiskiem rādītājiem analīze

Rādītājs lielumi, n=119	Pīrsona χ^2 vērtība	P vērtība
Vecums, gadi	0,18	0,004
Dzimums	0,053	0,43
Breslova biežums	0,09	0,02
Klārka līmenis	0,06	0,420
Čūlojums	0,007	0,420
LVI	0,20	0,018
Solārā elastoze	0,018	0,12
Audzēja izmēra mediāna	0,08	0,12
Mitožu skaita mediāna	0,12	0,0070
<i>TIL</i>	0,18	0,0001
Audzēja veids (nodulārs vai virspusejs)	0,14	0,01
Slimības stadija (pTNM)	0,34	0,09

TIL – peritumorālā limfocitārā infiltrācija

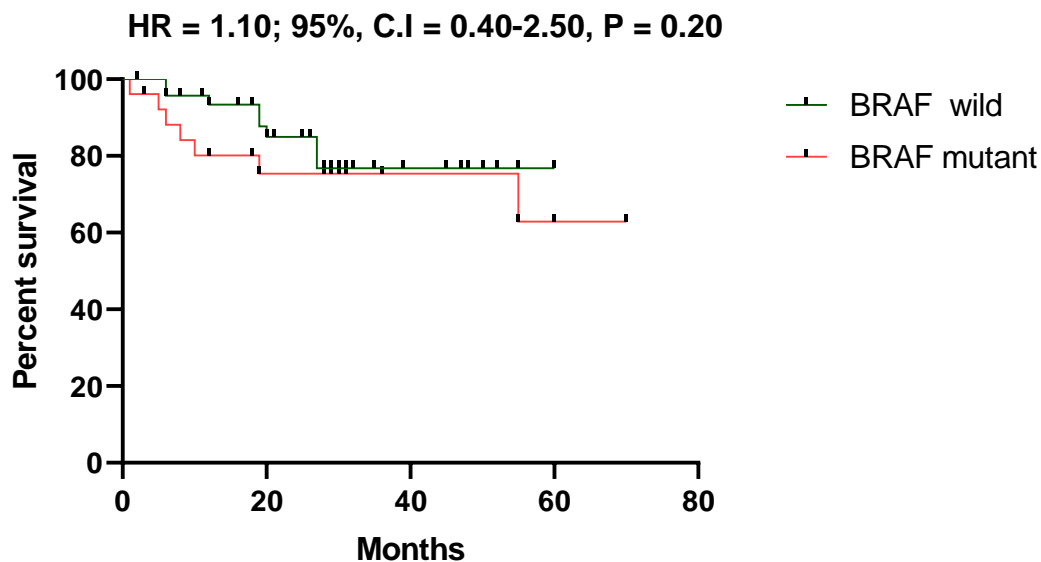
LVI – limfovaskulāra invāzija

Pīrsona Hi-kvadrāta tests. $P \leq 0,05$ ir norādīts treknrakstā.

3.8. Histopatoloģiskā un *BRAF*, *NRAS* un *TERT* mutāciju statusa nozīme attiecībā uz bezrecidīva periodu

BRAF mutācijas statuss un bezrecidīva periods

Visiem 150 pacientiem tika veikta klīniska novērošana, un 37 gadījumos tika konstatēti lokāli reģionāli recidīvi vai sistēmiskas metastāzes (24,66 %). Bezrecidīva periods neatšķīrās savvaļas tipa un *BRAF* mutantu melanomai (HR = 1,10; 95 %, C.I = 0,40–2,50, P = 0,20).

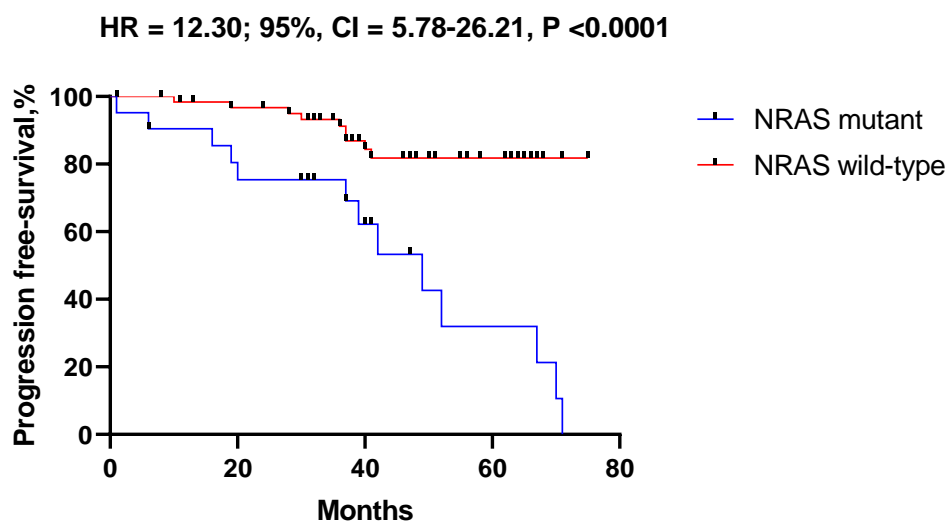


3. attēls. Bezrecidīva periods *BRAF* mutantu un *BRAF* savvaļas melanomu gadījumā

Kaplana-Meiera diagramma, izmantojot log-rank (Mantela-Koksa) testu, $P > 0,05$.

NRAS mutācijas statuss un bezrecidīva periods

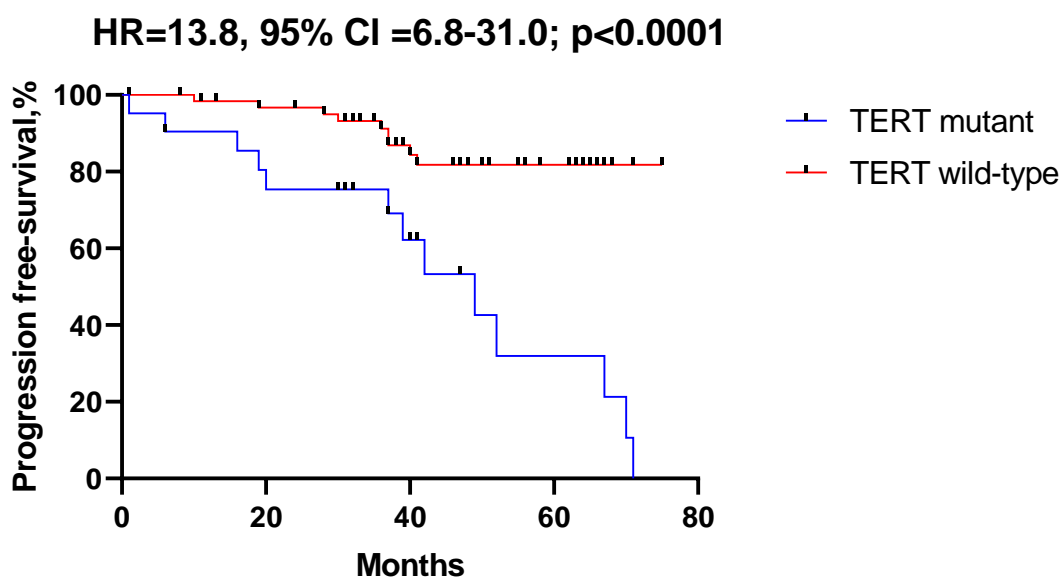
Pacienti ar *NRAS* mutantu melanomu bija ievērojami īsāks bezrecidīva periods salīdzinājumā ar *NRAS* savvaļas tipa melanomu (HR = 12,30; 95 %, C.I = 5,78–26,21, P < 0,0001).



4. attēls. **Bezrecidīva periods pacientiem ar *NRAS* mutantu un *NRAS* savvaļas melanomu**
Kapšana-Meiera grafiks analizēts, izmantojot *log-rank* (Mantela-Koksa) testu. P<0,0001.

