RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Kristīne Azarjana

MELANOMAS PROGNOTISKIE UN RISKA FAKTORI

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai
Specialitāte – medicīna

Rīga, 2012

Kristīne Azarjana

Melanomas prognostiskie un riska faktori

**Promocijas darba
kopsavilkums**

Specialitāte – medicīna

Rīga, 2012

Pētījums izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā sadarbībā ar Rīgas Austrumu klīniskās Universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centru. Tas ir apstiprināts Latvijas Centrālajā Ētikas komisijā.

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. habil. med. prof. Ingrīda Čēma, RSU

Dr. biol. Dace Pjanova, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. Rūta Brūvere, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

Dr. biol. asoc. prof. Edvīns Miklašēvičs, RSU

Dr med. prof. Wilma Bergman, Leidenas Universitāte

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2012. gada 12. novembrī plkst. 16.00 Rīgas Stradiņa universitātes Teorētiskās Promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā: www.rsu.lv

Pētnieciskā darba finansējums un atbalsts:

- Eiropas sociālā fonda projekts “Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē”; Nr.2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009.

- FP6 projekts: GenoMEL-018702 „Melanomas ģenētiskie un vides riska faktori: izpausme uzvedības maiņā”;
- Eiropas Ekonomikas zonas finanšu instrumenta grantu shēmas “Akadēmiskie pētījumi” apakšprojekts Nr. EEZ09AP-38 „Molekulāri ģenētiskās izmaiņas ādas ļaundabīgās melanomas attīstībā Latvijā”.

Promocijas padomes sekretāre: *Dr habil. med. prof. Līga Āberberga-Augškalne*

SATURS

IEVADS.....	5
1. DARBA MĒRĶIS, UZDEVUMI UN HIPOTĒZE.....	6
2. DARBA ZINĀTNISKĀ NOVITĀTE UN PRAKTISKĀ AKTUALITĀTE...	7
3. MATERIĀLI UN METODES.....	8
3.1. Pētījuma uzbūve.....	8
3.2. Melnomas epidemioloģisko, klīnisko un histoloģisko datu analīze.....	8
3.3. Melnomas pacientu ģenētiskā analīze.....	9
3.3.1. Augstas penetrances melanomas gēnu <i>CDKN2A</i> un <i>CDK4</i> analīze.....	10
3.3.2. Zemas penetrances melanomas gēna <i>MC1R</i> analīze.....	11
4. REZULTĀTI.....	13
4.1. Melnomas epidemioloģija.....	13
4.2. Ģenētiskās izmaiņas pacientiem ar melanomas diagnozi.....	19
4.2.1. Ģenētiskajā analīzē iesaistīto melanomas pacientu raksturojums...	19
4.2.2. Mutācijas augstas penetrances melanomas gēnos <i>CDKN2A</i> un <i>CDK4</i> pacientiem ar atkārtotiem audzējiem ģimenē.....	20
4.2.3. Izmaiņas gēna <i>CDKN2A</i> promoterā un intronos pacientiem ar atkārtotiem audzējiem ģimenē.....	26
4.2.4. Delēcijas <i>CDKN2A</i> reģionā pacientiem ar atkārtotoiem audzējiem ģimenē.....	27
4.2.5. Mutācijas augstas penetrances melanomas gēnos <i>CDKN2A</i> un <i>CDK4</i> pacientiem ar vairākām primārajām melanomām.....	27
4.2.6. Mutācijas augstas penetrances melanomas gēnos <i>CDKN2A</i> un <i>CDK4</i> gados jauniem melanomas pacientiem (≤ 40 gadi).....	29
4.2.7. <i>MC1R</i> gēna polimorfismi un to loma melanomas attīstībā.....	29
5. DISKUSIJA.....	33
6. SECINĀJUMI.....	41
7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	43
8. ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS.....	48
9. ZIŅOJUMI PAR DARBA REZULTĀTIEM.....	49

DARBĀ IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI

cen	centromēra
CI	ticamības intervāls (angl.val. <i>confidence interval</i>)
<i>CDK4</i>	ciklīna atkarīgās kināzes 4 gēns
<i>CDKN2A</i>	ciklīna atkarīgās kināzes 2A inhibitora gēns
CNS	centrālā nervu sistēma
DNS	dezoksiribonukleīnskābe
MC1R, <i>MC1R</i>	melanokortīna 1. receptors, melanokortīna 1. receptora gēns
<i>MLPA</i>	multiplās ligācijas atkarīgo zonžu amplifikācija (angļu val. <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>)
na	nav analizēts
nd	nav datu
NRHC	angļu val. <i>non red hair colour</i>
OR	izredžu attiecība (angļu val. <i>odds ratio</i>)
HR	riska attiecība (angļu val., <i>hazard ratio</i>)
p	ticamības vērtība
<i>PCR</i>	polimerāzes ķēdes reakcija (angļu val. <i>polymerase chain reaction</i>)
RHC	angļu val. <i>red hair colour</i>
RAKUS LOC	Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centrs
SD	standartnovirze
SNP	atsevišķa nukleotīda nomaiņa (angļu val. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
tel	telomēra
UV	ultravioletais starojums
WT	savvaļas tips (angļu val. <i>wild type</i>)

IEVADS

Melanoma ir ļaundabīgākais ādas audzējs, kura attīstību nosaka melanocītu patoloģiska proliferācija. Tās sastopamības biežuma un mirstības rādītāji pasaulē ar katru gadu pieaug straujāk nekā jebkuram citam audzēja veidam.

Melanoma ir multifaktoriāla slimība, kuras pamatā ir gēnu, indivīda pigmentācijas fenotipa un ārējās vides faktoru mijiedarbība. Galvenais ārējās vides riska faktors melanomas attīstībā ir ultravioletais starojums, kā arī ar to saistītie saules apdegumi, kas īpaši bīstami ir bērnībā un pusaudžu vecumā. Nozīmīgākie fenotipiskie riska faktori ir liels dzimumzīmju skaits, kā arī atipiskās dzimumzīmes. Tāpat pie fenotipiskajiem riska faktoriem pieskaita vasaras raibumus, gaišu ādu un rudus vai blondus matus.

Attiecībā uz gēniem un iedzimtību, apmēram 10% melanomas pacientu ģimenes anamnēzē sastop atkārtotus saslimšanas gadījumus, kas norāda uz slimības pārmantojamību. Melanoma tiek uzskatīta par pārmantotu, ja ģimenē ir vismaz trīs saslimšanas gadījumi, bet apgabalos ar zemāku UV starojuma intensitāti, piemēram, Ziemeļeiropā, jau gadījumā, ja ģimenē ir divi saslimšanas gadījumi [de Snoo *et al.*, 2005].

Ir zināmi divi tā dēvētie augstas penetrances melanomas gēni - *CDKN2A* (ciklīnatkarīgas kināzes inhibitors 2A) un *CDK4* (ciklīnatkarīgā kināze 4). Vairumā ģimeņu mutācijas* ir atrastas *CDKN2A* gēnā. Savukārt mutācijas *CDK4* gēnā ir retas un visā pasaulē atrastas tikai atsevišķās ģimenēs. Tomēr ne visās ģimenēs ar atkārtotiem melanomas saslimšanas gadījumiem tiek atrastas mutācijas minētajos gēnos. Tas liek domāt, ka eksistē arī citi šobrīd vēl neatklāti augstas penetrances melanomas gēni. Turklāt bez šiem augstas penetrances melanomas gēniem eksistē arī zemākas penetrances gēni, kuros izmaiņas ir sastopamas daudz biežāk, taču tās ir saistītas ar ievērojami zemāku slimības attīstības risku. Līdz šim ir identificēts tikai viens nozīmīgs zemas penetrances melanomas gēns - *MC1R* (melanokartīna 1 receptors), kas nosaka noteiktas matu krāsas, ādas tipa, vasaras raibumu un melanomas attīstību [Duffy *et al.*, 2004; Box *et al.*, 2001].

Savukārt melanomas prognozi nosaka pacienta klīniskie un audzēja histoloģiskie parametri. Noteicošā loma audzēja atklāšanas brīdī ir tā histoloģiskajiem parametriem, īpaši melanomas *Breslow* dziļumam un čūlošanai. Ņemot vērā to, ka vienīgā efektīvā melanomas ārstēšanas metode joprojām ir ķirurģiskā, slimības atklāšana tās agrīnajās stadijās nodrošina augstākus pacienta dzīvildzes rādītājus.

-
- Klīniskajā praksē par mutācijām tiek uzskatītas izmaiņas gēnos, kas izraisa slimības attīstību, savukārt izmaiņas, kas slimību nerada, sauc par polimorfismiem [Cotton, 2002].

1. DARBA MĒRĶIS, UZDEVUMI UN HIPOTĒZE

Darba mērķis

Izvērtēt melanomas epidemioloģiju, kā arī klīniskos un histoloģiskos parametrus saistībā ar slimības prognozi, un noteikt melanomas ģenētiskos riska faktorus Latvijas populācijā.

Uzdevumi

1. Apkopot epidemioloģiskos, klīniskos un histoloģiskos datus par melanomas pacientiem, kuri ārstējušies Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centrā (RAKUS LOC) laika posmā no 1998.-2008. gadam.
2. Izvērtēt klīnisko un histoloģisko parametru ietekmi uz melanomas pacientu dzīvildzi.
3. Noteikt pārmantotās melanomas sastopamības biežumu Latvijā.
4. Izanalizēt mutācijas lokusā *CDKN2A* un gēna *CDK4* 2. eksonā melanomas pacientiem ar melanomu, aizkuņģa dziedzera un centrālās nervu sistēmas (CNS) audzējiem ģimenes anamnēzē.
5. Izanalizēt *MC1R* gēna polimorfismus melanomas pacientiem un kontroles personām un noteikt ar *MC1R* gēna polimorfismiem saistīto melanomas attīstības risku.

Darba hipotēze

Melanomas prognoze ir saistīta ar pacienta klīniskajiem un audzēja histoloģiskajiem parametriem, savukārt melanomas attīstības risku ietekmē izmaiņas melanomas riska gēnos.

2. DARBA ZINĀTNISKĀ NOVITĀTE UN PRAKSTISKĀ AKTUALITĀTE

Zinātniskā novitāte

Latvijā līdz šim nopietni epidemioloģiski pētījumi attiecībā uz melanomu nav veikti. Savukārt augstas penetrances melanomas gēni *CDKN2A* un *CDK4* galvenokārt analizēti sporadiskās melanomas pacientiem [Pjanova *et al.*, 2007], bet salīdzinoši zemākas penetrances gēni līdz šim nav analizēti vispār. Pētījuma ietvaros tika atklāta mutācija gēnā *CDKN2A* – delēcija gēna *CDKN2A/p14^{ARF}* promotera reģionā, kas ir pirmais gadījums, kad melanomas pacientam Latvijā konstatē mutāciju *CDKN2A* gēnā. Gēna *CDK4* analīzē tika atrasti divi melanomas pacienti ar mutāciju R24H no dažādām ģimenēm, kas bija attiecīgi otrā un trešā ģimene ar *CDK4* gēna R24H mutāciju Latvijā. Haplotipu analīzes dati visās trijās ģimenēs ar gēna *CDK4* R24H mutāciju liecina par iespējamu ciltstēva mutāciju Latvijas populācijā.

Praktiskā aktualitāte

Ņemot vērā to, ka melanomas saslimstības biežuma rādītāji pieaug un melanoma var būt arī ģenētiski predisponēta, gan pacienti, gan ārsti ir jāinformē par ģenētiskās izmeklēšanas iespējām personām ar atkārtotiem melanomas gadījumiem ģimenes anamnēzē. Personām ar melanomu ģimenes anamnēzē būtu jāpiedāvā *CDKN2A* un *CDK4* gēnu analīze, kas veicinātu paaugstināta melanomas riska personu atklāšanu. Personām ar atkārtotiem melanomas gadījumiem ģimenē un ņemot vērā cilvēka personīgo anamnēzi attiecībā uz melanomu būtu jāveic regulāras ādas apskates pie dermatologa vai onkologa. Augsta melanomas riska personu savlaicīga izglītošana par ādas pašizmeklēšanas metodēm un ultravioletā starojuma noteicošo lomu melanomas attīstībā var nodrošināt labākus dzīvildzes rādītājus ādas melanomas attīstības gadījumā. Praktiskas rekomendācijas melanomas paaugstināta riska personu izmeklēšanai un izglītošanai, balstoties uz darbā apkopotajiem rezultātiem, ir plānots iekļaut Latvijas Melanomas profilakses un terapijas vadlīnijās, kas ir tapšanas stadijā.

3. MATERIĀLI UN METODES

3.1. Pētījuma uzbūve

Pētījums sastāvēja no divām daļām: 1) melanomas epidemioloģiskās situācijas izvērtēšanas, melanomas klīnisko un histoloģisko parametru analīzes Latvijā, par pamatu ņemot RAKUS LOC arhīva datus, un 2) melanomas pacientu ģenētiskās analīzes, kas tika veikta sadarbībā ar Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centru.

3.2. Melanomas epidemioloģisko, klīnisko un histoloģisko datu analīze

Melanomas epidemioloģiskās situācijas novērtēšanai un klīnisko un histoloģisko parametru analīzei Latvijā tika apkopoti un analizēti arhīva dati par 984 pacientiem ar ādas melanomas diagnozi, kas ārstējušies RAKUS LOC laikā posmā no 1998. gada 01. janvāra līdz 2008. gada 31. decembrim.

Iekļaušanas kritēriji: pētījumā tika iekļauti pacienti ar histoloģiski apstiprinātu primārās ādas melanomas diagnozi, ieskaitot *in situ* melanomu. Gadījumā, ja pacientam bija attīstījušās vairākas primārās ādas melanomas, analīzē tika iekļauta pirmā melanoma (kas bija attīstījusies agrāk).

Izslēgšanas kritēriji: pētījumā netika iekļauti pacienti ar melanomas recidīviem un melanomas ādas metastāzēm ar nezināmu primārā audzēja lokalizāciju, kā arī citas lokalizācijas melanomas.

No RAKUS LOC arhīva tika iegūti dati par pacienta dzimumu, vecumu melanomas diagnozes uzstādīšanas brīdī, audzēja lokalizāciju, klīniski-histoloģisko apakštipu un histoloģiskajiem parametriem (pigmenta klātbūtni, čūlošanu, šūnu veidu, *Breslow* audzēja biezumu, *Clark* invāzijas līmeni). Lai varētu novērtēt katra analizētā parametra saistību ar dzīvildzi, par visiem pētījumā iesaistītajiem pacientiem tika savākta informācija par to, vai pacients ir dzīvs vai miris uz 2011. gada 1. oktobri.

