



**LATVIJAS
UNIVERSITĀTE**

**Promocijas darba
kopsavilkums**

**Summary
of Doctoral Thesis**

Tatjana Zablocka

**KLĪNISKO, HISTOPATOĻĪSKO
UN ĢENĒTISKO RĀDĪTĀJU
NOVĒRTĒJUMS UN TO SAISTĪBA AR
BEZRECIDĪVA PERIODU ĀDAS
MELANOMAS PACIENTIEM AGRĪNĀ STADIJĀ**

**THE COMPARATIVE STUDY OF CLINICAL,
HISTOPATHOLOGICAL AND GENETIC
CHARACTERISTICS AND ITS VALUE IN
PROGRESSION-FREE SURVIVAL IN PATIENTS WITH
EARLY-STAGE CUTANEOUS MELANOMA**

Rīga 2024



LATVIJAS UNIVERSITĀTE

MEDICĪNAS FAKULTĀTE, PATOLOĢIJAS KATEDRA

Tatjana Zablocka

KLĪNISKO, HISTOPATOĢISKO 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.

NACIONĀLAIS
ATTĪSTĪBAS
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA

Eiropas Sociālais
fonds

I E G U L D Ī J U M S T A V Ā N Ā K O T N Ē

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 kopa – starptautiski citētas zinātniskas publikācijas medicīnas bāzes zinātnēs, tai skaitā farmācijā, patoloģijas apakšnozarē.

Darba vadītāji:

profesors *Dr. med.* **Sergejs Isajevs**, Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedra;
vadošā pētniece *Dr. biol.* **Dace Pjanova**, Latvijas Biomedicīnas studiju un pētījumu centrs

Zinātniskie recenzenti:

- 1) asoc. profesors *Dr. med.* **Jānis Eglītis**, LU Medicīnas fakultātes Onkoloģijas katedra, Rīga, Latvija;
- 2) emeritētā profesore *Dr. med.* **Regīna Kleina**, Rīgas Stradiņa universitāte, Rīga, Latvija;
- 3) profesore *Dr. habil. med.* **Anna Szumera-Cieckiewicz**, Patoloģijas un laboratorijas medicīnas katedra, Marijas Sklodovskas-Kirī Valsts Onkoloģijas pētniecības institūts, Varšava, Polija

Promocijas darbs tiks aizstāvēts Latvijas Universitātes Medicīnas un veselības zinātņu nozares promocijas padomes atklātā sēdē 2024. gada 23. februārī Latvijas Universitātē, Dabas mājā, Jelgavas ielā 1, *Magnum* auditorijā (106).

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

Latvijas Universitātes Medicīnas un veselības zinātņu nozares
promocijas padomes priekšsēdētājs: prof. **Valdis Pīrāgs**
promocijas padomes sekretāre: asoc. prof. **Līga Plakane**

© Tatjana Zablocka, 2024

© Latvijas Universitāte, 2024

ISBN 978-9934-36-196-8

ISBN 978-9934-36-197-5 (PDF)

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 audzēju 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 biežums, solārā elastoze, čūlojums, regresija, limfovaskulārā invāzija, mitožu skaits, audzēja infiltrējoši limfocīti (*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 (nerezecējama III vai IV stadijas slimība un ļoti ieteicama augsta riska rezicējamas 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.

SATURA RĀDĪTĀJS

ANOTĀCIJA	3
ABREVIATŪRAS	6
VISPĀRĪGS PĀRSKATS	7
Pētījuma mērķis	10
Darba uzdevumi	10
Darba hipotēze	10
Pētījums novitāte	11
Metožu pārskats	11
Ar darbu saistīti zinātniskie projekti	11
Publikācijas par promocijas darba tēmu	11
1. TEORĒTISKAIS PAMATOJUMS	14
1.1. Melnomas histopatoloģiskais novērtējums	16
1.2. Audzēju infiltrējošie limfocīti melanomas progresēšanas riska stratifikācijai	17
1.3. <i>BRAF</i> gēna mutācijas novērtējums melanomas progresēšanas riska stratifikācijai	18
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	22
2.5. Audzēju infiltrējošo limfocītu novērtēšana un vērtēšana ar punktiem ...	22
2.6. <i>BRAF</i> un <i>NRAS</i> mutāciju novērtēšana	22
2.7. NGS testēšana	23
2.8. Statistiskā analīze	24

3. REZULTĀTI	25
3.1. Klīniskais raksturojums	25
3.2. Histopatoloģiskās īpašības	25
3.3. TIL pacientiem ar nodulāru un virspusēji augošu melanomu.....	26
3.4. <i>BRAF</i> mutācijas statuss un korelācija ar klīniski patoloģiskiem rādītājiem.....	28
3.5. <i>NRAS</i> mutācijas statuss un saistība ar klīniski patoloģiskiem rādītājiem.	29
3.6. Ģenētiskās mutācijas melanomā, izmantojot paneļa sekvencēšanu (nepublicēti dati)	30
3.7. <i>TERT</i> mutācijas statuss un tā saistība ar klīniski patoloģiskiem rādītājiem.....	30
3.8. Histopatoloģiskā un <i>BRAF</i> , <i>NRAS</i> un <i>TERT</i> mutāciju statusa nozīme attiecībā uz bezrecidīva periodu.....	31
4. DISKUSIJA	35
5. SECINĀJUMI	41
PATEICĪBAS	43
LITERATŪRAS SARAKSTS	86

ABREVIATŪRAS

- AJCC – Amerikas Apvienotā vēža komiteja (*American Joint Committee on Cancer*)
- BRAF* – B-Raf protoonkogēns
- CAP – Amerikas Patologu biedrība (*College of American Pathologists*)
- DNS – deoksiribonukleīnskābe
- ESMO – Eiropas Medicīniskās onkoloģijas biedrība (*European Society for Medical Oncology*)
- HGVS – Cilvēka genoma variāciju biedrība (*Human Genome Variation Society*)
- HPF – Lielā palielinājuma lauks (*High-power field*)
- KSK – kumulatīvais saules starojuma bojājums (*CSD, cumulative sun damage*)
- LVI – limfovaskulāra invāzija
- MAPK – mitogēnu aktivētā proteīnkināze
- NCCN – ādas melanomas tīkls (*National Comprehensive Cancer Network*)
- NF-1 – Neurofibromīns-1
- NGS – nākamās paaudzes sekvencēšana (*Next Generation Sequencing*)
- NRAS* – Neuroblastomas RAS vīrusa onkogēna homologs
- PVO – Pasaules Veselības organizācija
- SLN – sardzes limfmezgls
- SS – Sangerā sekvencēšana
- TERT* – Telomerāzes reversā transkriptāze
- TIL* – audzēja infiltrējošie limfocīti (*Tumor-infiltrating lymphocytes*)
- UV – ultravioletais starojums
- WES – visa eksoma sekvencēšana (*Whole Exome Sequencing*)
- WGS – visa genoma sekvencēšana (*Whole Genome Sequencing*)

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 biomarkķieru 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 saukta stipra KSK melanomai. Desmoplastiskā melanoma ir saistīta ar palielinātu solāro elastozi. Visbiežāk sastopamais stipra KSK melanomas apakštīps 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 apakštīpi var apgrūtināt diagnostiku (Shellenberger *et al.*, 2016).

Tāpēc īpaši svarīgi ir noteikt agrīnas stadijas melanomas biomarkķierus, lai prognozētu melanomas klīnisko uzvedību. Ir pierādīts, ka tādi klīniski patoloģiskie rādītāji kā audzēja izmērs, audzēja tips, audzēja invazitāte (Breslova biezums, Klārka līmenis, limfovaskulāra invāzija, neirotropisms), izčūlojums, 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 audzēja infiltrējošie limfocīti 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 biomarķieru novērtēšana arvien biežāk tiek izmantota klīniskajā praksē melanomas diagnostikā, personalizētā ārstēšanā un prognozēšanā. Turklāt mūsdienu ārstēšanas vadlīnijās galvenā uzmanība pievērsta melanomas ģenētisko biomarķieru 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 (rezicējamu vai nerezicējamu), 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 signālnīnāzēm. *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 (Taylor *et al.*, 2007; Raaijmakers *et al.*, 2016).

Parasti *NRAS* mutācijas ir neatkarīgas no *BRAF* mutācijām, taču ir ziņots par dubulto ekspresiju (Taylor *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 sekvenčēšanu (*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, Sangerā sekvenčēšana (SS), reālā laika *PCR*, augstas izšķirtspējas kušanas analīze, ar peptīdu nukleīnskābes (*PNA*) starpniecību veikta reālā laika *PCR*, digitālā *PCR*, pirosekvenčēšana 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 formalinā fiksētiem un parafinā iegulātiem (*FFPE*) *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) audiem (Scolyer *et al.*, 2018).

Nākamās paaudzes sekvenčēšanas (*NGS*) tehnoloģijas ieviešana ir revolūcionizējusi izpratni par audzēja bioloģiju un uzlabojusi personalizētas ārstēšanas stratēģijas attiecībā uz daudziem un dažādiem cilvēku audzēja veidiem, tostarp melanomu. *NGS* mērķtiecīgas gēnu sekvenčēšanas paneļu izstrāde un izmantošana var būt pievilcīga metode slimnīcās un klīnikās, jo ar to 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 (Dogan, *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 vai 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 biezums, 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, 7–8 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 (Shellenberger *et al.*, 2016). 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 epigenētiskās 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 medicīnā, gan sociālajā jomā. Meklējot instrumentus un/vai diagnostikas rīkus, kas spēj atklāt audzējus 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 starpnovērtotāju 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 starojuma bojājumu (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 *Špica* tipa, akrālās, gļotādas un uveālās melanomās, kā arī melanomās, kas rodas iedzimtos un zilos nēvusos. Visbeidzot, nodulārajai melanomai ir raksturīga agrīna pāreja uz vertikālu augšanu (Shellenberger *et al.*, 2016).

Melanomas attīstība ir cieši saistīta ar somatiskām un epiģenētiskām izmaiņām. Melanomas patoģenēzē un evolūcijā ir aprakstītas dažādas mutācijas. Jaunākajā genomu klasifikācijā melanoma iedalīta četros apakštipos, pamatojoties uz visbiežāk sastopamo nozīmīgi mutēto gēnu struktūru: mutētais *BRAF*, *RAS*, *NFI* 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 ciklinēnkarīgā 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 naturālās killera (NK) 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 personalizēta ārstēšana (Havel *et al.*, 2019; Ribas *et al.*, 2015).

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

Ir pierādīts, ka tādi klīniski histopatoloģiskie rādītāji kā audzēja izmērs, audzēja tips, audzēja invazivitāte (Breslova biežums, Klārka invāzijas līmenis,

limfovaskulārā invāzija, neirotropisms), izčūlojums, 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 audzēju infiltrējošie limfocīti 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 apakštipus, 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 apakštips un KSK ādā (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). Tiek vērtēti tādi kritēriji kā audzēja tips, izčūlojums, audzēju infiltrējošie limfocīti (*TIL*), Klārka invāzijas līmenis, Breslova biezums, limfovaskulārā invāzija, neirotropisms, regresija, mitotiskā aktivitāte. Turklāt tiek novērtētas ekscizijas līnijas un attālumus no audzēja. Pamatojoties uz histopatoloģisko novērtējumu, novērtē pTNM stadiju (Scolyer *et al.*, 2018).

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

Dažas melanomas, īpaši regresējošas 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 ir atklāts specifisks antigēns melanomas audos – PRAME (*preferentially expressed antigen in melanoma*), kas ir viens no specifiskiem imūnhistoķīmiskajiem melanomas biomarkieriem (Yang *et al.*, 2020).