TERT mutācijas statuss un bezrecidīva periods

Pacienti ar *TERT* mutāciju bija ievērojami īsāks bezrecidīva periods salīdzinājumā ar *TERT* savvaļas melanomu.(HR=13,8, 95 % CI =6,8–31,0; p<0,0001)

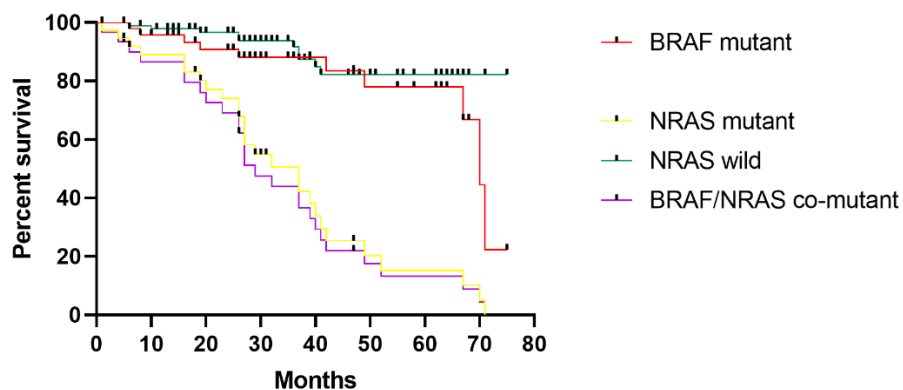


5. attēls. **Bezrecidīva periods pacientiem ar *TERT* mutācijas un *TERT* savvaļas melanomu**
Kapšana-Meiera diagramma analizēta, izmantojot *log-rank* (Mantela-Koksa) testu. P < 0,0001.

Kopmutācijas ietekme uz bezrecidīva periodu

BRAF un *NRAS* kopmutācijas melanomai ir ievērojami īsāks bezrecidīva periods salīdzinājumā ar *BRAF* mutantu melanomu (HR = 6,30; 95 %, C.I = 3,10–12,70, P <0,0001).

P<0.0001 compared BRAFmutant vs NRAS mutant and BRAF/NRAS co-mutant

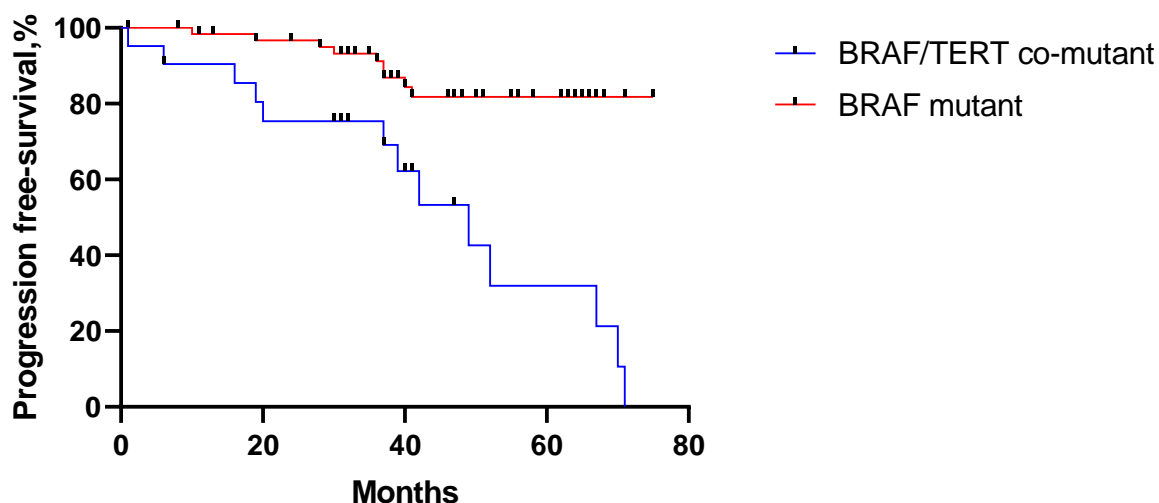


6. attēls. Bezrecidīva periods pacientiem ar *BRAF/NRAS* kopmutantu melanomu, *NRAS* wild, *NRAS* mutantu un *BRAF* mutantu melanomu

Kaplana-Meiera grafiks analizēts, izmantojot *log-rank* (Mantela-Koksa) testu. P < 0,0001.

Turklāt *TERT* un *BRAF* kopmutantu melanomai ir ievērojami īsāks bezrecidīva periods salīdzinājumā ar *BRAF* mutantu melanomu (HR = 8,25; 95 %, C.I = 2,90–13,40, P < 0,0001), 7. attēls.

HR = 8.25; 95%, C.I = 2.90-13.40, P <0.0001

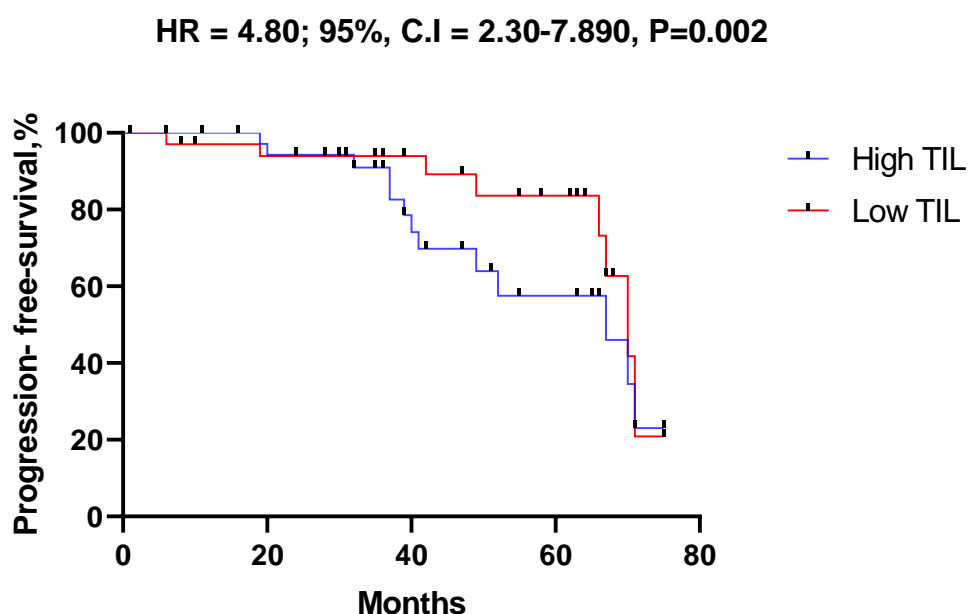


7. attēls. Bezrecidīva periods pacientiem ar melanomu. *BRAF* mutācijas un *BRAF* un *TERT* kopmutācijas melanoma.

Kaplana-Meiera diagramma analizēta, izmantojot *log-rank* (Mantela-Koksa) testu. P < 0,0001.

Bezrecidīva periods un peritumorālā limfocitārā infiltrācija (TIL)

Visiem 150 pacientiem tika veikta klīniska novērošana, un 37 gadījumos tika konstatēta lokoreģionāla recidīva vai sistēmiskas metastāzes. Salīdzinot pacientu bezrecidīva periodu atkarībā no *TIL* esamības (gan zemas, gan augstas pakāpes), pacientiem ar augstu *TIL* bija ievērojami labāka prognoze salīdzinājumā ar pacientiem ar zemu *TIL* pakāpi (HR = 4,9, 95 % C.I = 2,3–11,20, $p < 0,0001$) (2. attēls). Turklāt pacientiem ar *TERT* mutāciju un zemu *TIL* bija ievērojami labāks bezrecidīva periods salīdzinājumā ar pacientiem ar *TERT* mutāciju un augstu *TIL* infiltrāciju (HR = 4,80; 95 %, C.I = 2,30–7,890, $P=0,002$).



8. attēls. Bezrecidīva periods *TERT* mutācijas melanomai ar nelielu un izteiktu TIL infiltrāciju

Kaplana-Meiera diagramma, izmantojot *log-rank* (Mantela-Koksa) testu, $p < 0,0001$.