No iegūtajiem datiem tika aprēķināta melanomas incidence RAKUS LOC (gadījumu skaits uz 100 000 iedzīvotāju) laikā posmā no 1998. līdz 2008. gadam. Melanomas incidences un citu augstāk minēto parametru izmaiņas laikā gaitā tika analizētas ar autoregresīvo modeli, pielietojot kvadrātisko regresiju. Analīze tika veikta izmantojot programmu R [Spector, 2008].

Papildus pacienti tika sadalīti grupās (sievietes un vīrieši, kā arī divās līdzīgās grupās pēc vecuma, proti, pēc mediānas, līdz 63 gadu vecumam un pēc 63 gadu vecuma). Audzēja biezuma atšķirības pēc *Breslow* minētajās grupās, kā arī vecuma

atšķirības starp sievietēm un vīriešiem tika salīdzinātas izmantojot *Mann-Whitney* testu. Kategorisko melanomas parametru (audzēja lokalizācijas, klīniski-histoloģisko apakštipu un histoloģisko parametru (pigmenta klātbūtne, čūlošana, šūnu veids, *Breslow* audzēja biezums)) saistība ar pacienta dzimumu un vecumu tika analizēta izmantojot χ^2 kvadrāta metodi. Melanomas klīnisko stadiju un *Clark* invāzijas līmeņu gadījumos, kur izvērtējamās kategorijas bija iespējams sakārtot secīgi, tika izmantots *Cohran-Armitage* tests.

Kaplan–Meier līknes pielietotas, lai ilustrētu kumulatīvās dzīvildzes atšķirības dažādiem mainīgajiem lielumiem, par galveno iznākuma mēru lietojot pacienta dzīves statusu (dzīvs vai miris). Lai izvērtētu atšķirību nozīmīgumu, tika izmantots *logrank* tests un iegūtajām p-vērtībām pielietota Bonfereoni korekcija. Tāpat tika aprēķināta katra faktora riska attiecība (*Hazard ratio*) kopā ar tās 95% ticamības intervālu (*Confidence interval*).

3.3. Melanomas pacientu ģenētiskā analīze

Ģenētiskajā analīzē pacienti tika iesaistīti sadarbībā ar RAKUS LOC. Pacientu iesaistīšana pētījumā notika gan stacionāra, gan ambulatorajās nodaļās.

Iekļaušanas kritēriji pētījumā bija sekojoši:

- 1) brīvprātīga dalība,
- 2) histoloģiski apstiprināta primāra ādas melanoma
- 3) aizpildīta speciālā anketa.

Izslēgšanas kritēriji:

- 1) nepilnīgi aizpildīta speciālā anketa.

Ģenētiskajā analīzē tika iesaistīti 228 melanomas pacienti, par kuriem tika apkopoti un analizēti anamnēzes, klīniskie un histoloģiskie dati. Papildus visi iesaistītie pacienti atbildēja uz īpaši izveidotas anketas jautājumiem par pigmentācijas fenotipu un uzvedību saulē. Pacientus ar melanomu ģimenes anamnēzē atkārtoti apskatīja dermatologs, tika veikta šo pacientu fenotipēšana. Tika fiksēti dati par pacienta ādas, acu un matu krāsu, vasaras raibumu daudzumu, dzimumzīmju skaitu un lielumu.

Tālākais pacientu iedalījums ģenētiskajā analīzē jau bija atkarīgs no katra pacienta melanomas predisponētības pakāpes, proti, potenciāli predisponētiem pacientiem analizēja melanomas augstas penetrances gēnus, *CDKN2A* un *CDK4*, kā arī *MC1R* gēnu. Visiem pārējiem analizēja tikai *MC1R* gēnu (3.1. att.).

MC1R gēna polimorfismu analīzei tika atlasīti 200 pacienti ar melanomas

diagnozi, par kuriem bija pieejama informācija par pigmentācijas fenotipu. Lai izvērtētu *MC1R* gēna polimorfismu lomu melanomas attīstībā, analizē tika iekļautas arī 200 labi noraksturotas kontroles personas vecumā no 18 līdz 79 gadiem. Kontroles grupā bija iekļauti praktiski veseli cilvēki, kuriem nav bijusi diagnosticēta ne melanoma, ne cita veida audzēji. Kontroles grupa tika veidota tā, lai pēc vecuma un dzimuma tā atbilstu pacientu grupai. Kontroles personas, tāpat kā pacienti, atbildēja uz īpaši izveidotās anketas jautājumiem par pigmentācijas fenotipu un uzvedību saulē.

No visām pētījumā iesaistītajām personām tika savākti asins paraugi, kuri tika nogādāti uz Latvijas Genoma centru, kur no tiem pēc vienota protokola izdalīja genomisko DNS.

3.1. att. Veiktās ģenētiskās analīzes shematiskais attēlojums

* - atsevišķi melanomas pacienti bija iekļauti gan *CDKN2A* un *CDK4* gēnu analīzē, gan *MC1R* gēna analīzē

3.3.1. Augstas penetrances melanomas gēnu *CDKN2A* un *CDK4* analīze

CDKN2A un *CDK4* gēnu analīzi veica četrām melanomas pacientu grupām (3.1. att.). Visiem šiem pacientiem izanalizēja gēna *CDKN2A* 1α, 1β, 2. un 3.eksonus, kā arī gēna *CDK4* 2.eksonu. Eksonu pavairošanai izmantoja standarta polimerāzes ķēdes reakcijas (PCR) un reaģentus no *MBI Fermentas* (Lietuva) pēc ražotāja norādījumiem. Izmantoto praimeru secības pieejamas promocijas darbā. Sekvenēšanas PCR izmantoja *ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing* komplektu (*Applied Biosystems*, ASV).

Pacientiem ar atkārtotiem melanomas saslimšanas gadījumiem un pacientiem ar

aizkuņģa dziedzerā vai CNS audzēju ģimenes anamnēzē izanalizēja arī gēna *CDKN2A/p16* promoteru un 1. un 2. intronus. Fragmentu pavairošanai līdzīgi kā iepriekš izmantoja standarta *PCR* un reaģentus no *MBI Fermentas* (Lietuva). Sekvenēšanu veica izmantojot *ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing* komplektu (*Applied Biosystems*, ASV). Fragmentu pavairošanā un sekvenēšanā izmantoto praimeru secības pieejamas promocijas darbā. Pacientiem ar atkārtotiem melanomas saslimšanas gadījumiem, ar aizkuņģa dziedzerā vai CNS audzēju ģimenes anamnēzē, kuriem nebija atrastas mutācijas ne gēnā *CDKN2A*, ne gēna *CDK4* 2. eksonā, analizēja arī delēcijas *CDKN2A* lokusā. Delēcijas *CDKN2A* lokusā analizēja ar multiplās ligācijas atkarīgo zonžu amplifikāciju jeb *MLPA* (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) metodi. *CDKN2A* (*9p21*) lokusa delēciju analīzei izmantoja *SALSA MLPA* komplektu ME024-A1 (*MRC-Holland*, Nīderlande), kas saturēja 20 zondes pret *9p21/CDKN2A* lokusu, 10 zondes pret citiem *9p* hromosomas gēniem un 12 kontroles zondes ārpus *9p21* lokusa. Lai noteiktu ar *MLPA* metodi atklātās delēcijas precīzu atrašanās vietu, kā arī lielumu, veica gēna *CDKN2A/p14^{ARF}* promotera sekvenēšanu.

Ar mērķi salīdzināt ģimenes savā starpā un, otrkārt, salīdzināt ar citām ģimenēm, kurās ir atrasta gēna *CDK4* R24H mutācija, tika veikta ģimeņu ar R24H mutāciju gēnā *CDK4* haplotipēšana. Haplotipēšana izdarīta kā aprakstījis *Molven et al.*, 2005.

3.3.2. Zemas penetrances melanomas riska *MC1R* gēna analīze

MC1R gēna kodējošās sekvences pavairošanai tika izmantoti sekojoši praimerī: *MC1R F* 5' GCA GCA CCA TGA ACT AAG CA 3' un *MC1R R* 5' CAG GGT CAC ACA GGA ACC A 3' (personīga komunikācija ar prof. *J. Newton-Bishop*, Līdsa, Anglija), un sintezētais fragments sekvenēts ar četriem dažādiem praimeriem (*MC1R-S1 F*, *MC1R-S1 R*, *MC1R-S2 F*, *MC1R-S2 R*), kuri bija izveidoti tā, lai sekvenētie fragmenti pārklātos.

Lai novērtētu atrasto *MC1R* gēna polimorfismu iespējamo ietekmi uz receptora funkcijām, to funkcionalitātes analīze tika veikta *in silico*, izmantojot brīvpieejas programmu *PolyPhen-2* [Adzhubei *et al.*, 2010].

Lai noteiktu ar *MC1R* gēna polimorfismiem saistīto melanomas attīstības risku Latvijā, savā starpā tika salīdzināti melanomas pacienti un kontroles personas. Izredžu attiecības (*OR*), 95% ticamības intervāla (*95% CI*) un ticamības vērtības (*p*)

aprēķināšanai izmantoja χ^2 metodi. Analīzi veica izmantojot interneta brīvpieejas kalkulatoru *SISA* (*Simple Interactive Statistical Analysis*). Vecumu atšķirības melanomas pacientu un kontroles personu starpā tika noteiktas ar Stjudenta t-testu (*GraphPad Software QuickCalcs*). Genotipu atbilstība Hārdija-Veinberga līdzsvaram un haplotipi tika noteikti, izmantojot programmu *PLINK 1.07* [Purcel *et al.*, 2007].

Sākotnēji statistiskajā analīze iekļāva katru *MC1R* gēna polimorfismu atsevišķi. Pēc tam *MC1R* gēna polimorfismi tika grupēti divos veidos un analizēti grupās. Viens polimorfismu grupēšanas veids bija to grupēšana pēc polimorfismu skaita vienai personai, proti:

- „vismaz viens” - cilvēkam ir **vismaz** viens nesinonīmais polimorfisms;
- „viens” - cilvēkam ir **tikai** viens nesinonīmais polimorfisms;
- „divi un vairāk” - cilvēkam ir vismaz divi nesinonīmie polimorfismi;

Otrs polimorfismu grupēšanas veids bija pēc to veida, proti, polimorfismos, kuriem ir parādīta saistība ar rudās matu krāsas fenotipu (RHC) un tādos, kuriem šādas saistības nav (NRHC):

- RHC - Asp84Glu, Arg151Cys, Arg160Try;
- NRHC - pārējie nesinonīmie polimorfismi.

Visos gadījumos savvaļas tipa (WT) grupā tika ieskaitītas arī tās personas, kurām bija tikai sinonīmie polimorfismi.

4. REZULTĀTI

4.1. Melnomas epidemioloģija

Vidējā melanomas incidence RAKUS LOC laika posmā no 1998. gada līdz 2008. gadam bija 5,5 uz 100 000 iedzīvotāju gadā un, salīdzinot ar 1998. gadu, uzrādīja 1,9 lielu incidences pieaugumu uz 100 000 iedzīvotāju 2008. gadā (koeficients=0,56, 95%CI=0,15 līdz 1,05; $p=9,67 \times 10^{-3}$) (4.1. att.).

No 984 pētījumā iekļautajiem pacientiem 640 (65%) bija sievietes un 344 (35%) bija vīrieši. Pacientu vidējais vecums bija 61,3 ($\pm 15,3$) gadi, mediāna 63,4 gadi. Sievietes bija nedaudz vecākas nekā vīrieši (4.1. tab.). Vislielākais diagnosticēto melanomu skaits bija vecuma grupā no 61 - 80 gadiem (48,8 %). Vidējais pacienta vecums un vecuma mediāna, analizējot pa gadiem, neuzrādīja lielas atšķirības.

979 pacientiem (95,5%) bija viena primārā melanoma un tikai 5 pacientiem (0,5%) pētījuma perioda laikā bija attīstījušās vairākas primārās melanomas.

Biežākā melanomas lokalizācija bija rumpis (38,2%), tad sekoja kājas (32,5%) un rokas (16,1%) (4.1. tab.). Biežākā melanomas lokalizācija sievietēm bija kājas, bet vīriešiem – rumpis, attiecīgi 41,4% un 59,3%. Pētījuma aptvertajā periodā novēroja būtisku rumpja melanomu skaita pieaugumu (AR koeficients=0,752; 95%CI=0,411-1,092; $p=1,55 \times 10^{-5}$).

4.1. att. Melnomas incidences tendences RAKUS LOC laika posmā no 1998. līdz 2008. gadam

Lielākā melanomu daļa (n=797; 80,9%) bija pigmentētas un tikai 94 (9,6%) – amelanotiskas.

Lielākā daļa melanomu bija nodulāras (39,2%), 4,1% melanomu tika aprakstītas kā virspusēji augošas un 1,5% no melanomām bija *lentigo maligna*. Tikai septiņiem (0,7%) pacientiem bija *in situ* melanoma. Diemžēl vairāk nekā pusē aprakstīto gadījumu (54,6%) melanomas apakštips nebija dokumentēts.

4.1. tabula

Analizēto pacientu klīniskās un primāro melanomu histoloģiskās pazīmes

Pazīme	Pacienti, n (%)	Sievietes, n (%)	Vīrieši, n (%)
Vecums			
Vidējais (SD)	61,3 (±15,3)	61,6 (±15,6)	60,7 (±14,7)
Mediāna	63,4	64,2	62,6
Audzēja lokalizācija			
Galva un kakls	123 (12,5)	84 (13,1)	39 (11,3)
Rumpis	376 (38,2)	172 (26,9)	204 (59,3)
Roka	158 (16,1)	116 (18,1)	42 (12,2)
Kāja	320 (32,5)	265 (41,4)	55 (16,0)
Ģenitālais rajons	7 (0,7)	3 (0,5)	4 (1,2)
Kopā	984 (100,0)	640 (100,0)	344 (100,0)
Breslow biezums (mm)			
Vidējais (SD)	6,0 (±6,8)	5,9 (±7,0)	6,2 (±6,5)
Mediāna	4,0	4,0	4,0
Čūlošana			
Ir	445 (45,2)	283 (44,2)	162 (47,1)
Nav	275 (28,0)	186 (29,1)	89 (25,9)
nd	264 (26,8)	171 (26,7)	93 (27,0)
Pigments			
Ir	797 (80,9)	525 (82,0)	272 (79,1)
Nav	94 (9,6)	60 (9,4)	34 (9,9)
nd	93 (9,5)	55 (8,6)	38 (11,0)
Melanomas veids			
<i>In situ</i>	7 (0,7)	5 (0,8)	2 (0,6)
Virspusēji augoša	40 (4,1)	23 (3,6)	17 (4,9)
Nodulāra	386 (39,2)	246 (38,4)	140 (40,7)
<i>Lentigo maligna</i>	15 (1,5)	12 (1,9)	3 (0,9)
nd	536 (54,5)	354 (55,3)	182 (52,9)

SD – standartnovirze, nd – nav datu

Izčūlojumu konstatēja 45,2% gadījumu, 28,0% melanomu bija bez izčūlojuma, pie kam vīriešiem čūlošanu novēroja nedaudz biežāk (47,1%) nekā sievietēm (44,2%), bet šie rādītāji nebija statistiski nozīmīgi (p=0,078) (4.1. tab.). Melanomas

pigmentācijas un augšanas veidu izmaiņas, kā arī attiecības starp melanomu daudzumu ar un bez izčūlojuma pētījuma aptvertajā periodā nenovēroja.