1.2. Audzēju 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 būtiska nozīme ir peritumorālai limfocitāro infiltrācijai (*TIL*), galvenokārt CD4 un CD8 T šūnām. 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* infiltrāciju 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 pietiekams prognostisks rādītājs, lai to iekļautu stadijas noteikšanā pēc AJCC klasifikācijas (Scolyer *et al.*, 2018). Imūnsistēmas rādītāji, jo īpaši *TIL* pakāpe, nav standarta melanomas histopatoloģisko ziņojumu rādītāji, jo tie vēl nav apstiprināti un novērtēti kā būtiski ietekmējoši kopējo dzīvildzes ilgumu vai klīnisko lēmuma pieņemšanu (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 (Zablocka *et al.*, 2021). 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 melanocītaru audzēju 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* saistītās 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 apsvērtā 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 solidu 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 (*The Cancer Genome Atlas (TCGA)*). 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 sekvenčētas 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 izraisītos 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 METODES

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 vai virspusēji augošu ļaundabīgu invazīvu melanomu. Pētījuma struktūra atspoguļota 1. tabulā.

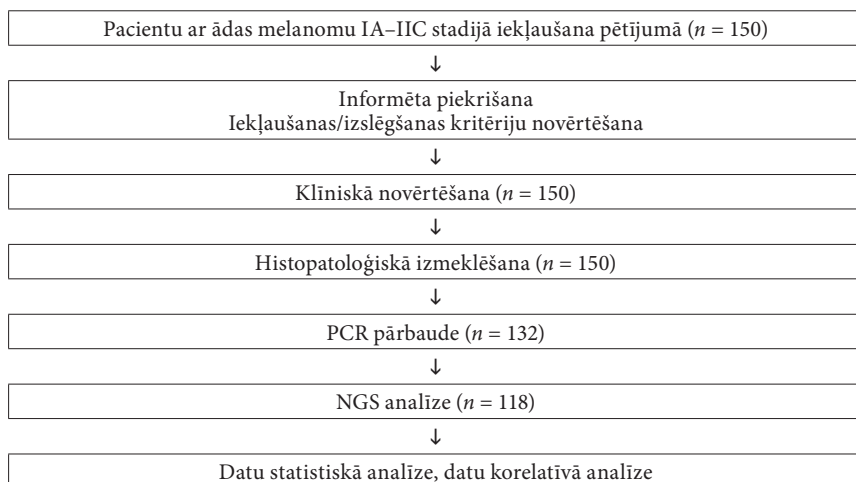
2.2. Ētika

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*, aknrālām 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 (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 attālumus 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 biežiem, formalinā fiksētiem, parafinā iestrādātiem audiem, izmantojot *GeneRead*[™] 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*TM 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 ieguldītājiem (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 Hi-kvadrāta, Manna-Vitnija U testu un/vai Kruskala-Valisa rangu testu. Mutācijas statusa saistība ar klīniskajiem un histopatoloģiskajiem raksturlielumiem tika analizēta, izmantojot Pearson χ^2 , 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% un 40,0% pacientu (2. tabula).

2. tabula. Pētījumā iekļauto pacientu klīniski patoloģiskie rādītāji

Rādītājs	Pacienti, <i>n</i>
Vecuma mediāna, gadi, <i>n</i> (diapazons)	67 (24–87)
Dzimums, vīrietis/sieviete	69/81
Breslova biezuma mediāna, mm, <i>n</i> (diapazons)	2,4 (0,1–20)
Klārka līmeņa mediāna, <i>n</i> (diapazons)	3 (1–5)
Čūlojums, ir/nav	71/79
LVI, ir/nav	89/61
Neirotropisms, ir/nav	6/141
Solārā elastoze, mediāna, <i>n</i> (diapazons)	1 (0–3)
Audzēja izmēra mediāna, cm, <i>n</i> (diapazons)	1,5 (0,2–20,0)
Mitožu skaita mediāna, 10 HPF, <i>n</i> (diapazons)	2 (1–18)
<i>TIL</i> mediāna, rezultāts (diapazons)	2 (0–3)
IA stadija	12
IB stadija	20
IIA stadija	32
IIB stadija	34
IIC stadija	52

TIL – audzēju infiltrējošie limfocīti

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 augošu melanomu bija augstāks Klārka invāzijas līmenis ($P = 0,04$), lielāks

Breslova biezums ($P = 0,04$), 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 neatšķirās. 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 biezuma 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 elastozes 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 ($\times 400$), TIL – audzēju infiltrējošie limfocīti; $P \leq 0,05$ ir norādīts treknrakstā.

* Hī-kvadrāta tests.

** Manna-Vitnija U tests.

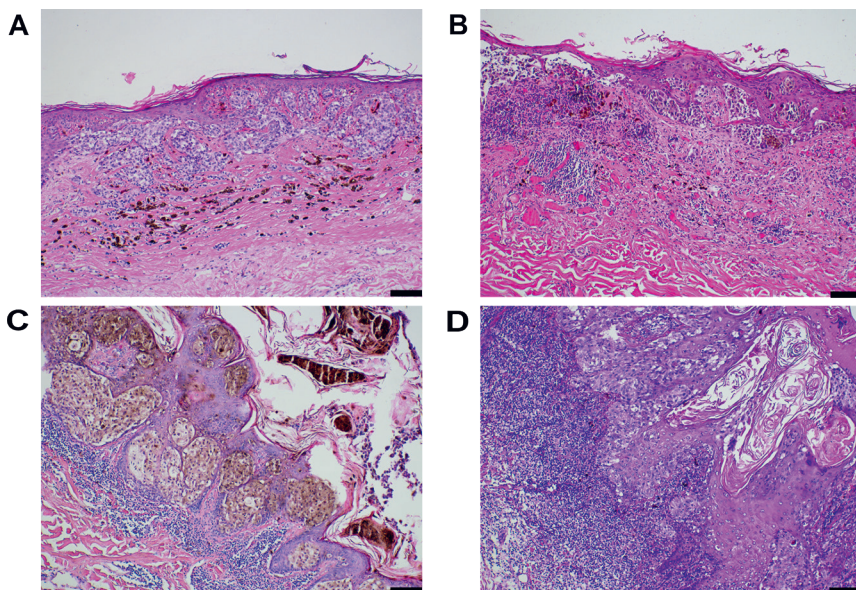
3.3. TIL pacientiem ar nodulāru un virspusēji augošu melanomu

Audzēju infiltrējošie limfocīti (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 nodulārai melanomai un starp TIL un mitožu skaitu ($R^2 = 0,02$; $P = 0,018$) virspusējas izplatīšanās melanomai (4. tabula).

4. tabula. TIL saistības ar kliniski 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	$R^2 = 0,02; P = 0,018$	$P = 0,5$

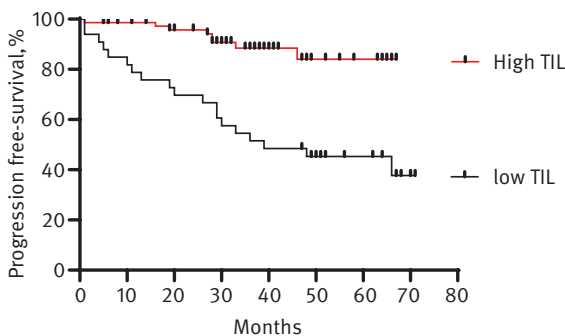
* Pacientu skaits katrā grupā ir norādīts 1. tabulā. TIL – audzēju infiltrējošie limfocīti; LVI – limfovaskulāra invāzija; Pīrsona Hi-kvadrāta tests; $P \leq 0,05$ ir norādīts treknrakstā



1. attēls. Reprēzentatīva mikrofotogrāfija, kurā redzami audzēju infiltrējošie limfocīti (TIL) ļaundabīgā melanomā

(A) nav TIL infiltrācijas, 0 punktu; (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

Kaplaņa-Meiera diagramma analizēta, izmantojot *log-rank* (Mantela-Koksa) testu. $P < 0,0001$. *TIL* – audzēja infiltrējošie limfocīti

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 biezumu ($P = 0,020$; $\chi^2 = 0,07$), pacienta dzimumu ($P = 0,009$; $\chi^2 = 0,09$), Klārka līmeni ($P = 0,005$; $\chi^2 = 0,11$) un audzēju infiltrējošiem limfocītiem *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*	Pirsona 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

Rādītājs*	Pirsona R ²	P vērtība
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* – audzēja infiltrējošie limfocīti; LVI – limfovaskulāra invāzija; Pirsona Hi-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 biežumu ($P = 0,04$; $\chi^2 = 0,16$), 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 elastozī, *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*	Pirsona χ^2 vērtība	P vērtība
Vecums, gadi	0,007	0,760
Dzimums	0,006	0,960
Breslova biežums	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* – audzēja infiltrējošie limfocīti; LVI – limfovaskulāra invāzija; Pirsona Hi-kvadrāta tests. $P \leq 0,05$ ir norādīts treknrakstā

3.6. Ģenētiskās mutācijas melanomā, izmantojot paneļa sekvenčēšanu (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(ZAR1L):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(EFGR):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, <i>n</i> = 119	Pirsona χ^2 vērtība	<i>P</i> vērtība
Vecums, gadi	0,18	0,004
Dzimums	0,053	0,43
Breslova biezums	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 virspusējs)	0,14	0,01
Slimības stadija (pTNM)	0,34	0,09

TIL – audzēju infiltrējošie limfocīti

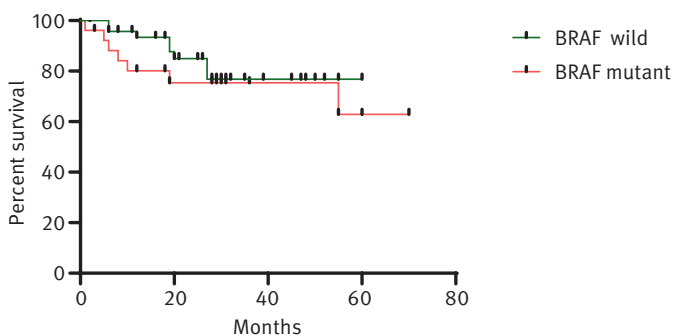
LVI – limfovaskulāra invāzija

Pirsona 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, $P = 0,20$).

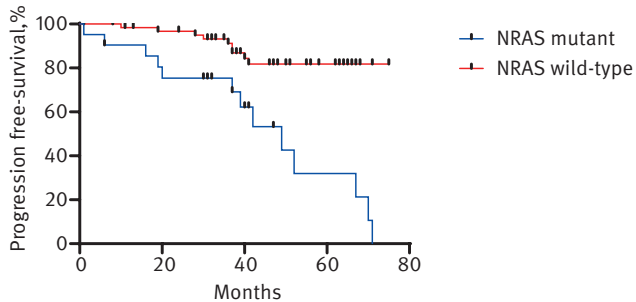


3. attēls. Bezrecidīva periods *BRAF* mutantu un *BRAF* savvaļas melanomu gadījumā

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

NRAS mutācijas statuss un bezrecidīva periods

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

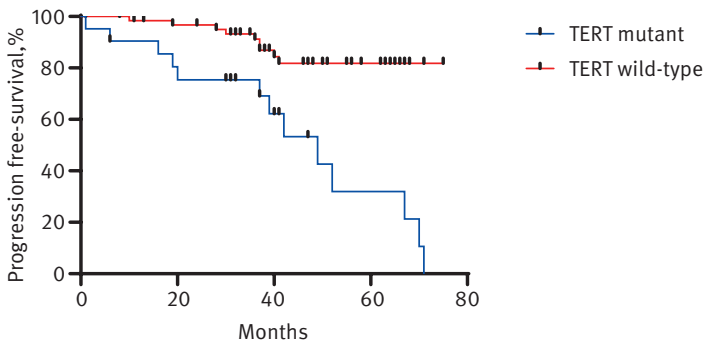


4. attēls. Bezrecidīva periods pacientiem ar *NRAS* mutantu un *NRAS* savvaļas melanomu

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

TERT mutācijas statuss un bezrecidīva periods

Pacientiem ar *TERT* mutāciju bija ievērojami īsāks bezrecidīva periods salīdzinājumā ar *TERT* savvaļas melanomu ($HR = 13,8$, 95% $C.I = 6,8-31,0$; $P < 0,0001$).