4. DISKUSIJA

Šajā pētījumā tika novērtētas genotipa un fenotipa saistības 150 pacientiem ar IA–IIC stadiju saskaņā ar *AJCC* klasifikāciju ļaundabīgas invazīvas melanomas gadījumā.

Melanomas histopatoloģiskā izmeklēšana pašlaik ir melanomas diagnozes zelta standarts. Turklāt tādi invazīvās ādas melanomas histopatoloģiskie raksturlielumi kā audzēja izmērs un veids, limfovaskulārā invāzija, čūlojums, Breslova biezums, Klārka invāzijas pakāpe, mitotiskā aktivitāte un slimība ir vispārātzīti pārliecinoši melanomas prognostiskie un paredzamības faktori (Shellenberger *et al.*, 2016; Bastian *et al.*, 2014; Clark *et al.*, 1989; Scolyer *et al.*, 2018). Melanomas attīstība ir cieši saistīta ar somatiskām un epiģenētiskām izmaiņām. Īpaša nozīme melanomas progresēšanā ir onkogēnu *BRAF* un *NRAS* aktivizējošām mutācijām (Ribas *et al.*, 2015; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Ny *et al.*, 2020; Rose *et al.*, 2006; Michielin *et al.*, 2019; Cancer Genome Atlas Network, 2020). Turklāt *BRAF* personalizēta melanomas ārstēšana ievērojami uzlaboja pacientu prognozi (Rose *et al.*, 2006; Michielin *et al.*, 2019; Cancer Genome Atlas Network, 2020). Tomēr *BRAF* un *NRAS* mutācijas prognostiskā vērtība un tās saistība ar klīniskajām un histopatoloģiskajām pazīmēm joprojām ir pretrunīga, īpaši agrīnās stadijas melanomas gadījumā.

Parastie melanomas prognostiskie rādītāji ir melanomas tips, limfovaskulārā invāzija, čūlojums, stadija, Breslova biezums un mitotiskā aktivitāte, kas pašlaik ir obligāti histopatoloģiski vērtējami kritēriji visām primārajām melanomām (Scolyer *et al.*, 2018). *TIL*, ko imūnsistēma producē, reaģējot uz audzēja invāziju, bieži novēro audzēja mikrovidē, tostarp saistībā ar ādas melanomu (Azimi *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2015; Maibach *et al.*, 2020; Eigentler *et al.*, 2016; Tas *et al.*, 2019; Barnhill *et al.*, 1996; Tuthill *et al.*, 2002).

Tomēr literatūrā nav atrisinātas diskusijas par to, vai *TIL* pakāpe ir pietiekami stabils prognostisks rādītājs, lai to iekļautu stadijas noteikšanā pēc *AJCC* klasifikācijas (Scolyer *et al.*, 2018). Imūnsistēmas rādītāji, jo īpaši *TIL* pakāpe, nav standarta melanomas patoloģijas ziņojumu sastāvdaļas, jo vēl nav apstiprināts un novērtēts, ka tie būtiski ietekmē kopējo dzīvildzi vai klīnisko pārvaldību (Scolyer *et al.*, 2018). Turklāt *TIL* saistība ar labāku melanomas prognozi joprojām ir pretrunīga (Azimi *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2015; Maibach *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2007; Burton *et al.*, 2011; Mandala *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2013; Clemente *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 2016; Tas *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2016).

Ir aprakstītas dažādas histopatoloģiskās metodes *TIL* klasificēšanai (Azimi *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2015; Maibach *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2007; Burton *et al.*,

2011; Mandala *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2013; Clemente *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 2016; Tas *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2016)). Pirmkārt, pēc Klārka metodes *TIL* klasificē kā neesošus, neaktīvus un aktīvus (Clark *et al.*, 1989). Citos pētījumos *TIL* tika vērtēti skalā no 0 līdz 3 vai *TIL* tika vērtēti tikai kā neizteikta vai izteikta infiltrācija (Burton *et al.*, 2011; Mandala *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2013; Clemente *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 2016; Tas *et al.*, 2021). Dažos pētījumos izmantota kombinēta klasifikācijas sistēma, novērtējot *TIL* blīvumu un izplatību ar galīgo punktu skaitu no 0 līdz 6 (Maibach *et al.*, 2020).

Iepriekšējos pētījumos galvenā uzmanība tika pievērsta *TIL* prognostiskajai nozīmei primārajā melanomā (Azimi *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2015; Maibach *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2007; Burton *et al.*, 2011; Mandala *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2013; Clemente *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 2016; Tas *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2016). Tomēr rezultāti ir pretrunīgi. Vairākos pētījumos nav pierādīta saistība starp *TIL* esamību un bezrecidīva perioda ilgumu (Maibach *et al.*, 2020). Citos pētījumos tika konstatēta nozīmīga korelācija starp *TIL* infiltrāciju un pacientu dzīvildzi (Azimi *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2015; Burton *et al.*, 2011; Mandala *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2013).

Mūsu pētījums pierādīja, ka izteikta *TIL* infiltrācija primārai I–II stadijas melanomai atbilst labākai prognozei, savukārt neliela *TIL* infiltrācija liecina par īsāku bezrecidīva periodu. Nesen tika pierādīts, ka aktīva *TIL* pakāpe ir labvēlīgs prognostiskais faktors primārajām melanomām un tā ir atšķirīga grupa no neaktīvas *TIL* pakāpes, pamatojoties uz slimības progresēšanu un imūnregulējošo gēnu ekspresijas profiliem (Thomas *et al.*, 2013). Turklāt *TIL* pakāpe ir neatkarīgs dzīvildzes un sardzes limfmezgla (SLN) statusa prognozēšanas faktors melanomas pacientiem. Pacientiem ar izteiktu *TIL* infiltrātu kopumā ir labāka prognoze (Azimi *et al.*, 2012), un augsts *TIL* līmenis primārajā invazīvajā melanomā ir saistīts ar labvēlīgiem dzīvildzes rezultātiem (Azimi *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2015; Maibach *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2017).

Mūsu rezultāti saskanēja ar nesenu veiktā pētījumā pierādīto, ka audzēja regresijas un *TIL* līdzāspastāvēšana melanomas gadījumā ir saistīta ar labvēlīgāku dzīvildzes prognozi (Clemente *et al.*, 1996). Tomēr mūsu pētījumā netika pierādīta saistība starp audzēja regresiju un *TIL*. Tas varētu būt izskaidrojams ar to, ka mūsu pētījumā tika iekļauti tikai pacienti ar IA–IIC stadiju.

Mūsu pētījumā pacientiem ar nodulāru melanomu tika konstatēta *TIL* regulācijas samazināšanās salīdzinājumā ar virspusēji augošu melanomu. Iepriekšējos pētījumos ir pierādīts samazināts *TIL* daudzums nodulārajās melanomās salīdzinājumā ar atbilstošajām virspusēji augošajām melanomām (Weiss *et al.*, 2016). Tomēr šis novērojums tika konstatēts

tikai plānām (≤ 2 mm) melanomām un vīriešiem (Weiss *et al.*, 2016). Šie atklājumi liecināja par imunoloģiskās atbildes reakcijas atšķirībām atkarībā no dzimuma un audzēja biezuma. Turklāt to varētu veicināt audzēja stadija un audzēju infiltrējošo limfocītu subpopulācijas imunoloģiskā heterogenitāte (Tas *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2016; Weiss *et al.*, 2016).