Vidējais melanomu biezums pēc *Breslow* bija 6,0 mm ($\pm 6,8$ mm), mediāna 4,0 mm. Vīriešiem, salīdzinot ar sievietēm, bija biezākas melanomas, attiecīgi vidēji 6,2 mm ($\pm 6,5$ mm) pret 5,9 mm ($\pm 7,0$ mm) ($p=0,0137$). Pētījuma laika periodā audzēju *Breslow* biezumi ir samazinājušies, lai gan statistiski ticamas izmaiņas ir tikai attiecībā uz *Breslow* biezumu vidējiem rādītājiem (koeficients = -0.37, 95%CI= -0,60 līdz -0,15, $p=0,005$), bet ne *Breslow* biezumu mediānu (koeficients= -0.15, 95%CI= -0,73 līdz 0,43, $p=0,609$) (4.2. att.).

4.2 att. Audzēja *Breslow* biezumu (mm) izmaiņas laika periodā no 1998. līdz 2008. gadam
(x ass – gadi, y ass – biezums (mm))

Vairākumā gadījumu (52,9%) melanomas bija epiteloīdo šūnu, tad sekoja vārpstveida šūnu melanomas (14,6%) un melanomas ar vairākiem šūnu veidiem (12,7%).

Pēc audzēja klīniskās klasifikācijas biežākā klīniskā stadija analizētajiem melanomas pacientiem bija IIC stadija (198 pacienti (20,1%)). Laika gaitā sadalījums starp melanomas klīniskajām stadijām būtiski nemainījās, bet bija vērojams pieaugums visās stadijās bez izņēmuma, kas būtībā ir saskaņā ar melanomas incidences pieaugumu šajā laika periodā.

Ņemot vērā to, ka vecuma mediāna analizētajiem 984 pacientiem ir 63,4 gadi, visus pacientus (pēc klīniskajām un audzēja histoloģiskajām pazīmēm) izanalizēja arī sadalot divās grupās – pacienti līdz 63 gadu vecumam un pacienti vecāki par 63 gadiem.

Saslimstības ar melanomu analīze pa dzimumiem parādīja, ka sievietes ar melanomu ir nedaudz vairāk (par 4,6%) grupā pēc 63 gadiem. Runājot par audzēja lokalizāciju, vecuma grupā pēc 63 gadiem ievērojami pieaug galvas un kakla melanomu skaits (par 10,7%). Vidējais melanomas biezums pēc *Breslow* ir lielāks vecuma grupā pēc 63 gadu vecuma. Pēc 63 g. vecuma pieaug arī nodulāro, amelanotisko un izčūlojušo melanomu skaits (4.2. tab.).

4.2. tabula

Analizēto pacientu klīniskās un melanomu histoloģiskās pazīmes atkarībā no vecuma grupas

Pazīme	Pacienti, n (%)	≤63 gadi, n (%)	>63 gadi, n (%)
Dzimums			
Sieviete	640 (65,0)	318 (62,8)	322 (67,4)
Vīrietis	344 (35,0)	181 (37,2)	156 (32,6)
Kopā	984 (100,0)	506 (100,0)	478 (100,0)
Audzēja lokalizācija			
Galva un kakls	123 (12,5)	37 (7,5)	86 (17,6)
Rumpis	376 (38,2)	220 (43,1)	156 (33,2)
Roka	158 (16,1)	78 (15,5)	80 (16,6)
Kāja	320 (32,5)	166 (32,9)	154 (32,2)
Ģenitālais rajons	7 (0,7)	5 (1,0)	2 (0,4)
Breslow biezums, mm			
Vidējais (SD)	6,0 (6,8)	5,4 (6,2)	6,6 (7,3)
Mediāna	4,0	3,8	5,0
Čūlošana			
Ir	445 (45,2)	197 (38,9)	248 (51,9)
Nav	275 (28,0)	165 (32,6)	110 (23,0)
nd	264 (26,8)	144 (28,5)	120 (25,1)
Pigments			
Ir	797 (80,9)	418 (82,6)	379 (79,3)
Nav	94 (9,6)	36 (7,1)	58 (12,1)
nd	93 (9,5)	52 (10,3)	41 (8,6)
Melanomas veids			
<i>In situ</i>	7 (0,7)	3 (0,6)	4 (0,8)
Virspusēji augoša melanoma	40 (4,1)	26 (5,1)	14 (2,9)
Nodulāra melanoma	386 (39,2)	185 (36,6)	201 (42,1)
<i>Lentigo maligna</i> melanoma	15 (1,5)	9 (1,8)	6 (1,3)
nd	536 (54,5)	283 (55,9)	253 (52,9)

SD – standartnovirze, nd – nav datu

Izmantojot *Kaplan-Meier* kumulatīvās dzīvildzes līknes, tika izvērtēti arī dzīvildzes rādītāji galvenajiem melanomas klīniskajiem un histoloģiskajiem prognostiskajiem faktoriem. Analizējot dzīvildzi pa dzimumiem, statistiski ticami labāki dzīvildzes rādītāji mūsu pētījuma grupā bija sievietēm (HR=1,48; 95%CI=1,22-1,81; $p=7,4 \times 10^{-5}$) (4.3.A att.).

Audzēja lokalizācijai analizētajā pētījuma grupā saistībā ar dzīvildzi statistiski ticamas starpības nav ($p=0,3035$), izņemot melanomas lokalizāciju uz ekstremitāšu ādas vīriešiem, kas uzrāda sliktāku prognozi nekā sievietēm ar tās pašas lokalizācijas melanomu (HR=2,29; 95%CI=1,67-3,14; $p=1,14 \times 10^{-7}$) (4.3.B att.).

**4.3. att. Dzīvildzes rādītāji: A - melanomas pacientiem atkarībā no dzimuma
B - pacientiem ar ekstremitāšu lokalizācijas melanomu atkarībā no dzimuma**

Pacientiem ar nodulārām melanomām dzīvildzes rādītāji ir sliktāki, nekā tiem, kuriem diagnosticēta virspusēji augoša melanoma (HR=4,13; 95%CI=1,83-9,30; $p=2,10 \times 10^{-4}$) (4.4.A att.), bet vīriešiem ar histoloģiski apstiprinātu nodulāru melanomu prognoze ir sliktāka nekā sievietēm (HR=1,4; 95%CI=1,0-1,9 ; $p=0,02$)) (4.4.B att.).

Dzīvildzes rādītāji korelē ar *Breslow* audzēja biezumu (4.4.C att.). Vīriešiem prognoze ir sliktāka grupās ar *Breslow* biezumu 1,01-2 mm (HR=2,53; 95%CI=1,1-5,94; $p=0,0014$) un 2,01-4 mm (HR=1,94; 95%CI=1,2-3,1; $p=0,0035$). Audzēju gadījumā līdz 1 mm un virs 4 mm pēc *Breslow* statistiski ticamas starpības dzīvildzes rādītājos starp dzimumiem nav (attiecīgi $p=0,56$ un $p=0,27$).

4.4. att. Dzīvildzes rādītāji melanomas pacientiem: A - atkarībā no audzēja veida, B - atkarībā no dzimuma nodulāras melanomas gadījumā; C - atkarībā no melanomas *Breslow* biezuma; D – atkarībā no pigmenta klātbūtnes; E – atkarībā no čūlošanas klātbūtnes; F – atkarībā no čūlošanas klātbūtnes un dzimuma

Daudz labāki dzīvildzes rādītāji ir pacientiem bez audzēja čūlošanas ($HR=0,40$; $95\%CI=0,30-0,51$; $p=7,23 \times 10^{-13}$) (4.4.E att.). Salīdzinot vīriešus un sievietes ar audzēja izčūlojumu, prognoze labāka bija sievietēm (4.4.F att.), lai gan pēc Bonferoni korekcijas piemērošanas šie rādītāji nebija statistiski nozīmīgi. Pigmenta klātbūtne audzējā nosaka labāku prognozi ($HR=1,91$; $95\%CI=1,43-2,55$; $p=7,16 \times 10^{-6}$) (4.4.D att.). Melanomas šūnu veida korelāciju ar pacientu dzīvildzi nekonstatēja ($HR=0,99$; $95\%CI=0,86-1,13$; $p=0,828$). Bet audzēja klīniskajai stadijai bija izteikta saistība ar pacientu dzīvildzes rādītājiem ($HR=1,72$; $95\%CI=1,54-1,91$; $p<2 \times 10^{-16}$).

4.2. Ģenētiskās izmaiņas melanomas pacientiem

4.2.1. Ģenētiskajā analīzē iesaistīto melanomas pacientu raksturojums

No ģenētiskajā pētījumā iekļautajiem pacientiem, 143 (62,7%) bija ar sporādiskas melanomas gadījumiem. 20 pacientiem (8,8%) tika konstatēta melanoma ģimenes anamnēzē (4.3. tab).

4.3. tabula

Ģenētiskajā pētījumā iesaistītie melanomas pacienti

Melanomas pacientu raksturojums	Pacienti (n)	Pacienti (%)
Melanomas pacienti ar melanomu ģimenes anamnēzē:	20	8,8
3 un vairāk melanomas saslimšanas gadījumi ģimenē*	3	1,3
2 melanomas saslimšanas gadījumi, melanoma pirmās pakāpes radniekam	12	5,3
2 melanomas saslimšanas gadījumi ģimenē, melanoma attālākam radniekam	5	2,2
Melanomas pacienti ar aizkuņģa dziedzera audzēju ģimenes anamnēzē	7	3,7
Melanomas pacienti ar smadzeņu audzējiem ģimenes anamnēzē	9	3,9
Melanomas pacienti ar vairākām primārajām melanomām	3	1,3
Gados jauni melanomas pacienti (≤ 40 gadi)	46	20,2
Sporādiskās melanomas pacienti	143	62,7
Kopā	228	100

* viena no pētījumā iekļautajām ģimenēm ir aprakstīta jau iepriekš, šajā pētījumā šī ģimene tika noraksturota detalizētāk

4.2.2. Mutācijas augstas penetrances melanomas gēnos *CDKN2A* un *CDK4* pacientiem ar atkārtotiem audzējiem ģimenē

Mutācijas augstas penetrances melanomas gēnos *CDKN2A* un *CDK4* tika izanalizētas visiem 20 pacientiem ar atkārtotiem melanomas gadījumiem ģimenes anamnēzē. Ņemot vērā literatūras norādes par *CDKN2A* reģiona mutāciju saistību arī ar aizkuņģa dziedzera audzēju un smadzeņu audzēju attīstību [Goldstein *et al.*, 2004, de Snoo *et al.*, 2008], šajā grupā tika iekļauti arī 7 pacienti ar aizkuņģa dziedzera audzēju ģimenes anamnēzē un 9 pacienti ar CNS audzēju (8 galvas smadzeņu audzēji, 1 muguras smadzeņu audzējs) ģimenes anamnēzē, kopā 36 pacienti.

Visiem šajā grupā iekļautajiem pacientiem tika veikta *CDKN2A* gēna kodējošās daļas (1 α , 1 β , 2. un 3. eksoni) mutāciju analīze, kas ietvēra arī splaisa saitus un 3' netranslējamo reģionu. Tika izanalizētas arī mutācijas gēna *CDK4* 2. eksonā.

CDKN2A gēna kodējošās daļas un tai pieguļošo rajonu analīzē nevienam no analizētajiem pacientiem mutācijas gēnā *CDKN2A* netika konstatētas. Tika konstatēti trīs jau iepriekš literatūrā aprakstīti polimorfismi – c.442G>A (Ala148Thr) (rs3731249) gēna otrajā eksonā, c.*29G>C (rs11515) un c.*69C>T (rs3088440) - gēna 3' netranslētajā reģionā [Kumar *et al.*, 2001; Debniak *et al.*, 2005; Pjanova *et al.*, 2007].

Visiem 36 šajā grupā iekļautajiem pacientiem tika nosekvenēts arī gēna *CDK4* 2. eksons. Trīs pacientiem tika konstatēta gēna *CDK4* mutācija c.71G>A (R24H). Visiem trijiem pacientiem, kuriem tika atrasta gēna *CDK4* mutācija, bija izteikta melanomas ģimenes anamnēze. Visos trijos gadījumos ģimenes anamnēzē bija pa pieciem melanomas saslimšanas gadījumiem.

Pirmais pacients (M268), kuram tika atrasta gēna *CDK4* R24H mutācija, bija sieviete, kurai diagnosticētas divas primāras melanomas: viena uz augšdelma 33 gadu vecumā, otra – uz apakšstilba 75 gadu vecumā. Pirmās melanomas histoloģiskie apraksti nav saglabājušies. Otrā melanoma histoloģiski ir virspusēji augoša, bez izčūlojuma, pēc *Clark* - IV līmenis, audzēja biezums pēc *Breslow* – 1 mm. Datu par melanomas veidu, šūnu tipu un pigmenta klātbūtni histoloģiskajā aprakstā nav. Pacientei ir II ādas tips, brūni mati, brūna acu krāsa, multiplas dzimumzīmes. Laika posmā starp diviem melanomas gadījumiem, pacientei ir izoperētas divas bazālo šūnu karcinomas no sejas ādas. Pacientes ģimenē novēro vēl četrus melanomas gadījumus (4.5. att.). Vidējais melanomas diagnosticēšanas vecums ģimenē ir 39,5 gadi.

↗ - probands

M - mutācija R24H

WT - savvaļas tips

■ - melanoma

■ - bazālo šūnu karcinoma

33 g. - vecums primārās melanomas diagnozes uzstādīšanas brīdī,
veselām personām - vecums DNS testa veikšanas brīdī

4.5. att. Pacienta M268 ar mutāciju c. 71>A (R24H) gēnā *CDK4* ciltskoks un haplotipēšanas rezultāti

Ģenētiskajā analīzē tika iesaistīti arī pieci veselie ģimenes locekļi. Diviem no tiem tika atklāta gēna *CDK4* R24H mutācija – pacientes meitai un mazdēlam (meitas dēlam). Meitas vecums ģenētiskās testēšanas brīdī bija 44 gadi.