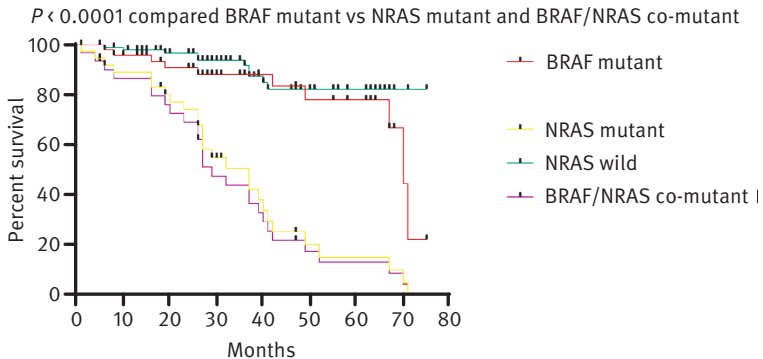


5. attēls. Bezrecidīva periods pacientiem ar *TERT* mutācijas un *TERT* savvaļas melanomu

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

Kopmutācijas ietekme uz bezrecidīva periodu

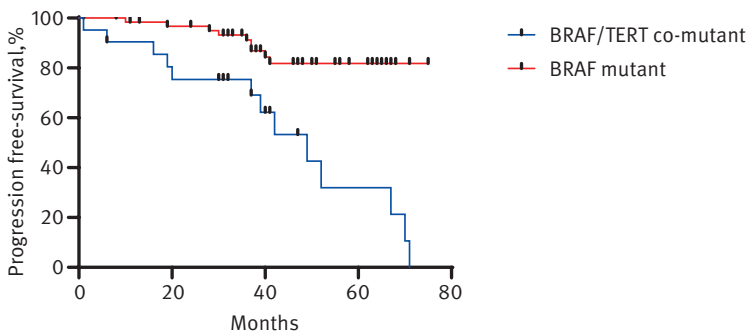
BRAF un *NRAS* kopmutācijas melanomai ir ievērojami īsāks bezrecidīva periods salīdzinājumā ar *BRAF* mutantu melanomu ($HR = 6,30$; 95%, $C.I = 3,10-12,70$, $P < 0,0001$).



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.

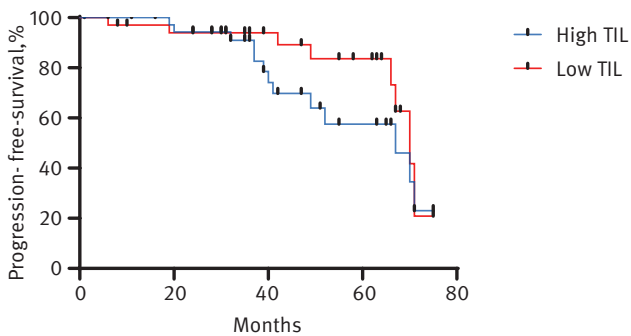


7. attēls. Bezrecidīva periods pacientiem ar melanomu. *BRAF* mutācijas un *BRAF* un *TERT* kopmutācijas melanoma

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% $C.I = 2,3-11,20$, $p < 0,0001$) (8. 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

Kapšana-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 biežums, Klārka invāzijas pakāpe, mitotiskā aktivitāte un slimība ir vispārātzīti pārlicinoši 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 epigēnētiskām 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 biežums 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 izčūlojumu, 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 tumoroģenēzes 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 analizēs būtiska saistība nav konstatēta (Bezic *et al.*, 2019).

Mūsu pētījumā netika novērota *BRAF* mutācijas statusa saistība ar melanomas izčūlojuma veidošanos. Varētu pieņemt, ka izčūlojuma 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 heterogenitātē ar atšķirīgu citokīnu vidi un imunomodulējošo gēnu ekspresiju. Turklāt nesēn 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 isāks 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 kliniski 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 sievietu 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 sievietu 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 gadījumu (Raaijmakers *et al.*, 2016; Chiappetta *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015). Mūsu pētījumā *NRAS* mutāciju konstatēja līdz 30% melanomas gadījumu.

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 isākas 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 biežumu 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 iespējamajiem *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% gadījumos. *NRAS* mutācija tika konstatēta 29,6% gadījumos. 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% gadījumos. 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%) gadījumos.
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.

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 un asoc. profesorei Guntai Strazdai 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 Danusevičiai, 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.



UNIVERSITY OF LATVIA

FACULTY OF MEDICINE, DEPARTMENT OF PATHOLOGY

Tatjana Zablocka

THE COMPARATIVE STUDY OF CLINICAL, HISTOPATHOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERISTICS AND ITS VALUE IN PROGRESSION-FREE SURVIVAL IN PATIENTS WITH EARLY-STAGE CUTANEOUS MELANOMA

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

submitted for the degree of Doctor (Ph. D.)

Sector group – Medicine and Health Sciences

Sector: Basic Medicine and Pharmacy

Subfield: Pathology

Riga 2024

The PhD Thesis was elaborated at the Department of Pathology of Faculty of Medicine, University of Latvia; Latvian Biomedical Research and Study Centre and Riga East University Hospital.

NATIONAL
DEVELOPMENT
PLAN 2020



EUROPEAN UNION
European Social
Fund

I N V E S T I N G I N Y O U R F U T U R E

The study was supported by project “Strengthening of the capacity of doctoral studies at the University of Latvia within the framework of the new doctoral model” identification No. 8.2.2.0/20/I/006.

The thesis summary consists of a general overview, five chapters and a reference list.

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

Supervisors:

Professor, MD, PhD **Sergejs Isajevs**, Faculty of Medicine, University of Latvia,
Department of Pathology
Senior researcher, PhD **Dace Pjanova**, Latvian Biomedical Research and Study Centre

Reviewers:

- 1) **Jānis Eglītis**, Assoc. professor, MD, PhD, Faculty of Medicine, University of Latvia, Department of Oncology, Riga, Latvia
- 2) **Regīna Kleina**, Emeritus professor, MD, PhD, Rīga Stradiņš University, Riga, Latvia
- 3) **Anna Szumera-Ciećkiewicz**, Professor, Dr.habil. med., MD, PhD, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland.

The Thesis will be defended at the public session of the Doctoral Committee of Medicine and Health Sciences at the University of Latvia on February 23rd, 2024 at the University of Latvia, Dabas Māja, Magnum auditorium (106), 1, Jelgavas street.

The Thesis is available at the Library of the University of Latvia, Raina blvd. 19, Riga.

Promotion Council in Legal Science of the University of Latvia

Chairman of Doctoral Committee: Professor **Valdis Pīrāgs**, MD, PhD

Secretary of the Doctoral Committee: Assoc. Professor **Līga Plakane**, PhD

© Tatjana Zablocka, 2024

© University of Latvia, 2024

ISBN 978-9934-36-196-8

ISBN 978-9934-36-197-5 (PDF)

ANNOTATION

Malignant melanoma is one of the most aggressive, drug-resistant human cancers, and its incidence has risen persistently during the last few decades, particularly in the Caucasian population. According to GLOBOCAN, more than 287,723 new cases of melanoma of the skin occurred worldwide in 2018 (1.6% of all cancers), with approximately 60,712 reported deaths.

Conventional histopathological characteristics such as histological tumor subtype, Clark level, Breslow thickness, solar elastosis, ulceration, regression, lymphovascular invasion, mitotic counts, tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) has been widely used for the diagnosis and prognosis of malignant melanoma. Several tumor suppressor genes and/or oncogenes have been reported to be involved in melanoma pathogenesis. Of great interest are the *RAS-RAF-MEK-ERK*, *PI3K/PTEN* and *c-Kit* pathways, since patients harboring activating mutations in *BRAF*, *NRAS* and *KIT* genes could benefit of target treatment options or tailored combinations of target- and immuno-therapies. Identifying which somatic mutations are likely to be ‘drivers’ in pathogenesis and elucidating how mutated genes affect the biology of a given tumor are fundamental challenges in cancer genomic studies. ; The identification of variants predictive of response or resistance to systemic treatments is already recommended for proper management of advanced melanoma and molecular testing is a priority in determining the course of therapy. Indeed, molecular testing for actionable mutations is mandatory in patients with advanced disease (unresectable stage III or stage IV, and highly recommended in high-risk resected disease stage IIc, stage IIIb–IIIc). In recent years, the direction of personalized medicine, which is based on a disease-specific targeting therapy, as well as early diagnosis of tumours and identification of high-risk individuals, is rapidly developing in the world. Invasive melanoma is a tumor with high impact through its rapidly growing incidence, high mortality, increased complexity, and high care costs in advanced stages. Recent studies demonstrated significant value of both conventional histopathological characteristics and genetic changes in melanoma.

Up to date *BRAF* mutational status is widely tested in routine clinical practice in advanced disease (stage IIC, III and IV), however the *BRAF* testing is not recommended in early stage melanoma (Stage IA–IIB) both by current European Society for Medical Oncology (ESMO) and by *Network N.C.C. Cutaneous Melanoma (NCCN)* guidelines. In addition, the simultaneous analysis of other genes in melanoma (*NRAS*, *TERT*) is still controversial and the comparative value of histopathological, clinical and genetic characteristics and it’s value in progression free survival in cutaneous early stage melanoma is still poorly understood.

TABLE OF CONTENTS

ANNOTATION.....	47
GENERAL OVERVIEW.....	50
Aim of the study.....	53
Objectives.....	53
Hypotheses.....	53
Study novelty.....	53
Overview of methods.....	54
Scientific projects related to the work.....	54
Publications in peer-reviewed journals (pubmed/scopus).....	54
1. THEORETICAL BACKGROUND.....	57
1.1. Histopathological assessment of melanoma.....	59
1.2. Tumor infiltrating lymphocytes for the risk stratification of melanoma progression.....	60
1.3. <i>BRAF</i> gene mutation assessment for the risk stratification of melanoma progression.....	61
1.4. <i>NRAS</i> gene mutation assessment for the risk stratification of melanoma progression.....	61
1.5. <i>TERT</i> gene mutation assessment for the risk stratification of melanoma progression.....	62
2. MATERIAL AND METHODS.....	64
2.1. Design of the study.....	64
2.2. Ethics.....	64
2.3. Exclusion criteria.....	64
2.4. Clinical characteristics.....	65
2.5. Evaluation and scoring of tumor infiltrating lymphocytes.....	65
2.6. <i>BRAF</i> and <i>NRAS</i> mutations evaluation.....	65
2.7. NGS testing.....	66
2.8. Statistical analysis.....	67

3. RESULTS	68
3.1. Clinical characteristics	68
3.2. Histopathological characteristics	68
3.2. TIL in patients with nodular and superficial spreading melanoma	69
3.4. <i>BRAF</i> mutational status and its correlation with clinicopathological characteristics	71
3.5. <i>NRAS</i> mutational status and its correlation with clinicopathological characteristics	72
3.6. Genetical mutations in melanoma by panel sequencing (unpublished data)	73
3.7. <i>TERT</i> mutational status and its association with clinicopathological characteristics	73
3.8. The value of histopathological and <i>BRAF</i> , <i>NRAS</i> and <i>TERT</i> mutational status on progression free survival in melanoma	74
4. DISCUSSION	78
5. CONCLUSIONS	84
REFERENCES	86
ACKNOWLEDGEMENTS	92

GENERAL OVERVIEW

During last years the incidence of malignant melanoma has been increased worldwide and currently is a significant public health problem (Hessler *et al.*, 2020; Forsea *et al.*, 2020). Ultraviolet radiation has been the significant risk factor in the pathogenesis of melanoma, which has the direct damage to DNA (Hessler *et al.*, 2020; Shellenberger *et al.*, 2016). In addition, the early detection of melanoma and evaluation of melanoma tissue biomarkers have an important role for patient risk stratification, personalized diagnostics, and treatment (Mandala *et al.*, 2014; Romaine *et al.*, 2026; Bastian *et al.*, 2014; Clark *et al.*, 1989).