BRAF mutācijas primārajās melanomās novēro 22–72 % (Platz *et al.*, 2008; Yaman *et al.*, 2015; Bezic *et al.*, 2019, Spathis *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2015). Mūsu pētījumā *BRAF* V600 mutācija tika konstatēta 53,3 % no visiem analizētajiem gadījumiem. Iepriekšējie pētījumi parādīja, ka *BRAF* mutācijas statusa nozīme saistībā ar melanomas klīniski patoloģiskiem rādītājiem un bezrecidīva periodu ir atšķirīga (Bezic *et al.*, 2019, Spathis *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2015; Estrozi *et al.*, 2014). Ir pierādīts, ka *BRAF* mutācijas statuss korelē ar jaunāku vecumu un sieviešu dzimumu (Platz *et al.*, 2008). Vecums ir neatkarīgs negatīvs melanomas dzīvildzes prognozes faktors (Platz *et al.*, 2008). Tomēr melanomas saistība ar dzimumu šķiet pretrunīga. Ir pētījumi, kas pierāda saistību ar vīriešu dzimumu (Yaman *et al.*, 2015), un citi pētījumi, kas pierāda saistību ar sieviešu dzimumu (Bezic *et al.*, 2019). Iespējams, ka melanomas prognozes atšķirībās pēc vecuma un dzimuma ir iesaistīti atšķirīgi imunoloģisko reakciju modeļi (Platz *et al.*, 2008).

Iepriekšējos pētījumos pierādīta *BRAF* mutācijas statusa saistība ar audzēja izcūlojumu, solāro elastozi, progresējošas melanomas stadiju un histoloģisko apakštipu (Nu *et al.*, 2020; Rose *et al.*, 2006). Turpretī attiecībā uz jauniem pacientiem pētījums parādīja, ka nav nozīmīgas saistības starp *BRAF* mutācijas statusu un dzimumu, histoloģisko apakštipu, Klārka un Breslova līmeņiem, solāro elastozi un limfovaskulāro invāziju, kas liecina par atšķirīgiem tumorogēneses ceļiem jauniešu populācijā (Spathis *et al.*, 2019).

Mūsu pētījuma rezultāti saskan ar iepriekš iegūtajiem rezultātiem un tos papildina, pierādot, ka gan Klārka, gan Beslova līmenis korelē ar *BRAF* mutācijas statusu. Turklāt ir novērota saistība starp *BRAF* mutācijas statusu, asinsvadu invāziju un *TIL*. Šis novērojums ļāva mums izteikt pieņēmumu, ka I–II stadijas *BRAF* mutācijas melanomai, salīdzinot ar savvaļas tipa melanomu, ir raksturīga lielāka invazivitāte.

Dažos iepriekšējos pētījumos ir pierādīta *BRAF* mutācijas statusa un solārās elastozes saistība (Platz *et al.*, 2008). Tomēr mūsu pētījumā korelācija starp *BRAF* mutācijas statusu un solāro elastozi netika novērota. To varētu veicināt ģeogrāfiskās īpatnības un saules iedarbības atšķirības.

Dažos iepriekšējos pētījumos ir pierādīta arī *BRAF* mutācijas statusa un čūlu rašanās saistība (Platz *et al.*, 2008; Yaman *et al.*, 2015), savukārt citās analīzēs būtiska saistība nav konstatēta (Bezic *et al.*, 2019).

Mūsu pētījumā netika novērota *BRAF* mutācijas statusa saistība ar melanomas izcūlojuma veidošanos. Varētu pieņemt, ka izcūlojuma veidošanās lielākos audzējos varētu būt saistīta ar *BRAF* mutācijas statusu, tomēr audzēja mediānas izmērs bija mazāks salīdzinājumā ar iepriekšējiem pētījumiem (Platz *et al.*, 2008; Yaman *et al.*, 2015).

BRAF mutācijas statusa un *TIL* nozīme ir aplūkota vairākos pētījumos, tomēr rezultāti ir pretrunīgi. Mūsu pētījums parādīja, ka *BRAF V600* mutācijas melanomai *TIL* ir paaugstināta, salīdzinot ar *BRAF* savvaļas tipa melanomu. Tomēr dažos jaunākajos pētījumos netika konstatēta saistība starp *TIL* un *BRAF* mutācijas statusu (Platz *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2015).

Turpretī ir pierādīts, ka *TIL* intratumorālais blīvums ir ievērojami lielāks *BRAF* mutanta melanomai (Estrozi *et al.*, 2014). To varētu veicināt melanomas intratumorālā heterogenitāte ar atšķirīgu citokīnu vidi un imunomodulējošo gēnu ekspresiju. Turklāt nesen veiktā pētījumā pierādīts, ka lielāks *TIL* klasteru skaits ir saistīts ar atbildi uz imunoterapiju *BRAF V600E/K* mutējušai melanomai (Aksenenko *et al.*, 2015).

Mūsu pētījums parādīja, ka *BRAF V600* mutācijas tika konstatētas 56,8 % gadījumu un *NRAS (Q61; G12 un G13)* mutācijas – 29,6 % gadījumu. Turklāt, lai gan *BRAF V600* mutācijas statuss nebija saistīts ar bezrecidīva periodu, *NRAS* mutācijas statuss būtiski korelēja ar bezrecidīva periodu. Turklāt pacientiem ar *BRAF V600* un *NRAS* kopmutantu melanomu bezrecidīva periods bija ievērojami īsāks salīdzinājumā ar *BRAF V600* mutantu melanomu.

BRAF mutācijas primārajās melanomās ir novērotas 22 %–72 % gadījumu (Forsea *et al.*, 2020; Elder *et al.*, 2020; Fong *et al.*, 2008; Hodi *et al.*, 2010; Topalian *et al.*, 2014; Dummer *et al.*, 2018; Melis *et al.*, 2017; Pracht *et al.*, 2015; Davies *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2011; Menzies *et al.*, 2012; Colebatch *et al.*, 2019; Chiappetta *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2011; Tas *et al.*, 2019; Jakob *et al.*, 2012). Mūsu pētījumā *BRAF* mutācijas biežums ietilpst šajā diapazonā. Vairāk nekā 90 % *BRAF* mutāciju izraisa valīna aizstāšanu 600. pozīcijā, kā rezultātā aktivizējas *RAS-RAF-MEK-MAPK* ceļa pakārtotie efektori (Hessler *et al.*, 2020).

Turklāt tika atklāta saistība starp *BRAF V600* mutācijas statusu un Breslova biežumu, pacienta dzimumu, Breslova biežumu un peritumorālo limfocītu infiltrāciju, kas apstiprina mūsu iepriekš iegūtos datus (Havel *et al.*, 2019).

Iepriekšējie pētījumi parādīja, ka *BRAF* mutācijas statusa nozīme saistībā ar melanomas klīniski patoloģiskiem rādītājiem un bezrecidīva periodu ir atšķirīga (Burton, *et al.*, 2011; Mandala *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2019; Clemente *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 2016). Mūsu pētījumā netika konstatēta saistība starp *BRAF* mutācijas statusu un melanomas bezrecidīva periodu.

Ir pierādīts, ka *BRAF* mutācijas statuss korelē ar jaunāku vecumu un sieviešu dzimumu (Lin *et al.*, 2016; Weiss *et al.*, 2016). Tomēr dažos pētījumos tika konstatēta saistība ar vīriešu dzimumu (Mandala *et al.*, 2009). Mūsu pētījumā *BRAF* mutācija korelēja ar sieviešu dzimumu un vecāku pacientu vecumu. Šo novērojumu varētu izskaidrot ar to, ka mūsu pētījumā tika iekļauta tikai agrīnas stadijas melanoma. Turklāt daži pētījumi parādīja imunoloģiskās tolerances mehānismu nozīmi *BRAF* mutētas melanomas attīstībā (Havel *et al.*, 2019; Platz *et al.*, 2008).

Iepriekšējie pētījumi par *BRAF* un *NRAS* kopmutantu melanomu ir bijuši pretrunīgi. *NRAS* gēna mutācija konstatēta 15–25 % melanomas gadījumos (Raaijmakers *et al.*, 2016; Chiappetta *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015). Mūsu pētījumā *NRAS* mutāciju konstatēja līdz 30 % melanomas gadījumos.

Mēs pieņemam, ka lielo *NRAS* mutāciju izplatību varētu izskaidrot ar mūsu pētījumā iekļauto pacientu vidējo vecumu, piemēram, 67 gadi. Ir pierādīts, ka pacienti ar *NRAS* mutantu melanomu, salīdzinot ar *BRAF* mutantu melanomu, parasti bija vecāki (> 55 gadi) un iepriekš bijuši pakļauti UV staru iedarbībai. *NRAS* mutantu melanomu parasti konstatē augšējās ekstremitātēs, un tai raksturīgs palielināts Breslova audzēja biežums (Hessler *et al.*, 2020; Raaijmakers *et al.*, 2016; Chiappetta *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015).