Otrais patients (M679), kuram tika atrasta *CDK4* R24H mutācija, bija vīrietis, kuram primārā melanoma diagnosticēta uz muguras 16 gadu vecumā. Veidojuma histoloģiskās izmeklēšanas informācija nav saglabājusies. Otrā primārā melanoma, kas izveidojās uz muguras ādas, izoperēta 40 gadu vecumā. Histoloģiski tā ir virspusēji augoša, epiteloīdo šūnu pigmentēta melanoma, bez izčūlojuma, *Clark* invāzijas līmenis – II, *Breslow* audzēja dziļums – 1 mm. Pacientam ir III ādas tips, tumši brūni mati, zilas acis, dažas dzimumzīmes. Pacienta ģimenē ir pieci melanomas saslimšanas gadījumi, kurus novēro trīs paaudzēs. Vidējais melanomas diagnosticēšanas vecums (balstoties uz diviem zināmajiem primārās melanomas diagnozes vecumiem) šajā ģimenē ir 29,5 gadi. Ģimenē pēc pacienta teiktā ar dažādiem audzējiem slimojuši vēl vairāki radinieki. Ģimenē novēro plaušu, kuņģa, nieru un krūts vēža gadījumus. Diviem ģimenes locekļiem ir bijusi perniciozā anēmija (4.6. att.).

Ģenētiskajā analīzē tika iesaistīti arī ģimenes locekļi, kuriem tika noteikta gēna *CDK4* mutācijas R24H klātbūtne. Arī šajā ģimenē tie bija tikai veselie ģimenes locekļi – pacienta māte un meita. Gēna *CDK4* mutācijas R24H tika atrasta arī pacienta meitai.

Trešajam pacientam (M247) gēna *CDK4* 2. eksona mutācija c.71G>A (R24H) bija atrasta jau iepriekš pētījumā, kurā analizēja *CDK4* gēna 2. eksonu visiem melanomas pacientiem, kuri piekrita ģenētiskajai analīzei laika posmā no 2001. līdz 2004. gadam [Pjanova *et al.*, 2007]. Minētajā darbā detalizēta ģimenes izpēte netika veikta. Tas bija viens no dotā darba uzdevumiem.

Ģenētiskā analīzē, līdzīgi kā iepriekšējās ģimenēs, tika iesaistīti arī ģimenes locekļi, kuriem tika noteikta gēna *CDK4* mutācijas R24H klātbūtne. Visi iesaistītie radinieki, līdzīgi kā iepriekš bija veselie ģimenes locekļi, – pacientes dēls un brālis. Veselajiem ģimenes locekļiem gēna *CDK4* R24H mutācija netika atrasta. Šajā ģimenē bija iespēja izanalizēt arī pacientes mātes melanomas audu paraugu no arhīva, kurā gēna *CDK4* R24H mutācija tika atrasta, tādējādi apstiprinot, ka gēna *CDK4* mutācijas tiek, vismaz šajā ģimenē, pārmantotas saistībā ar slimību.

Vidējais melanomas diagnosticēšanas vecums šajā ģimenē ir 43,8 gadi (4.7. att.).

4.5. att. Pacienta M679 ar mutāciju c. 71>A (R24H) gēnā *CDK4* ciltskoks

↗ - probands

M - mutācija R24H

WT - savvaļas tips

■ - melanoma

42 g. - vecums primārās melanomas diagnozes uzstādīšanas brīdī,
veselām personām - vecums DNS testa veikšanas brīdī

4.7. att. Pacienta M268 ar mutāciju c. 71>A (R24H) gēnā *CDK4* ciltskoks un haplotipēšanas rezultāti

Apkopojot augstāk aprakstītos melanomas pacientu ar gēna *CDK4* mutāciju fenotipiskos datus, vienīgā pazīme, kas ir kopīga gandrīz visiem šiem pacientiem, ir liels dzimumzīmju skaits. Pēc pārējiem fenotipiskajiem kritērijiem (ādas, matu un acu krāsas) šo triju ģimeņu melanomas pacienti neatbilst melanomas attīstības riska grupai (I ādas tips, gaiši/rudi mati, zilas/zaļas acis). Tikai vienam pacientam no trim ar gēna *CDK4* mutāciju bija I ādas tips. Līdzīga situācija ir arī ar pārējiem veselajiem *CDK4*

gēna mutācijas nēsātājiem. Viņiem galvenokārt ir brūni mati, acu krāsa variē no zaļas līdz brūnai. Arī salīdzinot vienas ģimenes locekļus ar un bez mutācijas gēnā *CDK4*, ievērojamas fenotipiskas atšķirības nekonstatē. Savukārt dzimumzīmju skaits ir liels ne tikai gēna *CDK4* mutācijas nēsātājiem, bet arī dažiem ģimenes locekļiem bez gēna *CDK4* mutācijas.

Līdzīgi, analizējot pacientu ar *CDK4* gēna mutāciju melanomas histoloģiskos aprakstus, nekādas likumsakarības nekonstatē. Pamatā tās ir pigmentētas epiteloīdšūnu melanomas, kas ir biežākais histoloģiskais variants arī sporādisku melanomu gadījumā.

Vienīgā pazīme, kas pacientus ar gēna *CDK4* mutāciju atšķir no citiem melanomas pacientiem, ir diagnozes uzstādīšanas vecums. Pacienti ar *CDK4* gēna mutāciju melanomas diagnozes uzstādīšanas brīdī vidēji ir jaunāki nekā pacienti ar sporādiskām melanomām. Vidējais vecums mūsu pētījumā analizētajiem pacientiem no *CDK4* gēna mutāciju pozitīvajām ģimenēm primārās melanomas atklāšanas brīdī ir 39,6 gadi, vecuma mediāna – 42 gadi. Turpretim sporādisko melanomu gadījuma, kā parādīts iepriekš, vidējais pacientu vecums ir 61,3 gadi, bet vecuma mediāna – 63,3 gadi.

Lai noskaidrotu gēna *CDK4* mutācijas izcelsmi, veikta reģiona haplotipēšana divās no aprakstītajām ģimenēm (M247 un M268). Haplotipēšanai izmantoja četrus mikrosatelītu marķierus (D12S305, CDK4M4, CDK4M1, D12S1691), kas ietver *CDK4* gēnu, trīs viena nukleotīdu nomaiņas *CDK4* gēnā (rs2270777, rs2069502, rs2069506), vienu nukleotīdu nomaiņu gēna promotera reģionā (rs2072052), kā arī nukleotīdu atkārtojumu gēna 5. intronā (4.5. un 4.6. att.). Latvijas ģimenēs ar gēna *CDK4* mutāciju c.71G>A (R24H) saistītais haplotips ir 113-194-*CDK4*-174-201, ja skatās pēc mikrosatelītu marķieriem, un TAG10G, ja skatās pēc nukleotīdu nomaiņām. Salīdzinot atrasto haplotipu ar *CDK4* reģiona haplotipiem citās ģimenēs, kurās ir atrasta gēna *CDK4* mutācija c.71G>A (R24H), redzams, ka atrastais haplotips atšķiras, proti, ir radies neatkarīgi no pārējiem (4.8. att.). Turklāt, ņemot vērā, ka ar mutāciju saistītais haplotips ir vienāds abās analizētajās ģimenēs, tas varētu norādīt uz iespējamu ciltstēva mutācijas klātbūtni Latvijas populācijā.

4.8. att. *CDK4* reģiona haplotipu salīdzinājums ģimenēs ar *CDK4* gēna mutāciju

4.2.3. Izmaiņas gēna *CDKN2A* promoterā un intronos pacientiem ar atkārtotiem audzējiem ģimenē

Ņemot vērā to, ka ģimenēs ar atkārtotiem melanomas saslimšanas gadījumiem tieši gēnā *CDKN2A* tiek atrasta lielākā daļa mutāciju, bet veiktajā gēna *CDKN2A* kodējošās daļas un tai pieguļošo sekvenču analīzē mutācijas minētajā gēnā atrastas netika, sekvenēja arī gēna *CDKN2A/p16* promotera reģionu un 1. un 2. intronus. Pavisam šajā analīzē tika iekļauti 20 pacienti: 10 ar melanomu, 4 ar aizkuņģa dziedzera audzēju un 6 ar smadzeņu audzēju pirmās pakāpes rados.

Gēna *CDKN2A* promoterā 20 analizētajiem pacientiem tika konstatēti 3 dažādi iepriekš aprakstīti polimorfismi - c.-191A>G, c.-493A>T un c.-735G>A [Harland *et al.*, 2000; Pollock *et al.*, 2001]. *CDKN2A* gēna 1. un 2. introni tika izanalizēti 17 pacientiem (trīs pacienti no analīzes tika izslēgti nepietiekamā DNS daudzuma dēļ). Intronu analīzē tika konstatēti septiņi dažādi polimorfismi – četri no tiem lokalizēti gēna 1. intronā un

trīs 2. intronā. Pieci (IVS1+459T>C, IVS1+1255C>A, IVS1-782G>C, IVS2+227A>G, IVS2+474T>C) no detektētajiem ir iepriekš aprakstīti polimorfismi, bet divi (IVS1+1569T>A un IVS2+82C>T) ir jauni, līdz šim neaprakstīti sekvenču varianti.

4.2.4. Delēcijas *CDKN2A* reģionā pacientiem ar atkārtotiem audzējiem ģimenē

Ņemot vērā, ka mutācijas *CDKN2A* gēnā ar sekvenēšanu neatrada, tika veikta arī *CDKN2A* lokusa delēciju analīze, izmantojot *MLPA* metodi. Analīzi veica tiem pašiem 17 pacientiem, kuriem tika analizēts gēna *CDKN2A* promotors un introni. Vienam no analizētajiem pacientiem atklāja 5 bāzu pāru garu delēciju zondē, kura lokalizēta gēna *CDKN2A p14^{ARF}* promotera reģionā – 1062 bp 5' virzienā no gēna *CDKN2A* eksona 1β starta kodona. Pēc datu normalizācijas iegūtā attiecība zondes absolūtajam fluorescentajam signālam pret references zonžu signāliem bija mazāka nekā 0,5 (0,44), kas norāda uz delēciju heterozigotiskā stāvoklī. Atrastā 5 bāzu pāru delēcija (c.-20676_- 20682delGTACG) *CDKN2A p14^{ARF}* promotera reģionā ir pirmais gadījums, kad tiek detektēta mutācija gēnā *CDKN2A* Latvijas melanomas pacientam ar atkārtotiem melanomas gadījumiem ģimenē.

Šis pacients ir sieviete, kurai melanoma diagnosticēta uz vēdera ādas 40 gadu vecumā. Pacientei ir I ādas tips, gaiši mati un zilas acis, daudz dzimumzīmju, kā arī *lentigo solaris* uz sejas un ķermeņa ādas. Histoloģiski melanoma ir pigmentēta, bez čūlošanas, *Breslow* dziļums – 10 mm, III līmenis pēc *Clark*. Pacientes ģimenē novēro vēl vienu saslimšanas gadījumu ar melanomu. Pacientes tēvam konstatēti divi audzēji – histoloģiski apstiprināta ādas melanomas diagnoze (vecums primārās diagnozes laikā – 78 gadi) un plaušu audzējs. Melanomas diagnosticēšanas vecums šajā ģimenē vidēji ir 59 gadi (4.9. att.).

4.2.5. Mutācijas augstas penetrances melanomas gēnos *CDKN2A* un *CDK4* pacientiem ar vairākām primārajām melanomām

Mutācijas gēna *CDKN2A* kodējošajā un tai piegulošajās daļās pacientiem ar multiplām primārām melanomām atrastas netika. Diviem pacientiem atklāja polimorfismu c.*69C>T (rs3088440) *CDKN2A* gēna 3' netranslētajā daļā. Līdzīgi, mutācijas netika atrastas arī gēna *CDK4* 2. eksonā.

A

↗ - probands

M - mutācija R24H

WT - savvaļas tips

■ - melanoma

■ - plaušu vēzis

40 g. - vecums primārās melanomas diagnozes uzstādīšanas brīdī

B

4.9. att. Pacienta ar detektēto delēciju gēna *CDKN2A/p14^{ARF}* promotera reģionā ģimenes ciltsskoks (A) un *MLPA* analīzes kvantitatīvie rezultāti gēna *CDKN2A/p14^{ARF}* promotera reģionā (B); uz x ass attēlotas *MLPA* kīta zondes, uz y ass attēlots relatīvā fluorescētā signāla stiprums

4.2.6. Mutācijas augstas penetrances melanomas gēnos *CDKN2A* un *CDK4* gados jauniem melanomas pacientiem

Atsevišķi tika analizēti 47 gados jauni pacienti ar melanomas diagnozi. Šajā grupā iekļauto pacientu vidējais vecums bija 32,9 gadi, mediāna 33 gadi. Mutācijas gēna *CDKN2A* kodējošajā daļā vai tai pieguļošajās sekvencēs netika atrastas. Tika konstatēti trīs jau iepriekšējās analīzēs atrastie polimorfismi – c.442G>A (Ala148Thr) (rs3731249) gēna otrajā eksonā, c.*29G>C (rs11515) un c.*69C>T (rs3088440) - gēna 3' netranslētajā daļā. Visiem 47 gados jauniem pacientiem tika nosekvenēts gēna *CDK4* 2. eksons. Mutācijas netika atrastas, izņemot vienu pacientu (M268), kurai primārā melanoma bija attīstījusies 33 gadu vecumā un kurai bija vēl 4 melanomas gadījumi ģimenē. Veiktās analīzes rezultāti ir aprakstīti augstāk.

4.2.7. *MC1R* gēna polimorfismi un to loma melanomas attīstībā

MC1R gēna polimorfismu analīze tika veikta 200 pacientiem ar melanomas diagnozi un pieejamu pilnu informāciju par viņu pigmentācijas fenotipu. Kontroles grupā bija iekļauti 200 praktiski veseli cilvēki, kuriem nav bijusi diagnosticēta ne melanoma, ne cita veida audzēji.

Kopumā 71% (284 no 400) analizēto personu tika atrasti 26 dažādi *MC1R* gēna polimorfismi. Polimorfismi tika atrasti 159 (79,5%) melanomas pacientiem un 125 (62,5%) kontroles personām. No atrastajiem 26 polimorfismiem 18 bija nesinonīmie, 7 sinonīmie un viena insercija (4.4. tab.). Divi no atrastajiem polimorfismiem tika detektēti pirmo reizi. Šie polimorfismi ir Val165Ileu (atrasts vienai kontroles personai) un Val188Ileu (atrasts vienam melanomas pacientam). Izmantojot programmu *PolyPhen-2*, tika pārbaudīta abu minēto polimorfismu prognozējamā ietekme uz receptora funkcijām. Šī analīze parādīja, ka gan Val165Ileu, gan Val188Ileu būtisku ietekmi uz receptora funkcionālo aktivitāti neatstāj.

Četri no atrastajiem nesinonīmajiem polimorfismiem (Val60Leu, Val92Met, Arg151Cys un Arg160Try) melanomas pacientiem bija sastopami biežāk nekā kontroles personām un šīs atšķirības bija statistiski ticamas, norādot, ka šie polimorfismi Latvijas populācijā ir saistīti ar paaugstinātu melanomas attīstības risku (4.4. tab.).