Current World Health Organization (*WHO*) classification of skin tumors subdivides melanoma based on solar elastosis assessed by dermal elastic fibers to measure cumulative sun damage, CSD (Scolyer *et al.*, 2018). According to this *WHO* classification, there are currently three classes of melanomas: those associated with high CSD, those associated with low CSD, and nodular melanomas (Shellenberger *et al.*, 2016; Bastian *et al.*, 2014). Solar elastosis is usually apparent in superficially spreading and lentigo maligna melanoma, so-called high CSD melanoma. Desmoplastic melanoma is associated with increased solar elastosis. The most common subtype of high CSD melanoma is superficially spreading melanoma, which usually begins with early radial growth, followed by vertical growth and invasion of the dermis (Shellenberger *et al.*, 2016).

Acral, mucosal, uveal and spitzoid melanomas are not associated with CSD or are characterized by low CSD. Nodular melanoma usually characterized as a low CSD type with early progression to vertical growth (Shellenberger *et al.*, 2016).

While the advent of novel personalized treatment of melanoma based of *BRAF* inhibitors and immunotherapies has reduced the mortality rate over the last decade, advanced and metastatic melanoma, remain still difficult to treat (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). Therefore, early diagnostic and risk stratification for the progression of melanoma is of particular importance. However, rare melanoma histopathological subtypes can make diagnosis challenging (Shellenberger *et al.*, 2016).

Therefore, the biomarkers for early-stage melanoma for the prediction of melanoma clinical behavior was of particular importance. It has been shown that such clinicopathological characteristics such tumor size, tumor type, tumor invasiveness (Breslow thickness, Clark level, lymphovascular invasion, neurotropisms), ulceration, tumor mitotic activity are significant prognostic factors for the development and progression of melanoma (Shellenberger *et al.*, 2016; Bastian *et al.*, 2014; Clark *et al.*, 1989; Park *et al.*, 2017). In addition, it has been demonstrated that tumor infiltrating lymphocytes could stratify melanoma into low and high risks progression (Park *et al.*, 2017; Scolyer *et al.*, 2018; Azimi *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2015).

The development of melanoma is closely related to somatic and epigenetic changes. Different mutations have been implicated in its pathogenesis and evolution. Recent genomic classification subdivides melanoma into four major subtypes based on the pattern of the most prevalent significantly mutated genes: mutant *BRAF*, *RAS*, *NF1*, and triple-WT (*wild type*) [Ribas *et al.*, 2015; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Ny *et al.*, 2020].

The advances in molecular pathology and assessment of genetic biomarkers are increasingly used in clinical practice for the diagnosis, personalized treatment and prognosis of melanoma. In addition, modern treatment guidelines focused on the assessment of genetic biomarkers of melanoma (Hessler *et al.*, 2020; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Ny *et al.*, 2020).

There are several clinical guidelines focused on genetic testing in cutaneous melanoma (Michielin *et al.*, 2019; Cancer Genome Atlas Network, 2020). The current European Society for Medical Oncology (*ESMO*) guidelines mandates mutation testing for all patients with advanced disease, which includes stages III or IV (resected or unresected) and recommends mutation testing for high-risk pathologic stage IIC melanoma patients (Michielin *et al.*, 2019). However, Network *N.C.C.* Cutaneous Melanoma (*NCCN*) guidelines recommend *BRAF* testing for stage III–IV melanoma. The *NCCN* panel does not recommend *BRAF* testing for resected pathologic stage I or II cutaneous melanoma (Cancer Genome Atlas Network, 2020).

The assessment of *BRAF* gene mutation is of particular importance (Shellenberger *et al.*, 2016; Cancer Genome Atlas Network, 2020). *BRAF* mutations are observed in 40–60% of all primary malignant melanoma cases (Cancer Genome Atlas Network, 2020; Ny *et al.*, 2020; Rose *et al.*, 2006; Michielin *et al.*, 2019). *BRAF* mutation usually observed in younger patients, in non *CSD* skin and in superficial spreading melanoma, whereas *NRAS* mutational melanoma was characterized for nodular subtype and *CSD* skin (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 is one of the signaling kinases involved in *MAPK* pathway. The mutation of *BRAF* leads to the activation of *MAPK* signaling cascade. The most common *BRAF* mutation is *V600E*, which represents 80% of alterations in the gene (Eigentler *et al.*, 2016). Other common *BRAF* gene mutations are *V600K* and *V600R* mutations (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Previous studies showed that *BRAF V600E* mutation usually observed in younger patients at extremities, whereas *V600K* mutations are associated with older patients age and usually found at head and neck (Cancer Genome Atlas Network, 2015; Ny *et al.*, 2020; Michielin *et al.*, 2019; Cancer Genome Atlas Network, 2020).

Recent evidence showed that in up to 20–30% of cases, *NRAS* mutations co-existed with *BRAF* mutations. Patients with both *BRAF* and *NRAS* mutations had worse prognoses than those with *BRAF* mutant melanoma alone (Tayloe *et al.*, 2007; Raaijmakers *et al.*, 2016).

Generally, *NRAS* mutations are independent of *BRAF* mutations, but dual expression has been reported (Taylor *et al.*, 2007). The association of *NRAS* mutations with the degree of solar elastosis suggests that *NRAS* is closely related to the mutations induced by *UV* irradiation. Previous studies showed that *NRAS* mutation is also associated with decreased immune responses in peritumoral melanoma tissue and in the more advanced tumor stage (Raaijmakers *et al.*, 2016).

Recent evidence provided using Whole Exome and Whole Genome Sequencing (*WES* and *WGS*) pointed out the involvement of other genes in melanoma pathogenesis, suggesting the importance of screening multiple genes at the same time to better classify the three main molecular melanoma subtypes (*BRAF*mut, *NRAS*mut, and non-*BRAF*mut /non-*NRAS*mut) [Scolyer *et al.*, 2018; Fortes *et al.*, 2015].

To date, various molecular strategies are available for mutational analysis of the *BRAF* gene, such as Sanger Sequencing (SS), real-time PCR, high-resolution melting analysis, Peptide Nucleic Acid (PNA)-mediated real-time PCR clamping, digital PCR, pyrosequencing, and immunohistochemistry. Each technique is able to detect mutations on single genes per run with a specific sensitivity, specificity, and limit of detection (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). At the beginning, Cobas 4800 *BRAF* V600 Mutation Test (Roche Molecular Systems) and THxID™-*BRAF* kit (BioMerieux, Inc.) were the only FDA-approved assays for *BRAF* V600E mutation and for *BRAF* V600E/V600K mutations in DNA samples extracted from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) human melanoma tissue, respectively (Scolyer *et al.*, 2018).

The advent of high throughput Next-Generation Sequencing (*NGS*) technology has revolutionized the understanding of cancer biology and improved personalized treatment strategies in a large variety of human cancers, including melanoma. Development and use of *NGS* targeted gene sequencing panels may represent an attractive method in hospitals and clinics, since they can simultaneously screen disease-related mutations in multiple several genes per run, thus reducing both reagents cost and DNA quantity necessary, with enough sensitivity and specificity to detect somatic variants with frequencies higher than 5% (Romaine, *et al.*, 2016).

Presence of *TERT* promoter mutation has been associated with worse survival from melanoma (Scolyer *et al.*, 2018; Azimi *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2017; Maibach *et al.*, 2020). This effect was modified by a common polymorphism *rs2853669* within the *TERT* promoter that disrupts a preexisting non-canonical *ETS2* site in the proximal region of the *TERT* promoter immediately adjacent to an E-box (Maibach *et al.*, 2020). Further, *TERT* promoter mutations in spitzoid melanocytic neoplasms were reported to predict aggressive clinical behavior (Dougan, *et al.*, 2018).

Previous studies showed the co-occurrence of mutations in *NRAS*, *BRAF* and *TERT* genes has been reported, however their clinical and prognostic value is still under discussion (Hessler, *et al.*, 2020; Forsea *et al.*, 2020; Shellenberger *et al.*, 2016; Mandala *et al.*, 2014). The concomitant mutation of *BRAF* and *NRAS* genes may lead to a resistance to *MEK* inhibition. However, the current evidence is insufficient to suggest that the presence of a co-mutation would require a change in clinical follow-up and recommended treatment.

To summarize, current clinical guidelines did not request genetic testing for early stage melanoma (Stage IA–IIB), in addition the value on *BRAF*, *NRAS* and *TERT* co-mutation is still under investigation in melanoma prognosis and treatment guidelines. Furthermore, the comparative association of *BRAF*, *NRAS* and *TERT* mutational status with histopathological characteristics in early-stage melanoma is still poorly understood.

Aim of the study

The aim of the Thesis was to compare the *BRAF*, *NRAS* and *TERT* mutation status and their associations with clinicopathological characteristics of patients with Stage IA–IIC melanoma and its value in progression-free survival.

Objectives

1. To compare the histopathological characteristics in patients with IA–IIC melanoma.
2. To compare the clinical characteristics in patients with IA–IIC melanoma.
3. To investigate the *BRAF*, *NRAS* and *TERT* mutational status in patients with IA–IIC melanoma.
4. To identify the associations between clinical, histopathological characteristics and *BRAF*, *NRAS* and *TERT* mutational status.
5. To compare the value of clinical, histopathological and *BRAF*, *NRAS*, *TERT* mutational status on progression free survival in patients with IA–IIC melanoma.

Hypotheses

The histopathological characteristics are associated with clinical characteristics, *BRAF*, *NRAS* and *TERT* mutational status and progression free survival in early-stage melanoma.

Study novelty

The novelty of the study was the assessment of association between the *BRAF*, *NRAS* and *TERT* mutation status with clinical and histopathological

characteristics and disease free-survival in patients with early stage (Stage IA–IIC) melanoma.

Overview of methods

One hundred fifty patients who underwent melanoma stage IA–IIC surgical treatment at Riga East University Hospital, Latvian Centre of Oncology Riga, Latvia, in 2012–2018 were retrospectively enrolled in the study. Only patients with primary cutaneous nodular or superficial spreading malignant invasive melanoma were enrolled in this study.

Clinical characteristics of melanoma patients such age, gender, tumor location, size were analyzed. Various clinical factors – age, gender, length of follow-up after surgery, recurrence, or metastasis – were obtained from medical records.

The histopathological characteristics of melanoma were reviewed according to the current WHO (World Health Organization) and CAP (College of American Pathologists) guidelines (Scolyer *et al.*, 2018). Such characteristics as tumor type, ulceration, tumor-infiltrating lymphocytes, Clark level of invasion, Breslow thickness, lymphovascular invasion, neurotropism, regression, and mitotic activity was assessed. In addition, the excision lines and distance from the tumor were recorded. The pTNM staging was determined on the basis of histopathological assessment.