Mūsu pētījuma rezultāti parādīja, ka *NRAS* (*Q61*; *G12* un *G13*) mutācijas ir saistītas ar Breslova biežumu, nodulārās melanomas audzēja tipu, mitotisko aktivitāti un limfovaskulāro invāzi. Turklāt mēs pieņemam, ka *NRAS* mutācijām primārās IA–IIC stadijas melanomai varētu būt potenciāli nozīmīga prognozējošā vērtība.

NRAS gēns visbiežāk mutē 2. eksona (12. un 13. kodona) un 3. eksona (61. kodona) *hot spot* [Platz *et al.*, 2008]. *NRAS* mutācija, kas raksturīga nodulārai melanomai, kura lokalizēta saules bojātā ādā [Yang *et al.*, 2020].

Tomēr *NRAS* mutācijas ietekme uz slimības progresēšanu un prognozi joprojām ir pretrunīga. Daži pētījumi liecina, ka *NRAS* mutācija ir saistīta ar labvēlīgu prognozi (Platz *et al.*, 2008). Turpretī citi pētījumi pierādīja, ka *NRAS* gēna mutācija ir saistīta ar sliktāku prognozi (Chiappetta *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015; Jakob *et al.*, 2012; Ugurel *et al.*, 2007; Devitt *et al.*, 2011; Heppt *et al.*, 2017). Savukārt dažos pētījumos nav konstatēta būtiska saistība starp *NRAS* mutāciju un melanomas prognozi (Heppt *et al.*, 2017; Ellerhorst *et al.*, 2011).

Tāpat arī IV stadijas melanomas gadījumā dati par *NRAS* mutāciju ir pretrunīgi. Vienā pētījumā tika norādīts, ka *NRAS mutētais* audzēja genotips metastātiskas IV stadijas melanomas gadījumā ir saistīts ar ilgāku kopējo dzīvildzes ilgumu salīdzinājumā ar *BRAF*

mutēto un WT audzēja genotipu (Kim *et al.*, 2015). Citos pētījumos pretēji šie pierādījumi netika apstiprināti (Leslie *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2021).

Turklāt ir pierādīts, ka *NRAS* mutācijas statuss ir neatkarīgs īsākas dzīvildzes prognozes faktors pēc IV stadijas melanomas diagnosticēšanas (Jakob *et al.*, 2012).

Varētu uzskatīt, ka molekulārie mehānismi, kas saistīti ar *NRAS* ģenētisko ceļu, varētu būt atšķirīgi metastātiskas IV stadijas un agrīnas IA–IIC stadijas melanomas gadījumā.

Mūsu pētījuma rezultāti saskan ar iepriekš veiktajiem pētījumiem, kuros pierādīts, ka *NRAS* mutācijas ir saistītas ar lielāku Breslova biezumu un sliktu slimības prognozi (Chiappetta *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015, Jakob *et al.*, 2012; Ugurel *et al.*, 2007; Devitt *et al.*, 2011). Turklāt mūsu pētījums parādīja, ka *NRAS* mutācijas ir saistītas ar paaugstinātu audzēja mitotisko aktivitāti un limfovaskulāro invāziju, kas varētu būt viens no iespējamiem *NRAS* mutācijas izraisītas agresīvas audzēja uzvedības skaidrojumiem. Turklāt mūsu pētījuma rezultāti parādīja, ka *NRAS* mutācijas statuss primārai IA–IIC stadijas melanomai ir spēcīgs prognozējošs faktors, kas ir būtiski saistīts ar bezrecidīva periodu.

Melanomas *NRAS* personalizēta ārstēšana ir izaicinoša. *Lanafarnibs*, *tipifarnibs* ir pētīts *NRAS* mutētas melanomas ārstēšanai (Hessler *et al.*, 2020). Turklāt selektīvi MEK inhibitori varētu sniegt potenciālu ieguvumu *NRAS* mutantu melanomas gadījumā (Nagore *et al.*, 2014). Tomēr mūsu pētījuma potenciāli nozīmīga vērtība ir konstatētā *NRAS* mutāciju būtiskā prognozējošā vērtība IA–IIC stadijas melanomai. Tāpēc ikdienas *NRAS* mutāciju novērtēšana IA–IIC stadijas melanomai varētu būt potenciāli noderīga slimības progresēšanas prognozēšanai. Jāuzsver, ka mūsu pētījuma subjektos tika iekļauti tikai tie, kuriem bija lokāla slimība, t. i., diagnozes noteikšanas brīdī pacientiem nebija lokālas recidīvas, reģionālo limfmezglu metastāžu vai attālu metastāžu.

Trešā visbiežāk sastopamā mutācija agrīnās melanomas gadījumā bija *TERT* gēna mutācija. Mūsu pētījumā tika novērota saistība starp *TERT* mutāciju un Breslova biezumu, pacienta vecumu, mitotisko aktivitāti un *TIL* infiltrāciju. Turklāt pacientiem ar *TERT* mutāciju bija ievērojami īsāks bezrecidīva periods salīdzinājumā ar *TERT* savvaļas melanomu. Mūsu pētījuma rezultāti saskan ar iepriekš veiktajiem pētījumiem, kuros pierādīts, ka *TERT* promotera mutācijas ir saistītas ar klīniskajām un histopatoloģiskiem rādītājiem (Horn *et al.*, 2013; Andres-Lencina *et al.*, 2019; Hang *et al.*, 2020). Turklāt *TERT* un *BRAF* kopmutācijas melanomai ir ievērojami īsāks bezrecidīva periods salīdzinājumā ar *BRAF* mutācijas melanomu.

Jāpiemin vairāki mūsu pētījuma ierobežojumi. Būtu vēlams ievērojami lielāks gadījumu skaits ar vienlīdzīgu dzimumu sadalījumu. Tajā pašā laikā šī pētījuma priekšrocība

bija *NRAS* un *BRAF/NRAS* mutāciju statusa nozīmīgas nozīmes pierādīšana pacientiem ar agrīnas IA–IIC stadijas nemetastātisku melanomu. Turklāt visi pacienti tika uzņemti no vienas onkoloģiskās slimnīcas, kas apkalpo līdz pat 85 % no visiem melanomas gadījumiem Latvijā.

Noslēgumā var secināt, ka pacientiem ar *TERT/BRAF* un *NRAS/BRAF* komutantu IA–IIC stadijas melanomu bija īsāks bezrecidīva periods salīdzinājumā ar savvaļas *NRAS*, savvaļas *TERT* un savvaļas *BRAF* melanomu. Komplekss *BRAF*, *TERT* un *NRAS* novērtējums melanomai ikdienas klīniskajā praksē ir lietderīgs slimības progresēšanas riska stratifikācijai, un tāpēc to varētu ieteikt ikdienas klīniskajā praksē arī pacientiem ar IA–IIB stadijas melanomu.