MC1R gēna polimorfismu biežumi melanomas pacientiem un kontroles personām

Nukleotīdu nomainā	Aminoskābes nomainā	Melanomas pacienti (n=200)		Kontroles personas (n=200)		OR	95% CI	p
		n	(%)	n	(%)			
Wt	-	41	(20,5)	75	(37,5)	1	reference	-
Nesinonīmie								
g.133T>C	Phe45Leu	0	(0)	1	(0,5)	-	-	-
g.178G>T	Val60Leu	23	(11,5)	12	(6,0)	3,51	1,58-7,76	0,001
g.248C>T	Ser83Leu	2	(1,0)	0	(0)	-	-	-
g.252C>A	Asp84Glu	1	(0,5)	0	(0)	-	-	-
g.265G>C	Gly89Arg	0	(0)	1	(0,5)	-	-	-
g.274G>A	Val92Met	51	(25,5)	34	(17,0)	2,74	1,54-4,89	<0,001
g.284C>T	Thr95Met	1	(0,5)	0	(0)	-	-	-
g.363C>G	Asp121Glu	1	(0,5)	1	(0,5)	1,83	0,11-30,02	0,668
g.425G>A	Arg142His	8	(4,0)	8	(4,0)	1,83	0,64-5,23	0,255
g.451C>T	Arg151Cys	35	(17,5)	14	(7,0)	4,57	2,21-9,47	<0,001
g.456C>A	Tyr152X	1	(0,5)	0	(0)	-	-	-
g.464T>C	Ile155Thr	13	(6,5)	14	(7,0)	1,70	0,73-3,96	0,216
g.478C>T	Arg160Try	49	(24,5)	35	(17,5)	2,56	1,44-4,56	0,001
g.488G>A	Arg163Gln	16	(8,0)	15	(7,5)	1,95	0,88-4,35	0,099
g.493G>A	Val165Ileu	0	(0)	1	(0,5)	-	-	-
g.550G>C	Asp184His	0	(0)	1	(0,5)	-	-	-
g.562G>A	Val188Ileu	1	(0,5)	0	(0)	-	-	-
g.637C>T	Arg213Try	0	(0)	1	(0,5)	-	-	-
Sinonīmie								
g.399C>T	Cys133Cys	1	(0,5)	0	(0)	-	-	-
g.453C>G	Arg151Arg	1	(0,5)	0	(0)	-	-	-
g.498G>A	Ala166Ala	1	(0,5)	0	(0)	-	-	-
g.699G>A	Gln233Gln	2	(1,0)	2	(1,0)	1,83	0,25-13,47	0,548
g.819C>T	Cys273Cys	0	(0)	1	(0,5)	-	-	-
g.942A>G	Thr314Thr	64	(32,0)	53	(26,5)	2,21	1,30-3,74	0,003
g.948C>T	Ser316Ser	7	(3,5)	7	(3,5)	1,83	0,60-5,58	0,283
Insercija								
g.496insG	ins166	0	(0)	1	(0,5)	-	-	-

p – ticamības vērtība , OR – izredžu attiecība, CI – ticamības intervāls, Wt –savvaļas tips

Tika veikta sakarības pārbaude starp polimorfismu skaitu vienai personai un melanomas attīstības risku, kas parādīja, ka melanomas risks pieaug līdz ar polimorfismu skaitu palielināšanos. Viena nesinonīmā polimorfisma klātbūtne melanomas risku paaugstina gandrīz divas reizes (OR=1,98; 95% CI 1,26-3,11; p=0,003), kamēr divi un vairāk polimorfismi risku paaugstina jau gandrīz četras reizes (OR=3,98; 95% CI 2,14-7,38; p<0,001).

Sadalot *MC1R* gēna polimorfismus grupās atkarībā no to saistības ar tā dēvēto RHC “*red hair colour*” (rudās matu krāsas) fenotipu, vislielākais risks saslimt ar melanomu ir cilvēkiem, kuriem ir divi RHC polimorfismi (OR = 7,15; 95 % CI: 0,78-65,84, p=0,045). Augsts risks ir arī cilvēkiem, kuriem ir divi NRHC polimorfismi (OR= 4,17; 95 % CI: 1,50-11,57, p=0,004), vai viens RHC un viens NRHC polimorfisms (OR= 3,69; 95 % CI: 1,81-7,53, p<0.001) (4.5. tab.)

Tā kā *MC1R* gēna polimorfismiem ir parādīta saistība ar personas pigmentācijas fenotipu, proti, matu un acu krāsu, ka arī ādas tipu, tad pētījuma nākamajā posmā tika pārbaudīta septiņu biežāk sastopamo *MC1R* gēna polimorfismu (Val60Leu, Val92Met, Arg142His, Arg151Cys, Ile155Thr, Arg160Try, Arg163Gln) saistība ar pigmentācijas fenotipu kontroles personās. Kontroles personas tika sadalītas grupās atbilstoši to pigmentācijas fenotipam, attiecīgi rudi/gaiši un brūni/melni mati, zilas/pelēkas un zaļas/brūnas/citas krāsas acis, I/II un III/IV ādas tips, daudz/daži un maz/neviens vasaras raibumi un daudz/dažas un maz/nevienas dzimumzīmes.

4.5. tabula

RHC un NRHC polimorfismu saistība ar melanomas risku

<i>MC1R</i> polimorfismi	Melanomas pacienti (n=200)		Kontroles personas (n=200)		OR	95% CI	p
	n	(%)	n	(%)			
WT	47	(23,5)	84	(42,0)	1	reference	-
1 RHC variants	46	(23,0)	32	(16,0)	2,57	1,45-4,57	<0,001
2 RHC varianti	4	(2,0)	1	(0,5)	7,15	0,78-65,84	0,045
1 NRHC variants	58	(29,0)	62	(31,0)	1,67	1,01-2,77	<0,046
2 NRHC varianti	14	(7,0)	6	(3,0)	4,17	1,50-11,57	0,004
1 RHC un 1 NRHC variants	31	(15,5)	15	(7,5)	3,69	1,81-7,53	<0,001

RHC polimorfismi: D84E, R151C, R160W; NRHC - pārējie nesinonīmie polimorfismi

Saistību ar rudu/gaišu matu krāsu, I/II ādas tipu un palielinātu vasaras raibumu daudzumu uzrāda polimorfismi Val92Met, Arg151Cys un Arg160Try. Polimorfismi Val60Leu un Ile155Thr uzrāda saistību ar ādas tipu un vasaras raibumiem, savukārt polimorfisms Arg142His tikai ar matu krāsu. Ietekmes uz pigmentācijas fenotipu nav

polimorfismam Arg163Gln. Līdzīgi, *MC1R* gēna polimorfismi nav saistīti arī ar dzimumzīmju skaitu un acu krāsu.

Līdzīgi kā kontroles personas iepriekš, arī melanomas pacienti tika sadalīti grupās atbilstoši to pigmentācijas fenotipam. Pēc stratificēšanas polimorfismu ietekme uz melanomas attīstības risku saglabājas tikai nosacīti zema riska fenotipa grupās, proti, cilvēkiem ar tumšiem matiem, III/IV ādas tipu un maz vasaras raibumiem. Turklāt, līdzīgi kā iepriekš, saglabājas saistība starp polimorfismu skaitu un melanomas attīstības riska pakāpi. Cilvēkiem ar tumšiem matiem vismaz viena polimorfisma klātbūtne melanomas risku paaugstina vairāk nekā divas reizes (OR=2,70; 95% CI 1,49-4,88; $p<0,001$). Arī cilvēkiem ar III vai IV ādas tipu vismaz viena polimorfisma klātbūtne melanomas risku paaugstina vairāk nekā divas reizes (OR=2,80; 95% CI 1,64-4,78; $p<0,001$) un tas pats ir novērojams arī cilvēkiem ar nelielu vasaras raibumu daudzumu (OR=2,61; 95% CI 1,61-4,21; $p<0,001$). Turklāt visās trīs minētajās grupās divu polimorfismu klātbūtne risku paaugstina gandrīz divas reizes vairāk nekā tad, ja cilvēkam ir tikai viens polimorfisms. Savukārt dzimumzīmju un acu krāsas gadījumos līdzīgas sakarības nenovēro.

Grupējot *MC1R* gēna polimorfismus RHC un NRHC polimorfismos, iegūti līdzīgi rezultāti. Personām ar tumšiem matiem melanomas risks paaugstinās apmēram divas reizes gan gadījumā, ja cilvēkam ir NRHC polimorfismi (OR=2,53; 95% CI 1,31-4,88; $p=0,005$), gan gadījumā, ja cilvēkam ir RHC polimorfismi (OR=2,26; 95% CI 0,96-5,30; $p=0,059$). RHC polimorfismu gadījumā rezultāti gan nerasniedz statistiskās ticamības līmeni, bet ir tuvu tam. Melanomas risks ir visaugstākais, ja cilvēkam ir gan RHC, gan NRHC polimorfismi (OR=4,70; 95% CI 1,65-13,38; $p=0,002$). Savukārt cilvēkiem ar III un IV ādas tipu melanomas risku visvairāk paaugstina tieši RHC polimorfismi (OR=3,39; 95% CI 1,66-6,94; $p<0,001$). Līdzīgi melanomas risku vairāk nekā 3 reizes paaugstina arī RHC polimorfisma kombinācija ar NRHC polimorfismu (OR=3,25; 95% CI 1,32-8,01; $p=0,008$). Vienīgi NRHC polimorfismu gadījumā risks ir nedaudz zemāks (OR=2,44; 95% CI 1,35-4,44; $p=0,003$). Līdzīga situācija ir vērojama arī cilvēkiem ar nelielu vasaras raibumu daudzumu, tikai šajā gadījumā vislielākais risks ir personām ar RHC un NRHC polimorfismu kombināciju (OR=3,26; 95% CI 1,39-7,65; $p=0,005$), kam seko RHC polimorfismi (OR=3,16; 95% CI 1,65-6,05; $p<0,001$) un NRHC polimorfismi (OR=2,23; 95% CI 1,30-3,82; $p=0,003$). Tāpat kā iepriekš līdzīgas sakarības dzimumzīmju un acu krāsas gadījumos nenovēro.

5. DISKUSIJA

Šajā pētījumā apkopotie RAKUS LOC arhīva dati likumsakarīgi parādīja melanomas incidences pieaugumu no 1998. līdz 2008. gadam. Vairāku citu autoru pētījumi uzrāda nedaudz mazākus melanomas pacientu vidējos vecumus – no 53,7 līdz 59 gadiem [Geller *et al.*, 2002, Ferrari *et al.*, 2008, Biau *et al.*, 2007, Chamberlain *et al.*, 2003]. Vidējais dotā pētījuma pacientu vecums bija 61,3 gadi, kas ir nedaudz vairāk nekā citās valstīs. Iespējams, tas ir saistīts ar Latvijas ģeogrāfisko lokalizāciju un klimatiskajiem apstākļiem, kā arī ar to, ka mūsu pacienti pie ārsta vēršas vēlāk, nekā vidēji citās valstīs, kas izskaidro arī sliktākus audzēja histoloģiskos prognostiskos rādītājus. Gandrīz divas trešdaļas no pētījumā analizētajiem pacientiem bija sievietes. Konkrētais pētījums uzrādīja labākus dzīvildzes rādītājus sievietēm, neskatoties uz to, ka vidējais vecums melanomas diagnozes uzstādīšanas brīdī sievietēm bija lielāks nekā vīriešiem. Līdzīgi kā citās valstīs, arī Latvijā biežākā audzēja lokalizācija vīriešiem bija rumpis, bet sievietēm – kājas. Vairākās publikācijās tiek ziņots, ka vīriešiem biežāka lokalizācija ir arī galva un kakls [Lipsker *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2010], bet mūsu pētījums to neapstiprina. Galvas un kakla lokalizācijas melanomas pieaug pacientu vecuma grupā pēc 63 gadiem, kas atbilst arī citu autoru pētījumu rezultātiem. Vairākos ārzemju pētījumos pierādīta korelācija starp melanomas prognozi un anatomisko audzēja lokalizāciju, atklājot, ka galvas, kakla un rumpja melanoma raksturojas ar sliktāku prognozi nekā ekstremitāšu jaunveidojumi [Kienstra *et al.*, 2005; Zettersten *et al.*, 2003]. Šajā pētījumā audzēja lokalizācijai statistiski ticamas nozīmes nebija, vienīgi vīriešiem ar melanomu uz ekstremitātēm prognoze bija sliktāka nekā sievietēm ar tās pašas lokalizācijas audzēju. Pētījumā tikai 0,5% gadījumu pacientiem bija attīstījušās vairākas primāras melanomas, kas ir ļoti zems rādītājs salīdzinot ar citiem pētījumiem, kas sniedz informāciju par multiplām primārajām melanomām (no 0,5 līdz 8.6%) [Bower *et al.*, 2010; Titus-Ernstof *et al.*, 2006; Levi *et al.*, 2005; Goggins *et al.*, 2003, Ferrone *et al.*, 2005; Nashan *et al.*, 2003]. Virspusējas izplatības melanoma ir visbiežākais ādas melanomas histoloģiskais apakštips [Garbe *et al.*, 2009; Payette *et al.*, 2009; Arora *et al.*, 2009; Lens *et al.*, 2004]. Mūsu pētījums uzrādīja nodulāro audzēju pārsvaru, kas nosaka sliktākus dzīvildzes rādītājus, salīdzinot ar virspusēji augošu melanomu.

Pētījuma rezultāti liecina, ka pārliecinoši augstāki dzīvildzes rādītāji ir pacientiem bez audzēja izčūlojuma. Pieaugot melanomas *Breslow* biezumam, slimības

prognoze pasliktinās, kas sakrīt ar citu autoru datiem un apstiprina to, ka *Breslow* biezums ir viens no svarīgākajiem melanomas prognostiskajiem faktoriem [Markovic *et al.*, 2007]. Audzēja *Breslow* biezuma rādītāji Latvijā ir samazinājušies laika posmā no 1998. līdz 2008. gadam, bet tie joprojām ir ievērojami augstāki, nekā citās Eiropas valstīs, kur vidējais melanomas *Breslow* biezums svārstās no 0.8 – 2.24 mm [Liang *et al.*, 2010; Linos *et al.*, 2009, Barbe *et al.*, 2011]. Dotā pētījuma rezultāti liecina, ka pārliecinoši augstāki dzīvildzes rādītāji ir pacientiem bez audzēja izčūlojuma.

Amelanotiskās melanomas sastādīja 9,6% no visām pētījumā analizētajām melanomām, kas ir nedaudz augstāks rādītājs nekā citu autoru ziņojumos (no 1,8 līdz 8,1%) [Gualandri *et al.*, 2009; Juliano *et al.*, 1982].