BRAF and *NRAS* mutational status was assessed by digital droplet PCR (ddPCR) using *BRAF* V600 (#12001037 and #1863100, *NRAS* Q61 (#12001006) and *NRAS* G12/G13 (#12001627) Screening Assays (all Bio-Rad, USA) as per the manufacturer’s instructions.

TERT mutational status was assessed by next generation sequencing (NGS). The *Qiagen* pac-cancer-multimodal panel gene kit was used (Cat. No. / ID: 334942).

Scientific projects related to the work

The study was supported by project “Strengthening of the capacity of doctoral studies at the University of Latvia within the framework of the new doctoral model” identification No. 8.2.2.0/20/I/006.

Publications in peer-reviewed journals (pubmed/scopus)

Scientific articles included in the collection of research papers

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* (submitted 29 October 2023).

Presentations at scientific conferences with published abstracts

7 reports at international scientific conferences

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 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. THEORETICAL BACKGROUND

The incidence of malignant melanoma has been increasing worldwide and is currently a significant public health problem (Hessler *et al.*, 2020; Forsea *et al.*, 2020). More than 97% of all melanomas are diagnosed at the known primary site, most commonly the skin (Shellenberger *et al.*, 2016). In addition, melanoma can occur in the eye or in the mucosa of internal organs (Shellenberger *et al.*, 2016). Rarely, melanoma is diagnosed without an obvious primary site and is referred to as melanoma of unknown primary (MUP) [Shellenberger *et al.*, 2016].

The predominant hypothesis for MUP involves the spontaneous regression of melanoma from the known primary site (Shellenberger *et al.*, 2016). Metastatic melanoma could develop synchronously with a subclinical or otherwise unrecognized cutaneous, ocular, or mucosal melanoma.

Ultraviolet radiation has been the significant risk factor in the pathogenesis of melanoma, which has the direct damage to DNA (Hessler *et al.*, 2020; Forsea *et al.*, 2020; Shellenberger *et al.*, 2016).

Multiple somatic and epigenetic alterations have been implicated in the pathogenesis of melanoma. In addition, the immune responses and disturbances of immunological tolerance plays and important role in the pathogenesis of melanoma (Shellenberger *et al.*, 2016; Mandala *et al.*, 2014).

Screening, early differential diagnosis, personalized treatment selection and treatment effect evaluation of malignant tumors has so far been an important issue in both, the medical and social fields. The search for instruments and/or diagnostics tools able to detect cancers at an early stage has led to the consideration of the usage of exhaled air, biomarkers in blood, urine testing as well as imaging techniques. However, there is a little evidence about early detection and risk stratification in malignant melanoma (Mandala *et al.*, 2014; Romaine *et al.*, 2016). Histopathological diagnosis and biomarkers qualitative and quantitative assessment has substantial inter-observer variability, limiting its usefulness for individual patients. In addition, specialized dermatopathologists have greater concordance; however, such expertise is not widely available. Therefore, it is importance standardization of the assessment (Shellenberger *et al.*, 2016).

Deep learning, an automated approach using labelled images to train a network with no other assumptions, has proven to be useful in a wide variety of similar areas in digital pathology.

In recent years the significant progress has been made in proteomics, metabolomics, and genomics, however the histopathological examination is still the gold standard for the diagnosis and prognosis of melanoma (Shellenberger *et al.*, 2016; Mandala *et al.*, 2014; Romaine *et al.*, 2016; Bastian *et al.*, 2014; Clark *et al.*, 1989; Scolyer *et al.*, 2018).

Current World Health Organization (WHO) classification of skin tumors subdivided melanoma based on solar elastosis assessed by dermal elastic fibers to

measure cumulative sun damage (Scolyer *et al.*, 2018). Based on this WHO classification the melanoma was newly divided into three classes: melanomas associated with cumulative solar damage (CSD), melanomas not associated with CSD, and nodular melanoma (Scolyer *et al.*, 2018). Pathways of melanoma associated with CSD include superficial spreading, lentigo maligna, and desmoplastic melanomas. Superficial spreading melanoma is the most common subtype and is noted for its early radial growth, followed by vertical growth and subsequent invasion into the dermis (Shellenberger *et al.*, 2016; Bastian *et al.*, 2014). Melanomas not associated with CSD are subclassified into spitzoid, acral, mucosal, and uveal melanomas and melanomas arising in congenital and blue nevi. Finally, nodular melanoma is distinctive for its early progression to vertical growth (Shellenberger *et al.*, 2016).

The development of melanoma is closely related to somatic and epigenetic changes. Different mutations have been described in the pathogenesis and evolution of melanoma. Recent genomic classification subdivides melanoma into four subtypes based on the pattern of the most prevalent significantly mutated genes: mutant *BRAF*, *RAS*, *NF1*, and triple-WT (wild type) [Shellenberger *et al.*, 2016; Romaine *et al.*, 2016].

BRAF, *CDKN2A* and *NRAS* mutations are the most important and clinically relevant. While the advent of novel personalized treatment of melanoma based on *BRAF* inhibitors and immunotherapies have reduced the mortality rate over the last decade, advanced and metastatic melanoma, remain still difficult to treat (Scolyer *et al.*, 2018; Azimi *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2015).

In addition, the immunological tolerance mechanisms play an important role in the progression of melanoma (Taylor *et al.*, 2007; Raaijmakers *et al.*, 2016).

Germline mutations in the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gene (*CDKN2A*) are frequently identified among familial melanoma with prevalence in families with three or more members diagnosed with melanoma ranging between 20% and 50% (Park *et al.*, 2017). Germline mutations in *CDKN2A* have also been associated with familial atypical multiple mole melanoma (FAMMM) syndrome, an autosomal dominant condition exemplified by a family history of melanoma and high numbers of atypical nevi (Mandala *et al.*, 2014). The finding that programmed cell death protein 1 ligand 1 (PDL1) and PDL2 are expressed by melanoma cells, T cells, B cells and natural killer cells led to the recent development of programmed cell death protein 1 (PD1)-specific antibodies (for example, nivolumab and pembrolizumab). The value of different targeting treatment showed beneficial effect in melanoma treatment, including PD-L1, CTLA4 targeting (Havel *et al.*, 2019; Ribas *et al.*, 2015).

In addition, the value of immunotherapy with oncolytic ECHO-7 virus *Rigvir* in patients with locally advanced and metastatic melanoma was demonstrated (Sorokins *et al.*, 2020).

It has been shown that such clinicopathological characteristics such tumor size, tumor type, tumor invasiveness (Breslow thickness, Clark level of invasion, lymphovascular invasion, neurotropisms), ulceration, tumor mitotic activity are

significant prognostic factors for the development and progression of melanoma (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). In addition, it has been demonstrated that tumor-infiltrating lymphocytes could stratify melanoma in to low and high risks progression (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).

Diagnostic and therapeutic molecular markers have been increasingly used to assist in histopathological assessment in melanoma (Mandala *et al.*, 2014). These markers are not only helpful for diagnosing melanoma, but also in distinguishing certain subtypes that may otherwise be difficult to identify (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* mutated melanoma mostly characterized for superficial spreading melanoma, younger patient age, non CSD skin, whereas *NRAS* mutational melanoma was characterized for nodular subtype and CSD skin (Raaijmakers *et al.*, 2016).

Generally, *NRAS* mutations occur independently of *BRAF* mutations, but dual expression has been reported (Raaijmakers *et al.*, 2016). The association of *NRAS* and skin with CSD suggests that such mutagenesis is induced by UV irradiation. Positive *NRAS* expression was also associated with a lower grade of tumor-infiltrating lymphocytes and a higher tumor stage (Raaijmakers *et al.*, 2016). However, the prognostic value of identification of *NRAS* mutation is unclear.

1.1. Histopathological assessment of melanoma

Current histopathological examination of melanoma is based on current WHO classification and College of American Pathologists (CAP) guidelines (Scolyer *et al.*, 2018). Such criteria as tumor type, ulceration, tumor infiltrating lymphocytes (TIL), Clark level of invasion, Breslow thickness, lymphovascular invasion, neurotropism, regression, mitotic activity is routinely assessed. In addition, the excision lines and distance from tumor is recorded. Based on histopathological assessment the pTNM staging is evaluated (Scolyer *et al.*, 2018).

Since Breslow thickness of particular importance for TNM staging, digital slide analysis could provide the better evidence for the measurement of invasions, especially in borderline cases. Amelanotic appearance of melanoma makes diagnosis more difficult. Immunohistochemical staining positive for S100, SOX-10, HMB-45, Melan-A, Mart-1 and tyrosinase supports diagnosis of melanoma (Shellenberger *et al.*, 2016).

Some melanomas, especially regressed and metastatic could lose HMB-45, Melan A and tyrosinase expression, and in such case the immunohistochemical

assessment of melanoma is straightforward. In these cases, usually only S-100 and vimentin expression is characteristic.

Recently it has been showed that p16 expression in melanoma is significantly downregulated compared to nevus (Dougan *et al.*, 2018). In addition, PRAME has been demonstrated as an immunohistochemical marker to aid the diagnosis of malignant melanoma (Yang *et al.*, 2020).

1.2. Tumor infiltrating lymphocytes for the risk stratification of melanoma progression

Tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) are considered a manifestation of the host immune response to the tumor (Dougan *et al.*, 2018; Havel *et al.*, 2019; Ribas *et al.*, 2015).

Tumors possess a variety of cell membrane-bound antigens, recognized as non-self by the immune system which stimulates a cytotoxic immune response characterized by CD4, CD8, antigen-presenting cells, and other inflammatory cell infiltration. These infiltrating cells are recognized as a response by immune surveillance mechanisms designed to inhibit tumor growth and spread. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs), mainly CD4 and CD8 T cells, have been extensively described in anti-tumor immunity. T-regulatory lymphocytes suppress the immune response and commonly express FOXP3, CD4 and CD25 (Dougan *et al.*, 2018; Havel *et al.*, 2019; Ribas *et al.*, 2015).

It has been previously shown that TIL grade is an independent predictor of survival and sentinel lymph node (SLN) status in melanoma patients. Patients with a pronounced TIL infiltrate have better prognosis (Fortes *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2017; Maibach *et al.*, 2020). Furthermore, a higher level of TIL in primary invasive melanoma samples is associated with a lower risk of death due to the malignancy (Leslie *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2021).

However, there is an unresolved debate in the literature whether the TIL grade is robust enough as a prognostic feature to be included in *American Joint Committee on Cancer staging* (AJCC) (Scolyer *et al.*, 2018). Immune measures, especially TIL grade, are not standard components for melanoma pathology reports because they have not yet been validated and appreciated to impact overall survival or clinical management significantly (Shellenberger *et al.*, 2016). Furthermore, the association of TIL with an improved prognosis in melanoma remains controversial (Clemente *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 2016; Tas *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2016).

Recent studies showed that increased TIL infiltrate associated with more favorable survival outcomes (Weiss *et al.*, 2016).

Our previous studies showed that that melanoma subjects with high TIL grade had significantly better progression-free survival than patients with low TIL grade (Zablocka *et al.*, 2021). Based on our study results the recommend the assessment of TIL into such scoring system from 0 to 3. It was defined as follows: 0 = absence of lymphocytes within the tissue, 1 = presence of lymphocytes

occupying < 25% of the tissue, 2 = presence of lymphocytes occupying 25 to 50% of the tissue, and 3 = presence of lymphocytes occupying > 50% of tissue. The low TIL infiltration was defined as scores 0 and 1. The high TIL infiltration was defined as scores 2 and 3 (Zablocka *et al.*, 2021).