5. SECINĀJUMI

Darba gaitā apstiprinājās sākotnēji izvirzītā hipotēze: tika novērotas sakarības starp klīniskajām, histopatoloģiskajām un ģenētiskajām īpašībām pacientiem ar agrīnas stadijas melanomu. Turklāt tika konstatētas asociācijas starp histopatoloģiskajām pazīmēm un *BRAF*, *NRAS*, *TERT* mutācijas statusu. Pamatojoties uz darba rezultātiem, tika izdarīti šādi secinājumi:

1. Pacientiem ar IA–IIC stadijas nodulāro melanomu salīdzinājumā ar IA–IIC stadijas virspusēji augošu melanomu bija augstāks Klārka invāzijas līmenis, lielāks Breslova biežums, biežāk sastopams čūlojums, lielāks mitožu skaits, lielāks audzēja izmērs un zemas pakāpes audzēju infiltrējošo limfocītu infiltrācija. Turklāt nodulārā melanoma biežāk tika konstatēta vīriešiem salīdzinājumā ar sievietēm.
2. Tādi klīniskie raksturlielumi kā audzēja izmērs un pacientu dzimums korelēja ar melanomas histopatoloģiskiem rādītājiem. Turklāt *TIL* bija saistīta ar bezrecidīva perioda ilgumu, klīniskajiem un histopatoloģiskajiem raksturlielumiem.
3. *BRAF V600* mutācija tika konstatēta 53,3 % gadījumu. *NRAS* mutācija tika konstatēta 29,6 % gadījumu. 29 pacientiem bija *NRAS Q61* mutācija un 10 pacientiem – *NRAS G12*, *G13* mutācijas. 21,21 % melanomas gadījumu bija gan *NRAS*, gan *BRAF* kopmutācija. *TERT* promotera mutācija tika novērota 32,2 % gadījumu. C228T (*NM_198253.3(TERT):c.-124C>T*) tika konstatēta 12/38 (31,6 %) gadījumos, savukārt C250T aizvietošana, *NM_198253.3(TERT):c.-146C>T* tika novērota 26/38 (68,4 %) gadījumu.
4. Tika pierādīta saistība starp *BRAF*, *NRAS* un *TERT* mutācijas statusu un klīniskajām un histopatoloģiskajām pazīmēm. Tika novērota saistība starp *BRAF V600* mutācijas statusu un Breslova biežumu, pacienta dzimumu, Klārka līmeni, limfovaskulāro invāziju (LVI), mitožu skaitu un *TIL* infiltrāciju. *NRAS (Q61; G12, G13)* mutācijas statuss bija saistīts ar Breslova biežumu, slimības stadiju, mitotisko aktivitāti un LVI. *TERT* promotera mutācijas saistība tika konstatēta ar Breslova biežumu, pacienta vecumu, mitotisko aktivitāti un *TIL* infiltrāciju.
5. IA–IIC stadijas melanomas pacientiem ar izteiktu *TIL* infiltrāciju bija ievērojami ilgāks bezrecidīva periods salīdzinājumā ar pacientiem ar nelielu *TIL* infiltrāciju. Bezrecidīva periods neatšķīrās starp savvaļas tipa un *BRAF* mutācijas melanomu. Tomēr pacientiem ar *NRAS* mutantu melanomu bija ievērojami īsāks bezrecidīva periods salīdzinājumā ar *NRAS* savvaļas tipa melanomu. Turklāt pacientiem ar *TERT* promotera mutāciju bija ievērojami īsāks bezrecidīva periods salīdzinājumā ar *TERT* savvaļas melanomu.

Savukārt pacientiem ar *TERT/BRAF* un *NRAS/BRAF* kopmutantu IA–IIC stadijas melanomu bija īsāks bezrecidīva periods salīdzinājumā ar savvaļas *NRAS*, savvaļas *TERT* un savvaļas *BRAF* melanomu.

Pētījuma praktiskā nozīme un novitāte

Komplekss histopatoloģiskais novērtējums, tostarp *TIL* un *BRAF*, *TERT* un *NRAS* mutāciju statusa novērtēšana agrīnā (IA–IIC) melanomas stadijā, ikdienas klīniskajā praksē ir noderīgs slimības progresēšanas riska stratifikācijai.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Aksenenko, M. B., Kirichenko, A. K., Ruksha, T. G.: Russian study of morphological prognostic factors characterization in BRAF-mutant cutaneous melanoma. *Pathol Res Pract* 211(7):521–527, 2015.
2. Andres-Lencina, J. J., Rachakonda, S., Garcia-Casado, Z., Srinivas, N., Skorokhod, A., Requena, C., Soriano, V., Kumar, R., Nagore, E. TERT promoter mutation subtypes and survival in stage I and II melanoma patients. *Int J Cancer* 144(5):1027–1036, 2019.
3. Ardekani, S. G., Jafarnejad, S. M., Khosravi, S., Martinka, M., Ho, V., Li, G.: Disease progression and patient survival are significantly influenced by BRAF protein expression in primary melanoma. *Br J Dermatol* 169(2):320–328, 2013.
4. Azimi, F., Scolyer, R. A., Rumcheva, P., Moncrieff, M., Murali, R., McCarthy, S. W., Saw, R. P., Thompson, J.F.: Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 30 (21):2678–2683, 2012.
5. Barnhill, R. L., Fine, J. A., Roush, G. C., Berwick, M.: Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. *Cancer* 78(3):427–32, 1996.
6. Bastian, B.C.: The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol* 9: 239–271, 2014.
7. Bezić, J., Kuret, S., Vrbičić, B., Smolić, J., Borić, I., Škifić, I., Ledina, D., Božić, J.: Clinicopathological Characteristics of BRAF V600E Mutated Melanomas in the Dalmatian Region of Croatia. *Acta Dermatovenerol Croat* 27(4):225–230, 2019.
8. Bucheit, A. D., Syklawer, E., Jakob, J. A., Bassett, R. L., Jr., Curry, J. L., Gershenwald, J. E., Kim, K. B., Hwu, P., Lazar, A. J., Davies, M. A.: Clinical characteristics and outcomes with specific BRAF and NRAS mutations in patients with metastatic melanoma. *Cancer* 119(21):3821–3829, 2013.
9. Burton, A. L., Roach, B. A., Mays, M. P., Chen, A. F., Ginter, B. A., Vierling, A. M., Scoggins, C. R., Martin, R. C. G., Stromberg, A. J., Hagendoorn, L., McMasters, K. M.: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in melanoma. *Am Surg* 77(2):188–192, 2011.
10. Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 161:1681–1696, 2015.
11. Cancer Genome Atlas Network. Cutaneous Melanoma. Available online: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cutaneous_melanoma_blocks.pdf, 2020.
12. Clark, W. H. Jr., Elder, D. E., Guerry, D., Braitman, L. E., Trock, B. J., Schultz, D., Synnestvedt, M., Halpernet, A. C.: Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 81(24):1893–904, 1989.
13. Clemente, C. G., Mihm, M. C. Jr., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., Cascinelli, N.: Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77(7):1303–10, 1996.
14. Chiappetta, C., Proietti, I., Soccodato, V., Puggioni, C., Zaralli, R., Pacini, L., Porta, N., Skroza, N., Petrozza, V., Potenza, C., *et al*: Braf and Nras Mutations Are Heterogeneous and Not Mutually Exclusive in Nodular Melanoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 23:172–177, 2015.
15. Colebatch, A. J., Ferguson, P., Newell, F., Kazakoff, S. H., Witkowski, T., Dobrovic, A., Johansson, P. A., Saw, R. P. M., Stretch, J. R., *et al*: Molecular Genomic Profiling of Melanocytic nevi. *J Invest Dermatol* 139:1762–1768, 2019.
16. Devitt, B., Liu, W., Salemi, R., Wolfe, R., Kelly, J., Tzen, C. Y., Dobrovic, A., McArthur, G.: Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 24(4):666–672, 2011.
17. Dougan, M., Dranoff, G., Dougan, S. K.: Cancer immunotherapy: beyond checkpoint blockade. *Annu Rev Cancer Biol* 3:55–75, 2018.
18. Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., *et al*: Mutations of the Braf Gene in Human Cancer. *Nature* 417:949–954, 2002.