Nodulāro, biezo audzēju un audzēju ar izčūlojumu skaits mūsu pētījumā pieaug vecākiem pacientiem pēc 63 gadu vecuma, kas ir raksturīgi arī citām populācijām [Balch *et al.*, 2001]. Šajā vecuma grupā pieaug arī amelanotisko melanomu skaits.

Līdzīgi kā citās valstīs, arī mūsu pētījums apstiprina, ka biežākais melanomas šūnu tips ir epiteloīdās šūnas. Melanomas šūnu veida ietekme uz dzīvildzes rādītājiem netika konstatēta.

Ādas melanoma Latvijā tiek joprojām diagnosticēta vēlīnās stadijās. Tas varētu būt saistīts ar to ka, pirmkārt, melanomas skrīnings nav obligāta vispārpieņemta procedūra klīnikās un bieži pat dermatologa kabinetā pacients netiek apskatīts no galvas līdz kājām. Otrkārt, neskatoties uz to, ka iedzīvotāji pēdējā laikā nepārtraukti tiek izglītoti par pirmajām vizuālajām melanomas pazīmēm, daļa pacientu izturas nevērīgi pret aizdomīgiem veidojumiem un, iespējams, baidās vērsties pie ārsta. Treškārt, nedrīkst aizmirst par nodulārajām melanomām, kurām raksturīga agresīva un strauja attīstība.

Neskatoties uz ilgstošiem pētījumiem, molekulārie mehānismi, kas noved pie melanomas attīstības, vēl joprojām ir izprasti tikai daļēji. Lielākā daļa melanomas saslimšanas gadījumu ir sporādiski, taču apmēram desmitajā daļā visu saslimšanas gadījumu melanomu novēro kā pārmantotu ģenētisku slimību [de Snoo *et al.*, 2005]. Galvenais līdz šim identificētais melanomas augstas penetrances gēns, kurā visbiežāk (20 - 40% gadījumu) konstatētas mutācijas pārmantotās melanomas gadījumā, ir gēns *CDKN2A* [Hansen *et al.*, 2004]. Latvijā gēna *CDKN2A* analīzē līdz šim konstatēti polimorfismi, kuriem nav pierādīta saistība ar melanomas attīstību (c.-33G>C; c.442G>A (Ala148Thr); c.*29G>C; c.*69C>T), bet mutācijas, kuras saistītas ar slimības predispozīciju, nav atrastas [Pjanova *et al.*, 2003, 2006, 2007]. Ņemot vērā

minētos negatīvos rezultātus, šajā darbā pacientiem ar melanomu ģimenes vēsturē papildus gēna kodējošajai daļai tika izanalizēti arī gēna promoters un introni. Pasaulē šajos reģionos ir atrastas mutācijas, kuras saistītas ar melanomas predispozīciju, bet šo reģionu izmaiņu analīze Latvijas melanomas pacientiem līdz šim nebija veikta. Latvijā melanomas pacientiem slimība ģimenes vēsturē konstatēta salīdzinoši nelielam cilvēku skaitam (8,8% gadījumu). Turklāt ģimenes ar trīs un vairāk melanomas saslimšanas gadījumiem (kas ir visspēcīgākā parmantotās melanomas pazīme) līdz šim Latvijā ir konstatētas tikai trīs un sastāda tikai vienu procentu no visiem šajā pētījumā iesaistītajiem pacientiem.

Līdzīgi kā līdz šim, pētījumā iesaistītajiem pacientiem ar melanomu, aizkuņģa dziedzera vai CNS audzēju ģimenes anamnēzē mutācijas *CDKN2A* gēna kodējošā daļā atrastas netika. *CDKN2A* gēna mutācijas netika atrastas arī pacientiem ar multiplām primārām melanomām un gados jauniem melanomas pacientiem.

Tā kā mutācijas gēna *CDKN2A* kodējošā daļā atrast neizdevās, bet gēns *CDKN2A* ir tieši tas gēns, kurā visbiežāk atrod mutācijas, pētījumā iesaistītajiem pacientiem ar melanomu, aizkuņģa dziedzera un smadzeņu audzējiem ģimenes anamnēzē tika veikta gēna *CDKN2A/p16^{INK4a}* 863 bp garā promotera kritiskā reģiona analīze. Arī šajā analīzē tika konstatēti vienīgi trīs dažādi polimorfismi – c.-191A>G, c.-493A>T, c.-735G>A. kas iepriekš aprakstīti citu autoru pētījumos [Harland *et al.*, 2000; Pollock *et al.*, 2001; Bisio *et al.*, 2010] un parādīts, ka atšķirības starp alēļu frekvencēm melanomas un kontroles pacientiem nav būtiskas [Harland *et al.*, 2000], kas liecina par to, ka tiem nav saistības ar melanomas attīstību. Bez promotera analīzes šiem pacientiem tika veikta arī gēna *CDKN2A* 1. un 2. introna analīze. Divi no septiņiem konstatētajiem polimorfismiem (IVS1+1569T>A; IVS2+82C>T) ir jauni sekvenču varianti, kuri iepriekš nav aprakstīti. Intronus līdz šim citu autoru darbos detektētās mutācijas, kas saistītas ar melanomas attīstību ietekmē pareizu splaisinga norisi. Šajā darbā atklātie jaunie sekvenču varianti neatrodas kanoniskajos splaisa donora vai akceptora saitos intronu un eksonu robežpunktos, kā tas ir ar lielāko daļu līdz šim detektēto intronos sastopamo mutāciju, piemēram, IVS2+1G>T [Loo *et al.*, 2003], c.147A>C [Loo *et al.*, 2003], D153spl(c.457G>T) [Rutter *et al.*, 2003] un IVS1-1G>C [Petronzelli *et al.*, 2001]. Pārbaudot abiem jaunajiem sekvenču variantiem pieguļošās DNS secības, neatklājās arī izmaiņas rezultātā radies splaisa saits, kas visdrīzāk nozīmē, ka abas šīs

izmaiņas, visdrīzak, ir polimorfismi, un būtiskas ietekmes uz melanomas attīstību tām nav.

Pasaulē atsevišķās melanomas ģimenēs ir atklātas arī lielas delēcijas, kuras nav iespējams konstatēt ar tiešas sekvenēšanas palīdzību. Tāpēc ar *MLPA* metodes palīdzību šajā darbā tika analizēts lokuss *9p21*, kurā atrodas gēns *CDKN2A*. Veiktajā analizē tika atklāts viens pacients ar delēciju zondē, kura lokalizēta gēna *CDKN2A/p14^{ARF}* promotera reģionā. Tas ir pirmais gadījums, kad melanomas pacientam Latvijā konstatēta mutācija gēnā *CDKN2A*. Atrastā 5 bāzu pāru delēcija nelīdzinās iepriekš aprakstītajām delēcijām, kuras ietver šo reģionu, jo ir salīdzinoši neliela. Pasaulē līdz šim konstatētās delēcijas, kuras ietver šo reģionu, ir ļoti lielas un stiepjas vairāku kilobāzu pāru garumā [Mistry *et al.*, 2005; Randerson-Moor *et al.*, 2001; Bahuau *et al.*, 1997; Pasmant *et al.*, 2007; Laud *et al.*, 2006]. Gēna *CDKN2A/p14^{ARF}* promotera reģions satur vairākas potenciālas transkripcijas faktoru saistīšanās vietas. Tomēr uz jautājumu, kāda ir konkrētās atrastās delēcijas ietekme uz proteīna p14^{ARF} ekspresiju, iespējams atbildēt tikai veicot funkcionālos pētījumus, kas nebija šī darba mērķis. Tāpat pārliedzinoši atbildēt uz jautājumu, vai atrastā delēcija ir saistīta ar melanomas pārmantošanos analizētajā ģimenē ir grūti, jo tās segregāciju ar slimību nebija iespējams pārbaudīt, jo pacienta tēvs, kuram arī bija diagnosticēta melanoma ir miris.

Otrs melanomas augstas penetrances gēns, kas līdz šim identificēts, ir gēns *CDK4*. Ģimenes, kurās melanoma pārmantojas saistībā ar mutācijām šajā gēnā, fenotipiski neatšķiras no tām, kurās atrod mutācijas gēnā *CDKN2A* [Goldstein *et al.*, 2000]. Tomēr mutācijas šajā gēnā ir ārkārtīgi reti sastopamas – kopā līdz šim aprakstītas tikai 10 ģimenes visā pasaulē ar mutāciju šajā gēnā. Mutācijas gēnā *CDK4* līdz šim konstatētas tikai 24. kodonā, kas lokalizēts gēna 2. eksonā. Latvijā kopā ir atklātas trīs ģimenes ar gēna *CDK4* mutāciju R24H. Visas trīs ģimenes ir raksturotas arī dotā darba ietvaros. Tas ir nozīmīgs atklājums, ņemot vērā nelielo *CDK4* mutācijas pozitīvo ģimeņu skaitu visā pasaulē.

Vidējais vecums dotajā pētījuma visiem analizētajiem pacientiem ar gēna *CDK4* mutāciju R24H primārās melanomas atklāšanas brīdī ir 39,6 gadi un vecuma mediāna 42 gadi. Salīdzinot to ar vidējo vecumu (61,3 gadi un mediāna 63,4 gadi) pacientu grupā, kuri ārstējušies RAKUS LOC no 1998. līdz 2008. gadam un kuriem pārsvarā bija sporādiskas melanomas, vai ar vidējo vecumu (52,6 gadi un mediāna 54,0 gadi) pacientu grupā, kuriem tika izanalizēts *MC1R* gēns un kuriem arī pārsvarā bija

sporādiskas melanomas, redzams, ka melanoma gēna *CDK4* R24H mutācijas nēsātājiem attīstās un tiek atklāta ievērojami agrāk nekā sporādisko melanomu gadījumā. Savukārt, salīdzinot savā starpā ģimenes ar *CDK4* gēna mutācijām, vidējais saslimšanas vecums (39,6 gadi) un mediāna (42 gadi) Latvijas ģimenēs ir nedaudz lielāki nekā ASV atklāto *CDK4* pozitīvo ģimeņu gadījumā (34 gadi) [Goldstein *et al.*, 2000], bet līdzīgi, kā Norvēģijas ģimenē – 41 gads [Molven *et al.*, 2005]. Tas varētu būt saistīts ar līdzīgajiem klimatiskajiem apstākļiem Latvijā un Norvēģijā vai atšķirībām zemas jutības modificētāģēnos [Hayward, 2003]. Latvijā ir arī mazāks vidējais ādas melanomu skaits trijās ģimenēs visiem ar melanomu slimiem *CDK4* gēna mutācijas nēsātājiem (1,6), kas ir mazāk nekā Norvēģijas ģimenē (2,2) un Amerikas ģimenēs (2,4) [Molven *et al.*, 2005]. Mūsu ģimenēs ir salīdzinoši mazāks arī melanomas gadījumu skaits, iespējams, informācijas trūkuma dēļ par pārējiem ģimenes locekļiem. Ģimeņu haplotipu analīze parādīja, ka divām atrastajām Latvijas melanomas ģimenēm ar gēna *CDK4* R24H mutāciju varētu būt kopīgs attāls sencis, turklāt atšķirīgs no pārējām ģimenēm ar gēna *CDK4* R24H mutāciju. Iespējams, ka *CDK4* gēna mutācija R24H ir ciltstēva mutācija Latvijas populācijā.

Iegūtie rezultāti kopumā liecina par to, ka Latvijas ģimenēs ar diviem melanomas saslimšanas gadījumiem melanomas pārmantojamība lielākoties nevar tikt izskaidrota ar mutācijām zināmajos melanomas augsta riska gēnos *CDKN2A* un *CDK4*. Tikai vienam no analizētajiem pacientiem ar diviem melanomas saslimšanas gadījumiem ģimenē gēnā *CDKN2A* atrasta izmaiņa, kas varētu būt potenciāli ar slimību saistīta mutācija. Līdz ar to pastāv iespēja, ka Latvijā pārsvarā novērotie melanomas saslimšanas gadījumi ģimenēs ar diviem saslimšanas gadījumiem ir sporādiskas izcelsmes. Par to liecina arī šo pacientu klīniskais raksturojums, kas būtiski neatšķiras no sporādiskās melanomas pacientu raksturojuma. Šāds skaidrojums gan ir tikai daļēji ticams, ņemot vērā kopumā zemo melanomas saslimšanas gadījumu skaitu Latvijā. Iespējams arī, ka mutācijas to nesējiem fenotipā neizpaužas, ņemot vērā to, ka Latvijā nav augsts UV starojuma līmenis, kas ir viens no galvenajiem apkārtējās vides mutagēnajiem faktoriem, kas paaugstina mutāciju penetranci. Šāds skaidrojums saskanētu ar parādīto sakarību, ka gēna *CDKN2A* mutāciju penetrance ir augstākā reģionos ar lielāku UV starojuma līmeni, piemēram, Austrālijā un ASV [Bishop *et al.*, 2002]. Vēl viens iespējamais skaidrojums ir mutācijas citos, piemēram, *MC1R* gēnā vai līdz šim neidentificētos melanomas jutības gēnos. Atbildi par to, kur būtu meklējami citi

gēni, kuru mutācijām būtu līdzīga segregācija melanomas ģimenēs kā gēnā *CDKN2A*, pēdējos gados daudzi autori cenšas gūt, veicot genoma plašu asociāciju pētījumus jeb *GWAS* (*Genome wide association studies*). Lielākais šāda veida līdz šim veiktais pētījums starptautiskā melanomas ģenētikas konsorcijs *GenoMEL* ietvaros būtisku jaunu informāciju par lokusiem, kuros meklēt melanomas jutības gēnus, nav devis. Tajā spēcīgāko saistību ar melanomas attīstību parādījuši jau iepriekš zināmi lokusi, kuri ir biežāk sastopami, bet to kopējais risks slimības attīstībai zemāks [Bishop *et al.*, 2009]. Šie rezultāti arī liecina par to, ka, iespējams, citu gēnam *CDKN2A* līdzīgu melanomas augstas penetrances gēnu nemaz nav, bet ģenētisko predispozīciju veido vairāku zemāka riska savstarpēji mijiedarbojošos gēnu kopums.

Ņemot vērā to, ka mutācijas gēnos *CDKN2A* un *CDK4* ir sastopamas galvenokārt tikai ģimenēs ar atkārtotiem saslimšanas gadījumiem un populācijā kopumā ir salīdzinoši ļoti retas [Berwick *et al.*, 2006], darbā kā zemākas penetrances melanomas gēns tika analizēts arī *MC1R* gēns. Ir zināms, ka *MC1R* gēns ir ļoti polimorfs, un arī dotajā pētījumā tika atrasti 26 dažādi gēna polimorfismi, no kuriem četri - Val60Leu, Val92Met, Arg151Cys un Arg160Try, bija saistīti ar paaugstinātu melanomas attīstības risku Latvijas populācijā un risks to nēsātājiem pieauga 2-4 reizes. Turklāt lielāks risks bija personām ar tumšiem matiem un III/IV ādas tipu.