1.3. *BRAF* gene mutation assessment for the risk stratification of melanoma progression

B-raf is one of the signaling kinases down the MAPK pathway. *BRAF* mutations comprise the most common genetic alteration in cutaneous melanoma with its presence ranging from 40% to 60% of cases (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). Mutations in this oncogene lead to constitutive activation of the MAPK pathway. The most common *BRAF* mutation is *V600E*, which represents 80% of alterations in the gene (Ny *et al.*, 2020; Rose *et al.*, 2006; Miechielin *et al.*, 2019). The *V600K* and *V600R* mutations are other known *BRAF* mutations (Ny *et al.*, 2020; Rose *et al.*, 2006; Miechielin *et al.*, 2019).

Studies have shown that *V600E* is associated with superficial spreading subtype, younger patient age, and skin sites without chronic sun-induced damage, such as the extremities, whereas *V600K* mutations are correlated with skin sites with CSD, such as the head and neck, and patients of older age (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). In contrast, *V600K* mutations are correlated with skin sites with CSD, such as the head and neck, and patients of older age (Menzies *et al.*, 2012).

Recently, whole-genome sequencing of benign melanocytic nevi showed the presence of *BRAF* mutations, in addition to *NRAS* mutations, with mutational load positively correlated with UV exposure, whereas lower mutational loads were observed in congenital nevi (Colebatch *et al.*, 2019).

Our previous study showed the associations of *BRAF V600* mutational status and patients younger age, Clark invasion level, Breslow thickness, lymphovascular invasion, female gender, and 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* gene mutation assessment for the risk stratification of melanoma progression

The value of *NRAS* mutation in the progression of melanoma is controversial. While some studies showed the associations between *NRAS* mutation and

prognosis of melanoma, other studies did not find the value of *NRAS* mutation for the assessment of melanoma prognosis (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 proteins are small intracellular GTPases and in normal human melanocytes both GTP-bound active and GDP-bound inactive states exist. Receptor tyrosine kinase (RTK) signaling induces transition towards the *NRAS* active state that is mediated by the recruitment of guanine nucleotide exchange-factors. *NRAS* mutant melanomas often display a dysregulated cell cycle, which is characterized by the upregulation of cyclin D1 and loss of tumor suppressor p16INK4A (Forsea *et al.*, 2020).

The *NRAS* gene is most frequently mutated at hotspots in exon 2 (codons 12 and 13) and exon 3 (codon 61) [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]. Mutations of *NRAS* were previously associated with nodular subtype of the primary tumor and localization in sun-damaged skin (Jakob *et al.*, 2012; Ugurel *et al.*, 2007; Devitt *et al.*, 2011).

Some studies showed that *NRAS* mutation was associated with favorable prognosis (Ellerhorst *et al.*, 2011). At contrast, other studies demonstrated that *NRAS* gene mutation was associated with worse prognosis (Jakob *et al.*, 2012; Ugurel *et al.*, 2007; Devitt *et al.*, 2011). Whereas some studies did not find any significant association between *NRAS* mutation and prognosis of melanoma (Heppt *et al.*, 2017; Ellerhorst *et al.*, 2011). The assessment of *NRAS* mutation is beneficial since the targeting treatment is considered for the *NRAS* mutant melanoma (Grimaldi *et al.*, 2017).

1.5. *TERT* gene mutation assessment for the risk stratification of melanoma progression

Recently, Nagore *et al.* provided preliminary evidence that in stage I/II melanoma patients *TERT* promoter status in combination with *BRAF/NRAS* mutations can be used to identify patients at risk of aggressive disease and the possibility of further prognostic refinement by assessing the *rs2853669* polymorphism within *TERT* promoter (Nagore *et al.*, 2014).

Recently, targeted molecular therapy has revolutionized solid tumor management, thus necessitating clinical-grade, quality-controlled molecular profiling of tumors. In addition to guiding management, molecular testing data also provide insight into disease pathogenesis and treatment resistance. In sarcomas and leukemias/lymphomas, for example, molecular testing has long been required for the most accurate diagnosis (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). NGS-based molecular profiling is now being used to simultaneously gain diagnostic and predictive information to guide clinical care.

Genomic data in melanoma largely originate from The Cancer Genome Atlas (*TCGA*). These data have been mostly limited to large and metastatic tumors; and thus, primary cutaneous melanomas are underrepresented in *TCGA* because of the relatively small primary tumor sizes in melanoma. And, because benign melanocytic proliferations were not sequenced in the *TCGA*, less is known about the spectrum of genomic alterations that can be found in such lesions (Ribas *et al.*, 2015; Cancer Genome Atlas Network, 2015).

Presence of *TERT* promoter mutation has been associated with worse survival from melanoma (Scolyer *et al.*, 2018; Maibach *et al.*, 2020). This effect was modified by a common polymorphism *rs2853669* within the *TERT* promoter that disrupts a preexisting non-canonical *ETS2* site in the proximal region of the *TERT* promoter immediately adjacent to an E-box (Nagore *et al.*, 2014). Further, *TERT* promoter mutations in spitzoid melanocytic neoplasms were reported to predict aggressive clinical behavior (Dougan *et al.*, 2018). Our results indicate that hotspot *TERT* promoter mutation status may be a useful ancillary parameter for the diagnosis of melanoma.

It is well known that *TERT* mutations enhance the expression of the *TERT* gene by creating de novo binding sites for different transcription factors involved in tumorigenic mechanisms, but its prognostic role is debated (Scolyer *et al.*, 2018). Several authors have reported a prognostic significance of *TERT* promoter mutations in primary melanomas (Eigentler *et al.*, 2016; Tas *et al.*, 2019; Bucheit *et al.*, 2013; Jakob *et al.*, 2012; Grimaldi *et al.*, 2017; Horn *et al.*, 2013), whereas other studies (Barnhill *et al.*, 1996; Tuthill *et al.*, 2002) found no impact in primary and metastatic melanoma.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Design of the study

One hundred fifty patients who underwent melanoma stage IA-IIC surgical treatment at Riga East University Hospital, Latvian Centre of Oncology Riga, Latvia, in 2012–2018 were retrospectively enrolled in the study. Only patients with primary cutaneous nodular or superficial spreading malignant invasive melanoma were enrolled in this study. The study design was presented in Table I.

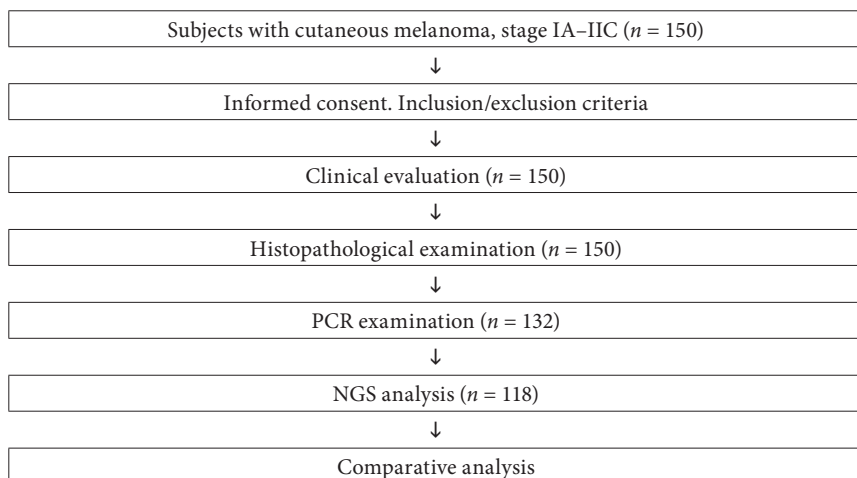
2.2. Ethics

The study protocol was approved by the Central Medical Ethics Committee of Latvia (No. 01-29.1/2016-1-1 from January 2016) and the Ethical Committee of Institute of Cardiology and Regenerative Medicine, the University of Latvia (from September 2019; No. 12/2019). The study conducted according to the declaration of Helsinki and Oviedo Convention. All patients signed informed consent to participate in the study.

2.3. Exclusion criteria

Patients with lentigo maligna, acral lentiginous melanomas, non-cutaneous and metastatic melanoma as well as patients who had stage III and IV melanoma or who had undergone neoadjuvant treatment were excluded from the study.

Table 1. Study design



2.4. Clinical characteristics

Clinical characteristics of melanoma patients such age, gender, tumor location, size were analyzed. Various clinical factors – age, gender, length of follow-up after surgery, recurrence, or metastasis – were obtained from medical records. Progression-free survival time was defined as local, regional, or systemic metastasis or death from the date of surgical excision of tumor estimated from the surgical resection date to the first loco-regional or systemic metastasis, or death without any type of relapse. The patients were follow-up till 1 March 2022. During follow-up, the disease progression was defined as at least one of such features was observed – local recurrence, regional lymph node metastasis, distant metastasis.

Histopathological characteristics

The histopathological characteristics of melanoma were reviewed according to the current *WHO (World Health Organization)* and *CAP (College of American Pathologists)* guidelines (Scolyer *et al.*, 2018). Such characteristics as tumor type, ulceration, tumor infiltrating lymphocytes, Clark invasion level, Breslow thickness, lymphovascular invasion, neurotropism, regression, and mitotic activity was assessed. In addition, the excision lines and distance from the tumor were recorded. The pTNM staging was determined on the basis of histopathological re-assessment of all samples. All histopathological slides were re-reviewed and assessed according to current WHO classification (Scolyer *et al.*, 2018).

2.5. Evaluation and scoring of tumor infiltrating lymphocytes

Tumor infiltrating lymphocytes were defined as lymphocytes surrounding the tumor mass. The tumor infiltrating lymphocytes (TIL) was scored from 0 to 3 The scoring was defined as follows: 0 = absence of TIL within the tumor tissue, 1 = TIL infiltrate less than 25% of the tissue, 2 = TIL infiltrate 25 to 50% of the tissue, and 3 = TIL infiltrate more than 50% of tissue.

2.6. *BRAF* and *NRAS* mutations evaluation

BRAF and *NRAS* mutational status was assessed in 132 patients. Genomic DNA was isolated from 10 µm sections cuts from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using *GeneRead™* DNA FFPE kit (*Qiagen, Germany*).

The melanoma *BRAF* and *NRAS* mutations status was assessed by digital droplet PCR (ddPCR) using *BRAF* V600 (#12001037 and # 1863100), *NRAS* Q61 (#12001006) and *NRAS* G12/G13 (#12001627) Screening Assays (all *Bio-Rad, USA*) as per the manufacturer's instructions.

For *BRAF* V600-V600E (NM_004333.4(*BRAF*):c.1799T>A (*p.Val600Glu*)), V600K (NM_004333.4(*BRAF*):c.1798-1799GT>AA (*p.Val600Lys*)) and V600R

(NM_004333.4(BRAF):c.1798-1799GT>AG (*p.Val600Arg*)) were assessed. In addition, BRAF V600 positive samples were tested for the presence of the *BRAF V600E* mutation using *BRAF V600E* Mutation Assay Kit (#1863100, *Bio-Rad*, USA) that specifically recognizes NM_004333.4(BRAF):c.1799T>A (*p.Val600Glu*) mutation.

For *NRAS* G12/G13 such eight mutations were assessed G12A (NM_002524.5(NRAS):c.35G>C (*p.Gly12Ala*)) G12C (NM_002524.5(NRAS):c.34G>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*)).

For *NRAS* Q61 five *NRAS* mutations were assessed – 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*)) and Q61H 183A>C, (NM_002524.5(NRAS):c.183A>C (*p.Gln61His*)).

Droplets were generated using *Biorad QX200* Droplet Generator and analyzed with *QX200* Droplet Reader (*Bio-Rad*, USA). Absolute quantifications of mutant and wild-type alleles were estimated by modeling the Poisson distribution using *QuantaSoft*TM analysis software version 1.7 (*Bio-Rad*, USA).