19. den Dunnen, J. T., Dalgleish, R., Maglott, D. R., Hart, R. K., Greenblatt, M. S., McGowan-Jordan, J., Roux, A. F., Smith, T., Antonarakis, S. E., Taschner, P. E. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat* 37(6):564-9, 2016.
20. Dummer R., Ascierto, P. A., Gogas, H. J., Arance, A., Mandala, M., Liskay, G., Garbe, C., Schadendorf, D., Krajsova, I., *et al.*: Encorafenib Plus Binimetinib Versus Vemurafenib or Encorafenib in Patients with BRAF-Mutant Melanoma (Columbus): A Multicentre, Open-Label, Randomised Phase 3 Trial. *Lancet Oncol* 19:603–615, 2018.
21. Eigentler, T., Assi, Z., Hassel, J. C., Heinzerling, L., Starz, H., Berneburg, M., Bauer, J., Garbe, C.: Which melanoma patient carries a BRAF-mutation? A comparison of predictive models. *Oncotarget* 7(24): 36130–36137, 2016.
22. Elder, D. E., Bastian, B. C., Cree, I. A., Massi, D., Scolyer, R. A.: The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway. *Arch Pathol Lab Med* 144: 500–522, 2020.
23. Ellerhorst, J. A., Greene, V. R., Ekmekcioglu, S., Warneke, C. L., Johnson, M. M., Cooke, C. P., Wang, L. E., Prieto, V. G., Gershenwald, J. E., *et al.*: Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res* 17(2):229–235, 2011.
24. Estrozi, B., Machado, J., Rodriguez, R., Bacchi, C. E.: Clinicopathologic findings and BRAF mutation in cutaneous melanoma in young adults. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 22(1):57–64, 2014.
25. Fong L, Small EJ Anti-Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 Antibody: The First in an Emerging Class of Immunomodulatory Antibodies for Cancer Treatment. *J Clin Oncol* 26: 5275–5283, 2008.
26. Forsea, A. M.: Melanoma Epidemiology and Early Detection in Europe: Diversity and Disparities. *Dermatol Pract Concept* 10(3): e2020033, 2020.
27. Fortes, C., Mastroeni, S., Mannooranparampil, T. J., Passarelli, F., Zappala, A., Annessi, G., Marino, C., Caggiati, A., Russo, N., Michelozzi, P.: Tumor-infiltrating lymphocytes predict cutaneous melanoma survival. *Melanoma Res* 25:306–311, 2015.
28. Grimaldi, A. M., Simeone, E., Festino, L., Vanella, V., Strudel, M., Ascierto, P. A. MEK Inhibitors in the Treatment of Metastatic Melanoma and Solid Tumors. *Am J Clin Dermatol* 18(6):745–754, 2017.
29. Hang, G. A., Wiggins, J. M., Corless, B. C., Syeda, M. M., Tadepalli, J. S., Blake, S., Fleming, N., Darvishian, F., Pavlick, A., Berman, R., Shapiro, R., Shao, Y., Karlin-Neumann, G., Spittle, C., Osman, I., Polsky, D. TERT, BRAF, and NRAS Mutational Heterogeneity between Paired Primary and Metastatic Melanoma Tumors. *J Invest Dermatol* 140 (8):1609–1618.e7, 2020.
30. Havel, J. J., Chowell, D., Chan, T. A.: The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 19:133–150, 2019.
31. Heppt, M. V., Siepmann, T., Engel, J., Schubert-Fritschle, G., Eckel, R., Mirlach, L., Kirchner, A., Jung, T., Gesierich, A., Ruzicka, T., *et al.*: Prognostic significance of BRAF and NRAS mutations in melanoma: a German study from routine care. *BMC Cancer* 10;17(1):536, 2017.
32. Hessler, M., Jalilian, E., Xu, Q., Reddy, S., Horton, L., Elkin, K., Manwar, R., Tsoukas, M., Mehregan, D., Avanaki, K.: Melanoma Biomarkers and Their Potential Application for In Vivo Diagnostic Imaging Modalities. *Int J Mol Sci* 21(24): 9583, 2020.
33. Hodi, F. S., O’Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., *et al.*: Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 363:711–723, 2010.
34. Horn, S., Figl, A., Rachakonda, P. S., *et al.* TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 339(6122):959–961. 36, 2013.
35. Jakob, J. A., Bassett, R. L., Jr., Ng, C. S., Curry, J. L., Joseph, R. W., Alvarado, G. C., Rohlf, M. L., Richard, J., Gershenwald, J. E., *et al.*: NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer* 118(16):4014–4023, 2012.
36. Yaman, B., Akalin, T., Kandiloğlu, G.: Clinicopathological Characteristics and Mutation Profiling in Primary Cutaneous Melanoma. *Am J Dermatopathol* 37(5):389–397, 2015.
37. Yang, K., Oak, A. S. W., Slominski, R. M., Brożynam, A. A., Slominski, A. T.: Current Molecular Markers of Melanoma and Treatment Target. *Int J Mol Sci* 16: 3535, 2020.

38. Klein, S., Mauch, C., Brinker, K., Noh, K. W., Knez, S., Büttner, R., Quaas, A., Helbig, D.: Tumor infiltrating lymphocyte clusters are associated with response to immune checkpoint inhibition in BRAF V600E/K mutated malignant melanomas. *Sci Rep* 11: 1834, 2021.
39. Kim, S. Y., Kim, S. N., Hahn, H. J., Lee, Y. W., Choe, Y. B., Ahn, K. J.: Meta analysis of BRAF mutations and clinicopathologic characteristics in primary melanoma. *J Am Acad Dermatol* 72(6):1036–1046.e2, 2015.
40. Lee, J. H., Choi, J. W., Kim, Y. S.: Frequencies of Braf and Nras Mutations Are Different in Histological Types and Sites of Origin of Cutaneous Melanoma: A Meta-Analysis. *Br J Dermatol* 164:776–784, 2011.
41. Leslie, C., Bowyer, S. E., White, A., Grieu-Iacopetta, F., Trevenen, M., Iacopetta, B., Amanuel, B., Millward, M.: FOXP3+ T regulatory lymphocytes in primary melanoma are associated with BRAF mutation but not with response to BRAF inhibitor. *Pathology* 47(6):557–563, 2015.
42. Lin, R. L., Wang, T. J., Joyce, C. J., Mihm, Jr. M. C., Murphy, G. F., Lian, C. G., Lin, Y. E.: Decreased tumor-infiltrating lymphocytes in nodular melanomas compared with matched superficial spreading melanomas. *Melanoma Res* 26(5):524–527, 2016.
43. Long, G. V., Menzies, A. M., Nagrial, A. M., Haydu, L. E., Hamilton, A. L., Mann, G. J., Hughes, T. M., Thompson, J. F., Scolyer, R. A., Kefford, R. F.: Prognostic and Clinicopathologic Associations of Oncogenic Braf in Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 29:1239–1246, 2011.
44. Maibach, F., Sadozai, H., Morteza, S., Jafari, S., Hunger, R. E., Schenk, M.: Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Prognostic Value in Cutaneous Melanoma. *Front Immunol* 10 (11) :2105, 2020.
45. Mandalà, M., Massi, D.: Tissue prognostic biomarkers in primary cutaneous melanoma. *Virchows Arch* 464(3): 265–281, 2014.
46. Mandala, M., Imberti, G. L., Piazzalunga, D., Belfiglio, M., Labianca, R., Barberis, M., Marchesi, L., Poletti, P., Bonomi, L., Novellino, L., *et al*: Clinical and histopathological risk factors to predict sentinel lymph node positivity, disease-free and overall survival in clinical stages I–II AJCC skin melanoma: outcome analysis from a single-institution prospectively collected database. *Eur J Cancer* 45(14):2537–2545, 2009.
47. Melis C, Rogiers A, Bechter O, van den Oord JJ: Molecular Genetic and Immunotherapeutic Targets in Metastatic Melanoma. *Virchows Arch* 471:281–293, 2017.
48. Menzies, A. M., Haydu, L. E., Visintin, L., Carlino, M. S., Howle, J. R., Thompson, J. F., Kefford, R. F., Scolyer, R. A., Long, G. V.: Distinguishing Clinicopathologic Features of Patients with V600e and V600k Braf-Mutant Melanoma. *Clin Cancer Res* 18:3242–3249, 2012.
49. Michielin, O., Van Akkooi A. C. J., Ascierto, P. A., Dummer, R., Keilholz, U., ESMO Guidelines Committee Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 30:1884–1901, 2019.
50. Nagore, E., Requena, C., Traves, V., Guillen, C., Hayward, N. K., Whiteman, D. C., Hacker, E.: Prognostic value of BRAF mutations in localized cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 70(5):858–862, 2014.
51. Ny, L., Hernberg, M., Nyakas, M., Koivunen, J., Oddershede, L., Yoon, M., Wang, X., Guyot, P., Geisler, J.: BRAF mutational status as a prognostic marker for survival in malignant melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol* 59(7):833–844, 2020.
52. Park, C. K., Kim, S. K.: Clinicopathological significance of intratumoral and peritumoral lymphocytes and lymphocyte score based on the histologic subtypes of cutaneous melanoma. *Oncotarget* 28; 8(9): 14759–14769, 2017.
53. Platz, A., Egyhazi, S., Ringborg, U., Hansson, J.: Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol* 1: 395–405, 2008.
54. Pracht, M., Mogha, A., Lespagnol, A., Fautrel, A., Mouchet, N., Le Gall, F., Paumier, V., Lefeuvre-Plesse, C., Rioux-Leclerc, N., *et al*: Prognostic and Predictive Values of Oncogenic Braf, Nras, C-Kit and Mitf in Cutaneous and Mucous Melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 29:1530–1538, 2015.
55. Raaijmakers, M. I. G., Widmer, D. S., Narechania, A., Eichhoff, O., Freiburger, S. N., Wenzina, J., Cheng P. F., Mihic-Probst, D., DeSalle, R., Dummer, R., *et al*. Co-existence of BRAF and NRAS driver