Melanomas pacientiem polimorfismi bija sastopami biežāk nekā kontroles personām - attiecīgi 76,5% un 58,0% gadījumu. Līdzīgs polimorfismu procentuālais sadalījums starp pacientiem un kontrolēm ir arī Zviedrijā [Gerstenblith *et al.*, 2007] un Itālijā [Fargnoli *et al.*, 2008]. Arī Vācijā līdzīgi kā Latvijā *MC1R* gēna polimorfismi ir sastopami 76% pacientu, taču atšķirībā no Latvijas arī 67% kontroles personu [Scherer *et al.*, 2009]. Savukārt, Polijā un Spānijā *MC1R* gēna polimorfismi ir sastopami retāk gan pacientiem, gan kontrolēm, attiecīgi 51% un 45% Polijā [Brudnik *et al.*, 2008], un 66% un 52% Spānijā [Scherer *et al.*, 2009]. Minētie fakti liecina par *MC1R* gēna atšķirīgo lomu dažādās populācijās.

Ņemot vērā nesinonīmo polimorfismu skaitu uz vienu indivīdu, Latvijas populācijā tikai polimorfismu klātbūtne vien melanomas risku paaugstina vairāk nekā divas reizes (OR=2,36; 95% CI=1,53-3,63; p<0,001). Turklāt divu un vairāk polimorfismu klātbūtne melanomas risku palielina divas reizes vairāk nekā tas ir tikai viena polimorfisma gadījumā (OR=1,98; 95% CI=1,26-3,11; p=0,003 un OR=3,98; 95% CI=2,14-7,38; p<0,001). Līdzīgas tendences, melanomas riskam paaugstināties,

palielinoties indivīda polimorfismu skaitam, ir novērotas arī citās populācijās, piemēram, Izraēlas [Galore-Haskel *et al.*, 2009], kā arī Vācijas un Spānijas [Scherer *et al.*, 2009] populācijās.

Melanomas gadījumā, kā arī citu onkoloģisku slimību gadījumā, kur loma ir ģenētiskajiem faktoriem, ļoti būtiska ir pacienta ģimenes anamnēze. Ja pacients atzīmē melanomas gadījumus ģimenē, būtu vērtīgi šādu informāciju dokumentēt ciltskoka veidā, kas atvieglotu informācijas par slimības izplatību ģimenē uztveršanu un apkopošanu. Pacienti ar melanomu ģimenes anamnēzē būtu jākonsultējas ar ģenētiķi, kas nepieciešamības gadījumā varētu piedāvāt ģenētisko izmeklēšanu. Personas, kurām būtu ieteicams veikt ģenētisko testēšanu ir: a) melanomas pacienti, kuru pirmās pakāpes radiniekiem ir bijusi melanoma; b) melanomas pacienti, kuru radinieku vidū ir divi un vairāk saslimšanas gadījumi; c) personas, kuru radinieku vidū ir trīs un vairāk saslimšanas gadījumi.

Dažās valstīs pašlaik tiek piedāvāta gēna *CDKN2A* variantu ģenētiskā testēšana melanomas pacientiem, piemēram, populācijās ar bieži sastopamām ciltstēva mutācijām. Negatīva testa rezultāta gadījumā pārbaudītajām personām pagaidām tas var būt maldīgs atvieglojums, ņemot vērā to, ka lielākā daļa ģenētisko riska faktoru vēl joprojām nav izprasti. Latvijā jautājums par gēna *CDKN2A* variantu ieteikšanu ģenētiskajai testēšanai vēl joprojām ir diskutabls, ņemot vērā to, ka, atšķirībā no citām valstīm, Latvijā *CDKN2A* gēna mutācijas nav tik raksturīgas. Unikāls ir novērojums, ka visās trijās Latvijas populācijā atklātajās pārmantotās melanomas ģimenēs ar trim vai vairāk saslimšanas gadījumiem ģimenes anamnēzē atrastas ārkārtīgi retās mutācijas gēnā *CDK4*. Atšķirībā no citām populācijām, Latvijas melanomas pacientiem ar potenciālu ģenētisku predispozīciju noteikti būtu jāpārbauda mutācijas p.R24H klātbūtne gēnā *CDK4*. Mutācijas nesējiem risks saslimt ar melanomu ir augsts, līdz ar to tās ģenētiskā testēšana būtu praktiski lietderīga arī no profilaktiskā viedokļa. *MC1R* gēns ir ārkārtīgi polimorfs un tā variantu analīze pagaidām nevar sniegt informāciju, kas būtu nozīmīga melanomas riska izvērtēšanā. Tāpēc, runājot par ģenētisko testēšanu personām ar melanomu ģimenes anamnēzē, mērķa gēni varētu būt *CDKN2A* un *CDK4*. Metodika ģenētiskā testa veikšanai attiecībā uz gēniem *CDKN2A* (1α, 1β un 2. eksons) un *CDK4* (2. eksons) ir izstrādāta un iekļauta Genoma centra piedāvāto analīžu sarakstā. Ņemot vērā to, ka melanomas incidence arvien pieaug, un melanoma var būt

arī ģenētiski predisponēta, gan pacienti, gan ārsti būtu jāinformē par ģenētiskās izmeklēšanas iespējām atkārtotu melanomas gadījumu ģimenes anamnēzē gadījumā.

Ņemot vērā melanomas incidences rādītāju pieaugumu Latvijā, cilvēki ir jāizglīto par melanomas bīstamību, tās attīstības iespējamajiem cēloņiem, izskatu, pašizmeklēšanās nozīmīgumu un ādas veidojumu pārbaūžu (dermatoskopijas) iespējām. Īpaši jāuzsver pārmērīgas sauļošanās, solāriju apmeklējumu un saules apdegumu ietekme uz melanomas attīstību, jo intermitējoša atrašanās spēcīgā saulē, kā arī spēcīgi ādas saules apdegumi, īpaši līdz 20 gadu vecumam, ir galvenie riska faktori sporādiskas melanomas attīstībā [Gandini *et al.*, 2005; Bishop *et al.*, 2002]. Personām ar *CDKN2A* vai *CDK4* gēna mutācijām no kumulatīvām saules devām būtu jāsaņem visu mūžu [Bishop *et al.*, 2002].

Izārstēšanās iespējas ir lielākas, ja ādas melanoma tiek atklāta un izoperēta agrīnās stadijās. Liela daļa melanomu ir virspusēji augošas, kurām sākotnēji raksturīga radiālā augšanas fāze. Personas ar paaugstinātu melanomas attīstības risku (pacienti vai personas ar vairākiem melanomas un aizkuņģa dzidzera vai CNS audzēju gadījumiem ģimenē, tai skaitā personas no gēnu *CDKN2A* vai *CDK4* mutāciju pozitīvām ģimenēm, pacienti ar multiplām primārām melanomām, gados jauni melanomas pacienti, personas ar atipisko dzimumzīmju sindromu un melanomu ģimenes anamnēzē) jāapmāca pašizmeklēties, laicīgi atpazīt dzimumzīmes izmaiņas un pamanīt jauna veidojuma parādīšanos. Paaugstināta melanomas riska personām ir nepieciešamas regulāras profilaktiskas pārbaudes pie dermatologa, atkarībā no anamnēzes un dzimumzīmju veida, 1 - 4 reizes gadā [Marsden *et al.*, 2010]. Ir jāveic dzimumzīmju dermatoskopiskā izmeklēšana, to digitālo attēlu saglabāšana un analīze atkārtotu vizīšu laikā.

6. SECINĀJUMI

- 1.1. Laika posmā no 1998. līdz 2008. gadam melanomas incidence RAKUS LOC pieauga no 3,3 gadījumiem uz 100 000 iedzīvotāju 1998. gadā līdz 5,4 2008. gadā ($p=0.003$).
- 1.2. Melanomas pacientu vidū dominēja sievietes, veidojot attiecību sievietes pret vīriešiem 1:0,54; biežākā melanomas lokalizācija sievietēm bija kājas, vīriešiem rumpis.
- 1.3. Vidējais melanomas pacientu vecums bija 61,3 gadi.
- 1.4. Raksturīgākais audzēja veids bija nodulāra melanoma ar izčūlojumu un vidējo *Breslow* dziļumu 6,0 mm; laika gaitā audzēja *Breslow* dziļums samazinājās, bet joprojām saglabājās salīdzinoši liels.
- 2.1. Sievietēm, salīdzinot ar vīriešiem, ir labāka dzīvildze ($HR=1.4$; $95\%CI=1.1-1.7$; $p=0.0018$).
- 2.2. Dzīvildzes rādītāji korelē ar *Breslow* audzēja biezumu ($p<0.001$) un ir sliktāki nodulāru melanomu un čūlojošu melanomu gadījumos.
- 3.1. Latvijā pārmantotu melanomu konstatē 8,8% gadījumu; ģimenes ar trīs un vairāk saslimšanas gadījumiem ir retas un ir sastopamas tikai 1% gadījumu.
- 4.1. Gēna *CDK4* 2. eksonā konstatēta mutācija c.71G>A (R24H) trijiem pacientiem ar pārmantotu melanomu; ar mutāciju saistītais haplotips pēc mikrosatelītu marķieriem un viena nukleotīda nomaiņām visās trijās ģimenēs ir vienāds, attiecīgi 113-194-*CDK4*-174-201 un TAGG-10, kas liecina par iespējamu ciltstēva mutāciju Latvijas populācijā.
- 4.2. *CDKN2A* analizē, kas iekļāva gan eksonus, gan gēna *CDKN2A/p16* promoteru un intronus, mutācijas netika atrastas.
- 4.3. Atrasta 5 bāzu pāru delēcija (c.-20676_- 20682delGTACG) gēna *CDKN2A/p14^{ARF}* promotera reģionā, kas ir pirmais gadījums, kad Latvijā detektētā mutācija *CDKN2A* lokusā.
- 5.1. Latvijas populācijā atrasti 26 dažādi *MC1R* gēna polimorfismi. Individuāli Latvijas populācijā vislielāko saistību ar melanomu uzrādīja *MC1R* gēna polimorfisms Arg151Cys ($OR=4,57$; $95\% CI 2,21-9,47$; $p<0,001$), tam sekoja polimorfismi Val60Leu ($OR=3,51$; $95\% CI 1,58-7,76$; $p=0,001$), Val92Met ($OR=2,74$; $95\% CI 1,54-4,89$; $p<0,001$) un Arg160Try ($OR=2,56$; $95\% CI 1,44-4,56$; $p=0,001$).

- 5.2. Melanomas risks ir atkarīgs no personas *MC1R* gēna polimorfīmu skaita – viena nesinonīmā polimorfisma klātbūtne melanomas risku paaugstina nedaudz vairāk kā divas reizes (OR=2,36; 95% CI 1,53-3,63; $p<0,001$), savukārt divu nesinonīmo polimorfismu klātbūtne jau gandrīz četras reizes (OR=3,98; 95% CI 2,14-7,38; $p<0,001$).
- 5.3. Personām ar tumšiem matiem, III/IV ādas tipu un bez vasaras raibumiem *MC1R* gēna polimorfismu klātbūtne ir saistīta ar paaugstinātu melanomas attīstības risku, savukārt personām ar gaišiem matiem, I/II ādas tipu un ar vasaras raibumiem *MC1R* gēna polimorfismi nav saistīti ar paaugstinātu risku.

7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods* 2010; 7: 248-249.
2. Arora A., Attwood J. Common Skin Cancers and Their Precursors. *Surgical Clinics of North America* 2009; 89: 703–712.
3. Balch C.M., Soong S.J., Gershenwald J.E., et al. 2001. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001; 19:3622–3634.
4. Balch C. M., Buzaid A. C. Soong S. J. et al. Final version of the American Joint Committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19:3635-3648.
5. Barbe C., Hibon E., et al. Clinical and pathological characteristics of melanoma: a population based study in a French regional population. *JEADV* 2011; 26:159-164.
6. Berwick M., Orlow I., Hummer A., et al. The prevalence of CDKN2A germ-line mutations and relative risk for cutaneous malignant melanoma: an international population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Aug;15(8):1520-5.
7. Biau D.J., Latouche A., Porcher R. Competing events influence estimated survival probability: when is Kaplan-Meier analysis appropriate? *Clin Orthop Relat Res* 2007; 462:229-33.
8. Bisio A., Nasti S., Jordan J. J., et al. Functional analysis of CDKN2A/p16INK4a 5'-UTR variants predisposing to melanoma. *Hum Mol Genet.* 2010 Apr 15; 19(8):1479-91.
9. Bishop D. T., Demenais F., Goldstein A. M., et al. Geographical variation in the penetrance of *CDKN2A* mutations for melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002; 94(12): 894-903.
10. Bishop D.T., Demenais F., Iles M.M., et al. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nature Genetics* 2009; 41: 920-928.
11. Box N. F., Duffy D. L., Chen W., Stark M., Martin N. G., Sturm R. A., Hayward N. K. MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *The American Journal of Human Genetics* 2001; 69: 765-773.
12. Bricca G.M., Brodland D. G., Ren D. et al. Cutaneous head and neck melanoma treated with Mohs micrographic surgery. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2005; 52: 92-100.
13. Brown K. M., Macgregor S., Montgomery G. W., et al. Common sequence variants on 20q11.22 confer melanoma susceptibility. *Nat Genet.* 2008; 40(7): 838-840.
14. Brudnik U., Branicki W., Wojas-Pelc A., Kanas P. The contribution of melanocortin 1 receptor gene polymorphisms and the agouti signalling protein gene 8818A>G

- polymorphism to cutaneous melanoma and basal cell carcinoma in a Polish population. *Experimental Dermatology* 2008; 18: 167-174.
15. Carlson G. W., Murray D. R., Hestley A., et al. Sentinel lymph node mapping for thick ($>$ or $=$ 4-mm) melanoma: should we be doing it? *Ann Surg Oncol.* 2003; 10:408–415.
 16. Casula M., Muggiano A., Cossu A., et al. Role of key-regulator genes in melanoma susceptibility and pathogenesis among patients from South Italy. *BMC Cancer* 2009; 9.
 17. Chamberlain A. J., Fritschi L., Kelly J. W. Nodular melanoma: Patients' perceptions of presenting features and implications for earlier detection. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48:694-701.
 18. Debniak T., Scott R. J., Huzarski T., et al. CDKN2A common variants and their association with melanoma risk: a population-based study. *Cancer Res.* 2005 Feb 1; 65(3):835-9.
 19. Debniak T., Scott R., Masojc B., et al. MC1R common variants, CDKN2A and their association with melanoma and breast cancer risk. *International Journal of Cancer* 2006; 119: 2597-2602.
 20. De Snoo F. A. Bishop D. T., Bergman W., et al. Increased risk of cancer other than melanoma in CDKN2A founder mutation (p16-Leiden) – positive melanoma families. *Clin Cancer Res* 2008; 14(21):7151-7157.
 21. den Dunnen J. T., Antonarakis S. E. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Human Genetics* 2001; 109: 121-124.
 22. Duffy D.L., Box N.F., Wei Chen, et al. Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes. *Human Molecular Genetics* 2004; 13: 447-461.
 23. Fargnoli M.C., Spica T., Sera F., Pelleciani G., Chiarugi A., Seidenari S., Carli P., Chimenti S., Peris K. Re: MC1R, ASIP, and DNA Repair in Sporadic and Familial Melanoma in a Mediterranean Population. *Journal of the National Cancer Institute* 2006; 98: 144-145.
 24. Fargnoli M.C., Pike K., Pfeiffer R.M., et al. MC1R variants increase risk of melanomas harboring BRAF mutations. *The Journal of Investigative Dermatology* 2008; 128: 2485-2490.
 25. Ferrone C. R., Ben Porat L., Panageas K. S. et al. Clinicopathological features of and risk factors for multiple primary melanomas. *JAMA* 2005;294:1647-1654.
 26. Galore-Haskel G., Azizi E., Mohamdi H., et al. MC1R variant alleles and malignant melanoma risk in Israel. *European Journal of Cancer*;2009. 45: 2015 - 2022.