Mutation nomenclature is in agreement with the current HGVS, *Human Genome Variation Society guidelines* (den Dunnen *et al.*, 2016). The reported nucleotide and amino acid numbering are relative to the transcription start site (+1), corresponding to the A of the ATG on the relevant *GenBank* reference sequence.

2.7. NGS testing

TERT mutational status was assessed in 118 patients. The C228T (NM_198253.3(*TERT*): c.-124C>T) point mutation (*chr5*; 1,295,228 (-124) upstream of the transcription start codon) and C250T substitution (*chr5*; 1,295,250 (-146) upstream of the transcription start codon), NM_198253.3(*TERT*):c.-146C>T was analyzed.

Genomic DNA was isolated from FFPE samples to prepare the NGS library. DNA was diluted in low TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0) with 0.1 mM EDTA] and sheared by ultrasound (*Covaris E220*; *Covaris*, Chicago, IL, USA) to approximately 200 bp fragments checked using *Agilent High Sensitivity DNA Kit* on the 2100 *Bioanalyzer* (*Agilent*, Santa Clara, CA, USA). The subsequent end-repair, A-tailing, and ligation of adapters were performed using the *KAPA HTP Library Preparation kit* (*Roche*, Basel, Switzerland) according to the manufacturer with in-house prepared adapters. The processed fragments were size-selected (targeting 250–450 bp fragments) and primed with barcodes

(identical to *Illumina TruSeq* HT index i7 and i5) by ligation-mediated PCR (LM-PCR), using in-house prepared double-indexing primers, to distinguish individual samples in subsequent pooling. The size and quality of fragments after the dual size selection and LM-PCR were controlled using *Agilent* High Sensitivity DNA Kit.

The *Qiagen* pac-cancer-multimodal panel gene kit was used (Cat. No. / ID: 334942). The kit analyzed 523 DNA gene targets, 56 RNA fusion targets, 26 microsatellite instability (MSI). 150 paired-end sequencing (300 cycles) was performed.

Thirty individual samples (33 ng each) were pooled for enrichment and hybridized for 72 h with the CZMELAC panel probes (*SeqCap EZ Choice Library*; *Roche*, Basel, Switzerland). The enriched targeted sequences were amplified by post-capture PCR to create the final sequencing library. The enrichment was controlled using qPCR (*NimbleGen SeqCap EZ Library SR User's Guide*). The library insert size was approximately 150 bp. The final 15 μ M library was sequenced on *MiSeq* using *MiSeq* Reagent Kit v. 3 (150 cycles; *Illumina*, San Diego, CA, USA) targeting 100 \times mean coverage per sample.

QIAGEN Clinical Insight (*QCI*) Interpret software was used the data analysis and interpretation.

2.8. Statistical analysis

The results were reported as median (range). Histopathologic and clinical characteristics were analyzed using the Chi-square, Mann–Whitney U test and/or the Kruskal–Wallis rank test. Association of mutation status with clinical and histopathological characteristics was analyzed by using Pearson X² to calculate statistical significance. Progression-free survival (PFS) was estimated with the Kaplan–Meier method with the log-rank test. Time was defined as the event of disease progression or last follow-up visit (censored).

Statistical calculations were performed with SPSS version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1. Clinical characteristics

Altogether, 150 patients were enrolled in the study. 12 patients had stage IA, 20 patients had stage IB, 32 patients had stage IIA, 34 patients had stage IIB, and 52 patients had stage IIC melanoma. The median age was 67 years (range 24–87). 69 patients were males, and 81 patients were females. Primary tumor localization was head/neck, limbs, and trunk in 22.0%, 38.0%, and 40.0% of patients, respectively (Table 2).

Table 2. Clinicopathological characteristics of enrolled study subjects

Variables	Patients, <i>n</i>
Median age, years, n (range)	67 (24–87)
Gender, male/female	69/81
Median Breslow thickness, mm, n (range)	2.4 (0.1–20)
Median Clark level, n (range)	3 (1–5)
Ulceration, present/absent	71/79
LVI, present/absent	89/61
Neurotropism, present/absent	6/141
Median solar elastosis, n (range)	1 (0–3)
Median tumor size, cm, n (range)	1.5 (0.2–20.0)
Median mitotic count, 10 HPF, n (range)	2 (1–18)
Median TIL, score (range)	2 (0–3)
Stage IA	12
Stage IB	20
Stage IIA	32
Stage IIB	34
Stage IIC	52

TIL – tumor infiltrating lymphocytes

LVI – lymphovascular invasion

3.2. Histopathological characteristics

There were 89 cases of nodular melanoma and 61 cases with superficial spreading melanoma. Nodular melanoma compared to the superficial spreading melanoma had a higher Clark level of invasion ($P = 0.04$), greater Breslow

thickness ($P = 0.04$), more frequent ulceration ($P = 0.01$), a higher mitotic count ($P < 0.0001$) and greater tumor size ($P = 0.002$). The nodular melanoma was more frequently found in males compared to females ($P = 0.0083$). The lymphovascular invasion, neurotropism, and solar elastosis did not significantly differ between the groups. However, the association between the solar elastosis and Clark level was observed when all patients were analyzed together ($R^2 = 0.08$; $P = 0.02$) (Table 3).

Table 3. Clinicopathological characteristics of patients

Variables*	Nodular melanoma (n = 89)	Superficial spreading melanoma (n = 61)	P-value
Median age (range), years	67 (27–87)	64 (24–83)	0.23
Gender, male/female	33/56	17/44	0.0083*
Median Breslow thickness (range), mm	3.0 (0.1–20.0)	1.3 (0.1–14.9)	0.04**
Median Clark level (range)	3.0 (2–5)	3 (1–5)	0.04**
Ulceration, present/absent	56/33	15/46	0.002*
LVI, present/absent	71/18	39/22	0.64
Neurotropism, present/absent	9/80	7/54	0.72
Median solar elastosis, range	1.6 (0–3)	1.2 (0–3)	0.32
Median tumour size (range), cm	1.7 (0.4–6.6)	1.2 (0.2–6.1)	0.002**
Median mitotic count, (range), 10 HPF	4.0 (1–7)	2.0 (1–4)	<0.0001**

* Number of patients in each group was presented in Table 1.

LVI–lymphovascular invasion

HPF–high powered field

TIL–tumor infiltrating lymphocytes

$P \leq 0.05$ are indicated in bold

* Chi-squared test

** Mann-Whitney U test

3.2. TIL in patients with nodular and superficial spreading melanoma

Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) were identified in 132 patients (88.0%). The representative microphotograph of TILs in melanoma was presented in Figure 1. The patients with nodular melanoma had predominantly low-grade TIL infiltration (score 1) compared to patients with superficial spreading melanoma ($P = 0.004$). A significant correlation between TIL score (both low and high) and female gender ($R^2 = 0.06$; $P = 0.0248$) and tumor size ($R^2 = 0.02$; $P = 0.0047$) has been observed in nodular melanoma and between TILs and mitotic count ($R^2 = 0.02$; $P = 0.018$) in superficial spreading melanoma (Table 4).

Table 4. Association analysis of TIL with clinicopathological characteristics

Variables*	Superficial spreading melanoma	Nodular melanoma
Age, years	$P = 0.1$	$P = 0.8$
Female gender	$P = 0.2$	$R^2 = 0.06$; $P = 0.0248$
Breslow thickness	$P = 0.2$	$P = 0.1$
Clark level	$P = 0.3$	$P = 0.5$
Ulceration	$P = 0.09$	$P = 0.09$
LVI	$P = 0.1$	$P = 0.2$
Solar elastosis	$P = 0.2$	$P = 0.5$
Median tumour size	$P = 0.4$	$R^2 = 0.02$; $P = 0.0047$
Median mitotic count	$R^2 = 0.02$; $P = 0.018$	$P = 0.5$

* Number of patients in each group was presented in Table 1.

TIL – tumor infiltrating lymphocytes

LVI – lymphovascular invasion

Pearson's chi-squared test. $P \leq 0.05$ are indicated in bold

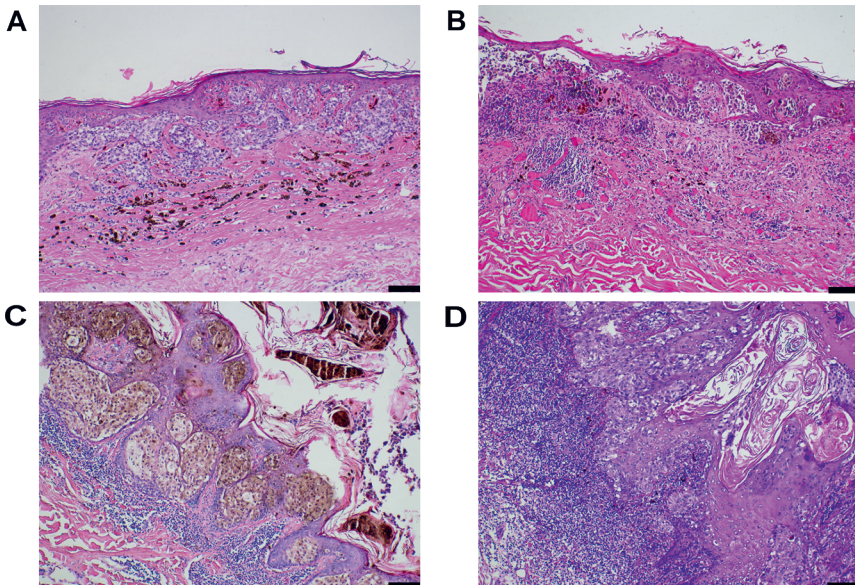


Figure 1. Representative photomicrograph demonstrating tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) in malignant melanoma

(A) Absent TIL infiltration score 0; (B) mild TIL infiltration, score 1, (C) moderate TIL infiltration, score 2; (D) prominent TIL infiltration, score 3. Hematoxylin-eosin staining method, magnification $\times 100$, scale bar = 100 μm

In addition, when patient's progression-free survival (PFS) was compared based on the presence of TILs (both low and high grade), the patients with high TILs had significantly better prognosis compared to patients with low TIL grade (Fig. 2).

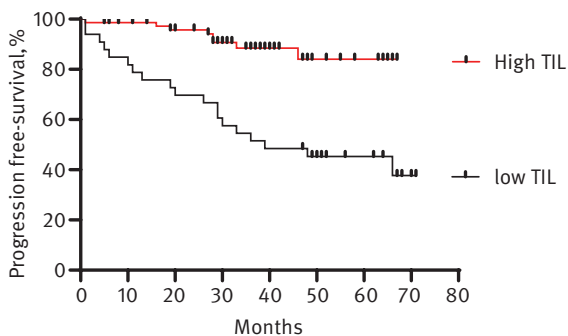


Figure 2. Progression-free survival in melanoma with high and low TIL infiltration

Kaplan-Meier plot was analysed using a log-rank (Mantel-Cox) test. $P < 0.0001$. TIL, tumor-infiltrating lymphocyte

3.4. *BRAF* mutational status and its correlation with clinicopathological characteristics

BRAF mutational testing was performed in 132 patients. 70 patients demonstrated *BRAF* mutations (in 53.3%). From those 67 patients had *BRAF V600E* mutation (NM_004333.6(*BRAF*): c.1799_1800delinsAA (p.Val600Glu)) and 4 patients had *BRAF V600K* (NM_004333.6(*BRAF*):c.1798_1799delinsAA (p.Val600Lys)) or *V600R* mutation (NM_004333.6(*BRAF*):c.1798_1799delinsAG (p.Val600Arg)).