- mutations in the same melanoma cells results in heterogeneity of targeted therapy resistance. *Oncotarget*. 2016;7:77163–77174.
56. Ribas, A., Wolchok, J. D.: Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*. 359:1350–1255, 2015.
 57. Romaine, S. T., Wells-Jordan, P., de Haro, T., Dave-Thakrar, A., North, J., Pringle, J. H., Saldanha, G.: A small multimarker panel using simple immunohistochemistry methods is an adjunct to stage for cutaneous melanoma prognosis. *Melanoma Res* 26(6): 580–587, 2016.
 58. Rose, E. E., Egyhazi, S., Omholt, K., Mansson-Brahme, E., Platz, A., Hansson, J., Lundeberg, J.: NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res* 6(6):471–478, 2006.
 59. Scolyer, R., Massi, D., Willemze, R., Elder, D. E.: WHO Classification of Skin Tumours, WHO (ed), 2018.
 60. Schlaak, M., Bajah, A., Podewski, T., Kreuzberg, N., von Bartenwerffer, W., Wardelmann, E., Merkelbach-Bruse, S., Büttner, R., Mauch, C., Kurschat, P.: Assessment of clinical parameters associated with mutational status in metastatic malignant melanoma: a single-centre investigation of 141 patients. *Br J Dermatol* 168(4):708–716, 2013.
 61. Shellenberger, R., Nabhan, M., Kakaraparthi, S.: Melanoma screening: A plan for improving early detection. *Ann Med* 48:142–148, 2016.
 62. Sorokins, V., Tilgase, A., Olmane, E., Isajevs, S., Zablocka, T., Rasa, A., Alberts, P. A progressive stage IIIB melanoma treated with oncolytic ECHO-7 virus: A case report. *SAGE Open Med Case Rep* 2020; 8:2050313X20934978.
 63. Spathis, A., Katoulis, A. C., Damaskou, V., Liakou, A. I., Kottaridi, C., Leventakou, D., Sgouros, D., Mamantopoulos, A., Rigopoulos, D., Karakitsos, P. *et al.* BRAF Mutation Status in Primary, Recurrent, and Metastatic Malignant Melanoma and Its Relation to Histopathological Parameters. *Dermatol Pract Concept* 31;9(1):54–62, 2019.
 64. Taylor, R. C., Patel, A., Panageas, K. S., Busam, K. J., Brady, M. S.: Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 25(7):869–875, 2007.
 65. Tas, F., Erturk, K.: Clinical and prognostic significance of BRAF V600E mutation in non-metastatic cutaneous melanoma patients. *Neoplasma* 23;66(4):631–636, 2019.
 66. Tas, F., Erturk, K.: Coexistence of regression and tumor infiltrating lymphocytes is associated with more favorable survival in melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2021.
 67. Thomas, N. E., Busam, K. J., From, L., Kricker, A., Armstrong, B. K., Anton-Culver, H., Gruber, S. B., Gallagher, R. P., Zanetti, R., Rosso, S., *et al.*: Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. *J Clin Oncol* 31(33):4252–4259, 2013.
 68. Topalian, S. L., Sznol, M., McDermott, D. F., Kluger, H. M., Carvajal, R. D., Sharfman, W. H., Brahmer, J. R., Lawrence, D. P., Atkins, M. B., *et al.*: Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients with Advanced Melanoma Receiving Nivolumab. *J Clin Oncol* 32:1020–1030, 2014.
 69. Tuthill, R. J., Unger, J. M., Liu, P. Y., Flaherty, L. E., Sondak, V. K.: Risk assessment in localized primary cutaneous melanoma: a Southwest Oncology Group study evaluating nine factors and a test of the Clark logistic regression prediction model. *Am J Clin Pathol* 118(4):504–511, 2002.
 70. Ugurel, S., Thirumaran, R. K., Bloethner, S., Gast, A., Sucker, A., Mueller-Berghaus, J., Rittgen, W., Hemminki, K., Becker, J. C., Kumar, R., Schadendorf, D. B-RAF and N-RAS mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis. *PLoS One* 2(2):e236, 2007.
 71. Weiss, S. A., Han, S. W., Lui, L., Tchack, J., Shapiro, R., Berman, R., Zhong, J., Krogsgaard, M., Osman, I., Darvishian, F.: Immunologic heterogeneity of tumor infiltrating lymphocyte composition in primary melanoma. *Hum Pathol* 57:116–125, 2016.

72. Zablocka, T., Nikolajeva, A., Kreismane, M., Pjanova, D., Isajevs, S.: Addressing the importance of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes in disease progression and clinicopathological characteristics. *Mol Clin Oncol* 15(6):255, 2021.

PATEICĪBAS

Vispirms vēlos pateikties savai ģimenei par atbalstu un ticību.

Esmu ļoti pateicīga saviem darba vadītājiem profesoram Sergejam Isajevam un vadošajai pētniecei, doktorei Dacei Pjanovai par iespēju uzsākt darbu, par viņu lielo atbalstu, neatlaidīgo motivāciju un profesionālo orientāciju, kas dziļi ietekmēja manu personīgo izaugsmi ne tikai melanomas pētniecībā, bet arī patoloģijā un molekulārajā ģenētikā.

Īpašs paldies Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra pētniecei Madarai Kreismanei par nenovērtējamo atbalstu melanomas audu paraugu ģenētiskajā testēšanā.

Esmu patiesi pateicīga saviem kolēģiem Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedras profesoram Immanuelam Taivānam, docentei Guntai Strazdai un docentei Valentīnai Gordjušīnai par vērtīgiem padomiem un ieteikumiem promocijas darba izstrādes laikā.

Paldies kolēģiem Rīgas Austrumu klīniskajā universitātes slimnīcā, Paula Stradiņa Klīniskajā universitātes slimnīcā un Traumatoloģijas un ortopēdijas slimnīcā par atbalstu un spēju iedrošināt, kad tas bija nepieciešams.

Esmu patiesi pateicīga Latvijas Universitātes Promocijas padomes sekretārei asociētajai profesorei Līgai Plakanei par praktiskajiem norādījumiem promocijas procesā.

Esmu ļoti pateicīga Ilzei Danusevičai, Sigitai Kaļķei un Ingai Šķenderei par vērtīgo atbalstu doktorantūras studiju laikā.

Esmu ļoti pateicīga Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes dekānam profesoram Valdim Folkmanim par vērtīgo atbalstu doktorantūras studiju un zinātniskā darba laikā.

Pētījums tika atbalstīts projekta "Doktorantūras kapacitātes stiprināšana Latvijas Universitātē jaunā doktorantūras modeļa ietvaros" identifikācijas Nr. 8.2.2.0/20/I/00.