27. Gandini S., Sera F., Cattaruzza M. S et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma:III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 2005 Sep;41(14):2040-2059.
28. Garbe C., Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in Dermatology* 2009;27:3-9.
29. Geller A. C., Miller D. R., Annas G. D., et al. Melanoma incidence and mortality among US whites, 1969-1999. *JAMA*. Oct 9 2002; 288(14):1719-1720.
30. Gerstenblith M.R., Goldstein A.M., Fargnoli M.C., et al. Comprehensive evaluation of allele frequency differences of MC1R variants across populations. *Human Mutation* 2007; 28: 495-505.
31. Gerstenblith M.R., Shi J., Landi M.T. Genome-wide association studies of pigmentation and skin cancer: a review and meta-analysis. *Pigment Cell & Melanoma Research* 2010; 23: 587-606.
32. Goggins W. B., Tsao H. A population-based analysis of risk factors for a second primary cutaneous melanoma among melanoma survivors. *Cancer* 2003;97:639-43.
33. Goldstein A. M., Struwing J. P., Chidambaram A., et al. Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. *Journal of the National Cancer Institute* 2000; 92(12): 1006 – 1010.
34. Goldstein A.M., Landi M.T., Tsang S., et al. Association of MC1R variants and risk of melanoma in melanoma-prone families with CDKN2A mutations. - *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2005;14: 2208-2212.
35. Goldstein A.M. Familial melanoma, pancreatic cancer and germline CDKN2A mutations. *Hum Mutat* 2004; 23:360.
36. Han J., Kraft P., Colditz G.A., et al. Melanocortin 1 receptor variants and skin cancer risk. - *International Journal of Cancer* 2006; 119: 1976-1984.
37. Hansen C.B., Wadge L.M., Lowstuter K., et al. Clinical germline genetic testing for melanoma. *The Lancet Oncology* 2004; 5(5): 314–319.
38. Harland M., Holland E.A., Ghiorzo P., et al. Mutation screening of the CDKN2A promoter in melanoma families. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28(1):45-57.
39. Hayward N.K. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene*. 2003 May 19; 22(20):3053-62.
40. Juliano A.E., Cohran A.J., Moerton D.L. Melanoma from unknown primary site and amelanotic melanoma. *Sem Oncol* 1982; 9:442-447.
41. Kanetsky P.A., Rebbeck T.R., Hummer A.J., et al. Genes Environment and Melanoma Study Group. Population-Based Study of Natural Variation in the Melanocortin-1 Receptor Gene and Melanoma. *Cancer Research* 2006; 66: 9330-9337.
42. Kienstra M. A. Head and Neck Melanoma. *Cancer Control* 2005;12(4): 242-247

43. Kumar R., Smeds J., Berggren P., et al. A single nucleotide polymorphism in the 3'untranslated region of the CDKN2A gene is common in sporadic primary melanomas but mutations in the CDKN2B, CDKN2C, CDK4 and p53 genes are rare. *Int J Cancer* 2001 Nov 20; 95(6):388-93.
44. Lens M.B., Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2004; 150: 179–185.
45. Levi F., Randimbison L., Te V.C., La Vacehia C. High constant incidence rates of second cutaneous melanomas. *Int J Cancer* 2005;117:877-9.
46. Liang J. J, Robinson E., Martin R. C. Cutaneous melanom in New Zeland: 2000-2004. *ANZ J Surg* 2010; 80:312-316.
47. Linos E., Swetter S. M., Cockburn M. G., et al. Increasing burden of melanoma in the United States. 2009 Jul; 129(7):1666-74.
48. Lipsker D., Engel F., Cribier B. et al. Trends in melanoma epidemiology suggest three different types of melanoma. *Br. J. Dermatol.* 2007; 157:338-43.
49. Markovic S.N., Erckson L.A., Rao R.D., et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 2:staging, prognosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2007; 82(4):490-513.
50. Marsden J.R., Newton-Bishop J.A., Burrows L., et al. Revised U.K. Guidelines for the Management of Cutaneous Melanoma 2010. *British Journal of Dermatology* 2010; 163(2):238-256.
51. Martin R., Robinson E. Cutaneous melanoma in Caucasian New Zealanders: 1995-1999. *Ast. N.Z.J.Surg.* 2004; 74:233-7.
52. Mistry S.H.,Taylor C., Randerson-Moor J. A., et al. Prevalence of 9p21 deletions in UK melanoma families. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2005 November; 44(3): 292–300.
53. Molven A., Grimstvedt M. B., Steine S.J., et al. A large Norwegian family with inherited malignant melanoma, multiple atypical nevi, and *CDK4* mutation. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(1): 10-18.
54. Nashan D., Kocer B., Schiller M. et al. Significant risk of a second melanoma in patints with a history of melanoma but no further predisposing factors. *Dermatology* 2003;206:76-7.
55. Pasmant E., Laurendeau I., Héron D. et al. Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer Research* 2007; 67(8): 3963 – 3969.
56. Payette M. J., Katz M., Grant-Kels J. M. Melanoma prognostic factors found in the dermatopathology report. *Clinics in Dermatology* 2009;27:53-74.

57. Petronzelli F., Sollima D., Coppola G., et al. CDKN2A germline splicing mutation affecting both p16(ink4) and p14(arf) RNA processing in a melanoma/neurofibroma kindred. *Cancer* 2001 Aug; 31(4):398-401.
58. Pjanova D., Heisele O., Engele L., et al. Tumour suppressor gene CDKN2A/p16 germline mutations in melanoma patients with additional cancer and cancer in their family history. *Acta Universitatis Latviensis* 2003; 662: 25 – 32.
59. Pjanova D., Heisele O., Engele L., et al. Analysis of Latvian melanoma families for *9p21* germline deletions by the multiplex ligation-dependent probe amplification approach. *Acta Universitatis Latviensis* 2006; 710: 7–16.
60. Pjanova D., Engele L., Randerson-Moor J.A., et al. CDKN2A and CDK4 variants in Latvian melanoma patients: analysis of a clinic-based population. *Melanoma research* 2007; 17(3): 185–191.
61. Pollock P.M., Stark M.S., Palmer J.M., et al. Mutation analysis of the CDKN2A promoter in Australian melanoma families. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001 Sep; 32(1):89-94.
62. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., et al. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *American Journal of Human Genetics* 2007; 81: 559-575.
63. Randerson-Moor J. A., Harland M., Williams S., et al. A germline deletion of p14(ARF) but not CDKN2A in a melanoma-neural system tumour syndrome family. *Human Molecular Genetics* 2001; 10(1): 55 – 62.
64. Rutter J. L., Goldstein A. M., Dávila M. R., et al. CDKN2A point mutations D153spl(c.457G>T) and IVS2+1G>T result in aberrant splice products affecting both p16INK4a and p14ARF. *Oncogene* 2003; 22(28): 4444 – 4448.
65. Scherer D., Nagore E., Bermejo J.L., Figl A., et al. Melanocortin receptor 1 variants and melanoma risk: A study of 2 European populations. - *International Journal of Cancer* 2009.; 125: 1868-1875.
66. Spector, P. Data manipulation with R. *Use R!* 2008; New York, Springer:103.
67. Titus- Ernstof L., Perry A. E., Spencer S. K., et al. Multiple primary melanoma: two year results from a population-based study. *Arch Dermatol* 2006; 142:433-8.
68. Zettersten E., Sagebiel R.W., Miller J.R. 3rd et al. Prognostic factors in primary cutaneous melanoma. *Surgical Clinics of North America* 2003; 83: 61–75.

8. ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS

1. Pjanova D, **Azarjana K**, Čēma I. Genetic alteration in melanoma development. *Proc. Latvian Acad. Sci. Section B*, 2009; 63(3): 73-81.
2. Pjanova D, Molven A, Akslen LA, Streinerte B, Engele L, **Azarjana K**, and Heisele O. Identification of a CDK4 R24H mutation-positive melanoma family by analysis of early-onset melanoma patients in Latvia. *Melanoma Research*, 2009; 19:119-122.
3. A. Ķempele, **K. Azarjana**, I. Čēma, D. Pjanova, A. Rivošs. Galvas un kakla lokalizācijas melanomas gadījumu raksturojums Latvijā. *RSU Zinātniskie raksti*, 2010; 1:313-319.
4. **K. Azarjana**, D. Pjanova, I. Čēma. Ādas ļaundabīgās melanomas jutības gēni. *RSU Zinātniskie raksti*, 2010; 2:175-182.
5. Berzina A, **Azarjana K**, Pjanova D, Cema I, Rivosh A. Prognostic factors and Epidemiological Characteristics of Cutaneous and Mucosal Head and Neck Melanoma. *Stomatologija – Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, 2011; 2:49-54.
6. **Azarjana K**, Ozola A, Ruklisa D, Cema I, Rivosh A, Azaryan A, and Pjanova D. Melanoma epidemiology, prognosis, and trends in Latvia. *Journal of European Association of Dermatology and Venereology*. (Submitted: JEADV-2012-0565).

9. ZIŅOJUMI PAR DARBA REZULTĀTIEM

Mutiskie referāti

1. **K. Azarjana**, D.Pjanova, O.Heisele. Assessment of the nevus phenotype in melanoma kindreds from Latvia. *GenoMEL Annual Meeting*. Paris, France. 09.-12.06.2008.
2. A. Ozola, **K. Azarjana**, L. Enģele, B. Štreinerte, I. Čēma un D. Pjanova. Melanokortīna 1. receptora gēna polimorfismi un melanoma. *LU 68. Zinātniskā konference*. Rīga, Latvija. 05.02.2010.
3. **K. Azarjana**, A. Ozola, O. Heisele, I. Cema, D. Pjanova. Susceptibility genes analyses in head and neck melanoma. *7th Congress of Baltic Association of Maxillofacial and Plastic Surgery*. Riga, Latvia. 20-22.05.2010.
4. R. Veinalde, **K. Azarjana**, O. Heisele, D. Pjanova. p14/ARF promoter deletion in Latvian melanoma family. *GenoMEL Annual Meeting*. Tel Aviv, Israel. 03 – 05.10.2011.
5. **K. Azarjana**, R. Veinalde, O. Heisele, D. Pjanova. Identification of a third CDK4 R24H mutation positive melanoma family in Latvia. *Perspectives in Melanoma XV*. New York, USA. 16 – 17.09.2011.

Tēzes

1. D. Pjanova, O. Heisele, **K. Azarjana**, L. Enģele, B. Štreinerte. Assessment of the nevus phenotype in CDK4 mutation positive melanoma kindreds from Latvia. *17th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology*. Paris, France. 17-21.09.2008.
2. **K. Azarjana**, I. Čēma, L.Enģele, B. Štreinerte, O. Heisele, D. Pjanova. Cutaneous melanoma: epidemiological study. 3rd world meeting of interdisciplinary melanoma/skin cancer centers. Berlin, Germany. 19-21.11.2009.
3. **K. Azarjana**, I. Čēma, A. Kempele, A Rivosch, D. Pjanova. Cutaneous malignanat melanoma in Latvia – the study of Latvian Cancer registry data of incidence and mortality rates. *19th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology*, Gothenburg, Sweden. 06.10. – 10.10.2010.

4. **K. Azarjana**, A. Ozola, D. Pjanova, I. Čēma, R. Kleina, L. Enģele, B. Štreinerte un O. Heisele. *CDKN2A, CDK4, MC1R* gēnu izmaiņas melanomas pacientiem ar melanomas, aizkuņģa dziedzera vai smadzeņu audzēja saslimšanas gadījumiem ģimenēs Latvijā. *RSU 2010.g. Zinātniskā konference*. Rīga, Latvija. 18.-19.03.2010.
5. A. Ķempele, **K. Azarjana**, I. Čēma, D. Pjanova. Galvas un kakla lokalizācijas primārās ādas melanomas prognostiskie faktori. *RSU 2010.g. Zinātniskā konference*. Rīga, Latvija. 18.-19.03.2010.
6. R. Kleina, D. Pjanova, **K. Azarjana**, I. Čēma, O. Heisele. Dažādas lokalizācijas ādas melanomu morfometrisks novērtējums. *RSU 2010.g. Zinātniskā konference*. Rīga, Latvija. 18.-19.03.2010.
7. D. Pjanova, A. Ozola, **K. Azarjana**, O. Heisele, L. Enģele, B. Streinerte, R. Kleina, I. Cema. *CDKN2A, CDK4, and MC1R* gene mutations in melanoma patients in Latvia. 5th Baltic Congress of Oncology, Riga, 14-15.05.2010.
8. A. Kempele, **K. Azarjana**, I. Cema, A. Rivosh, D. Pjanova. Cutaneous and mucosal head and neck melanoma: an apidemiological study. *6th Congress of European Association of Dermatologic Oncology*. Athens, Greece. 16-19.06.2010
9. D., Ozola A., **Azarjana K.**, Donina S., Proboka G., Cema I., Heisele O., Streinerte B., Enģele L.. *MC1R* gene polymorphisms increase the risk of cutaneous malignant melanoma in Latvia independently of skin type and hair color. *7th Congress of European Association of Dermato-Oncology*. Nantes, France. 20-23.07.2011.
10. **Azarjana K.**, Ozola A., Donina S., Proboka G., Cema I., Heisele O., Streinerte B., Enģele L., and Pjanova D. *MC1R* gene polymorphisms and clinical and pathological features of melanoma in Latvia. *20th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology*. Lisboa, Portugal. 20-24.10.2011.