The associations of *BRAF V600* mutational status and Breslow thickness ($P = 0.020$; $\chi^2 = 0.07$), patient gender ($P = 0.009$; $\chi^2 = 0.09$), Clark level ($P = 0.005$; $\chi^2 = 0.11$) and peritumoral lymphocytes infiltration, TIL ($P = 0.045$; $\chi^2 = 0.06$) was observed. However, the association between the disease stage, patient age, solar elastosis, ulceration, median tumor size and *BRAF* mutational status was not demonstrated (Table 5).

Table 5. Association analysis of *BRAF (V600)* mutation with clinicopathological characteristics

Variables*	Pearson's R^2	P -value
Age, years	$R^2 = 0.12$	$P = 0.002$
Female gender	$R^2 = 0.09$	$P = \mathbf{0.009}$
Breslow thickness	$R^2 = 0.07$	$P = \mathbf{0.02}$
Clark level	$R^2 = 0.11$	$P = \mathbf{0.005}$

Variables*	Pearson's R^2	P-value
Ulceration	$R^2 = 0.03$	$P = 0.15$
LVI	$R^2 = 0.07$	$P = \mathbf{0.02}$
Solar elastosis	$R^2 = 0.03$	$P = 0.2$
Median tumour size	$R^2 = 0.001$	$P = 0.8$
Median mitotic count	$R^2 = 0.06$	$P = \mathbf{0.04}$
TIL	$R^2 = 0.06$	$P = \mathbf{0.045}$

* Number of patients in each group was presented in Table 1.

TIL – tumour infiltrating lymphocytes; LVI – lymphovascular invasion

Pearson's chi-squared test. $P \leq 0.05$ are indicated in bold

3.5. NRAS mutational status and its correlation with clinicopathological characteristics

NRAS mutational testing was performed in 132 patients. NRAS mutation was found in 39 out of 132 patients (29.6%). Twenty-eight melanoma was both NRAS and BRAF co-mutant. Twenty-nine patients had NRAS Q61 mutation and 10 patients had NRAS G12, G13 mutations.

The NRAS mutational status was associated with Breslow thickness ($P = 0.04$; $\chi^2 = 0.16$), disease stage ($P = 0.02$; $\chi^2 = 0.20$), mitotical activity ($P = 0.030$; $\chi^2 = 0.190$) and lymphovascular invasion ($P = 0.020$; $\chi^2 = 0.200$). However, the association between the Clark level of invasion, solar elastosis, TIL, patient age, patient gender and NRAS mutational status was not demonstrated (Table 6).

Table 6. Association analysis of NRAS (codon Q61 and codon G12/G13) mutation with clinicopathological characteristics

Variables*	Pearson's χ^2 value	P-value
Age, years	0.007	0.760
Gender	0.006	0.960
Breslow thickness	0.160	0.040
Clark level	0.009	0.260
Ulceration	0.006	0.400
LVI	0.200	0.020
Solar elastosis	0.004	0.800
Median tumour size	0.026	0.080
Median mitotic count	0.190	0.030
TIL	0.050	0.420
Disease stage (pTNM)	0.200	0.020

* Number of patients in each group was presented in Table 1.

TIL – tumour infiltrating lymphocytes; LVI – lymphovascular invasion; Pearson's chi-squared test.

$P \leq 0.05$ are indicated in bold

3.6. Genetical mutations in melanoma by panel sequencing (unpublished data)

Other the most common mutations of melanoma were *TP53*, *CDK4*, *NF1* and *FGFR1* (Table 7). The association between clinicopathological characteristics and *NF1*, *ARID1A*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *DDR1*, *EFGFR1*, *EZH2*, *ROS1*, *SLX4*, *EBB3*, *MET*, *MDM2* has not been demonstrated. However, the association between *TP53* mutation and Breslow thickness and TIL infiltration was observed ($P = 0.02$ and $P = 0.01$). In addition, the association between *CDK4* mutation and solar elastosis was observed ($P = 0.02$). The association between *FGFR1* mutation and lympho-vascular invasion and TIL infiltration was observed ($P = 0.002$ and $P = 0.004$).

3.7. *TERT* mutational status and its association with clinicopathological characteristics

TERT mutational status was assessed in 118 patients. *TERT* mutation was observed in 38 patients of 118 (32.2%). The C228T (*NM_198253.3(TERT):c.-124C>T*) point mutation (*chr5; 1,295,228 (-124)* was identified in 12/38 (31.6%) cases, whereas the C250T substitution, *NM_198253.3(TERT):c.-146C>T (chr5; 1,295,250 (-146)* upstream of the transcription start codon)) was observed in 26/38 (68.4%) cases. The association between *TERT* mutation and Breslow thickness, patient age, mitotic activity and TIL infiltration was observed ($P = 0.02$; $P = 0.004$; $P = 0.007$ and $P < 0.0001$, respectively).

Table 7. Genetical mutations in melanoma (except *BRAF*, *NRAS* and *TERT*)

Gene	Patients, <i>n</i> (mutation)
<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(ZAR1L): 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>EFGFR1</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

Table 8. Association analysis of *TERT* promoter mutation with clinicopathological characteristics

Variables, <i>n</i> = 119	Pearson's χ^2 value	<i>P</i> -value
Age, years	0.18	0.004
Gender	0.053	0.43
Breslow thickness	0.09	0.02
Clark level	0.06	0.420
Ulceration	0.007	0.420
LVI	0.20	0.018
Solar elastosis	0.018	0.12
Median tumour size	0.08	0.12
Median mitotic count	0.12	0.0070
TIL	0.18	0.0001
Tumour type (nodular vs. superficial)	0.14	0.01
Disease stage (pTNM)	0.34	0.09

TIL – tumor infiltrating lymphocytes

LVI – lymphovascular invasion

Pearson's chi-squared test. *P* ≤ 0.05 are indicated in bold

3.8. The value of histopathological and *BRAF*, *NRAS* and *TERT* mutational status on progression free survival in melanoma

BRAF mutation status and Progression-free survival, PFS

All 150 patients were clinically followed up, and there were 37 incidences of locoregional recurrence or systemic metastasis (24,66%). The PFS did not differ between wild type and *BRAF* mutant melanoma (*HR* = 1.10; 95%, *C.I* = 0.40–2.50, *P* = 0.20).

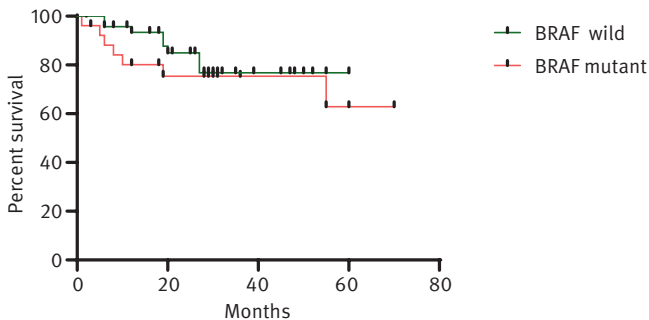


Figure 3. Progression-free survival in *BRAF* mutant and *BRAF* wild melanoma
Kaplan-Meier plot using the log-rank (*Mantel-Cox*) test, *P* > 0.05

NRAS mutation status and Progression-free survival

Patients with *NRAS* mutant melanoma had significant worse PFS compared to *NRAS* wild type melanoma ($HR = 12.30$; 95%, $C.I = 5.78-26.21$, $P < 0.0001$).

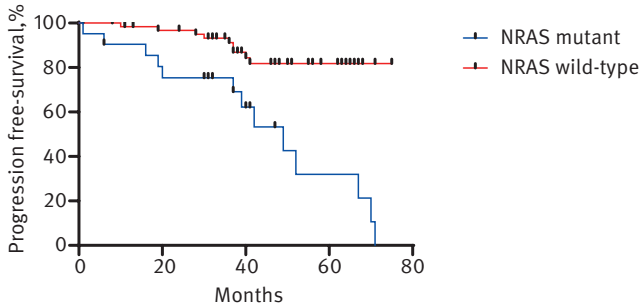


Figure 4. Progression-free survival in patients with *NRAS* mutant and *NRAS* wild melanoma

Kaplan-Meier plot was analyzed using a log-rank (*Mantel-Cox*) test. $P < 0.0001$

TERT mutation status and Progression-free survival

Patients with *TERT* mutation had significant worse PFS compared to *TERT* wild melanoma ($HR = 13.8$, 95% $C.I = 6.8-31.0$; $p < 0.0001$).

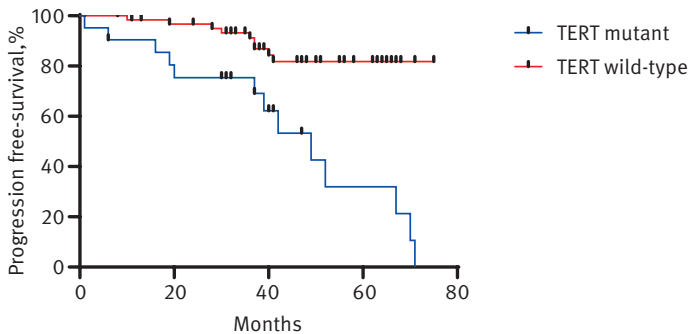


Figure 5. Progression-free survival in patients with *TERT* mutant and *TERT* wild melanoma

Kaplan-Meier plot was analyzed using a log-rank (*Mantel-Cox*) test. $P < 0.0001$

The value of co-mutation on progression free survival

BRAF and *NRAS* co-mutant melanoma has significant worse PFS compared to *BRAF* mutant melanoma ($HR = 6.30$; 95% $CI = 3.10-12.70$, $P < 0.0001$).

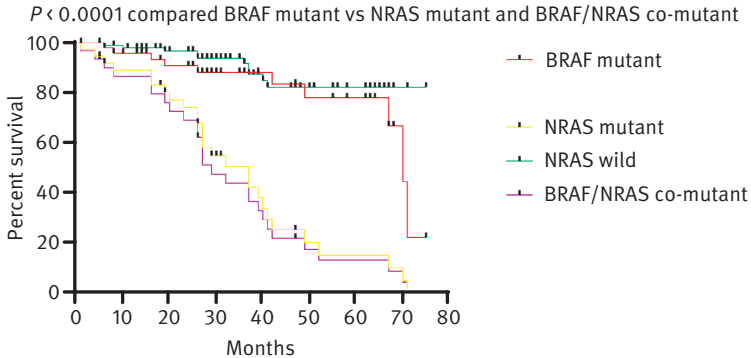


Figure 6. Progression-free survival in patients with *BRAF*/*NRAS* co-mutant melanoma, *NRAS* wild, *NRAS* mutant and *BRAF* mutant melanoma

Kaplan-Meier plot was analyzed using a log-rank (*Mantel-Cox*) test. $P < 0.0001$

In addition, *TERT* and *BRAF* co-mutant melanoma has significant worse PFS compared to *BRAF* mutant melanoma ($HR = 8.25$; 95% $CI = 2.90-13.40$, $P < 0.0001$), Figure 7.

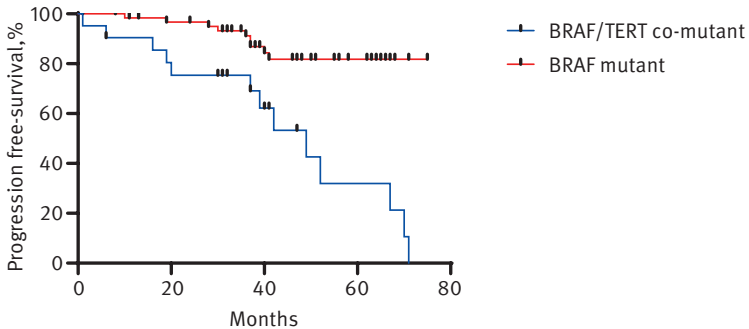


Figure 7. Progression-free survival in patients with melanoma. *BRAF* mutant vs *BRAF* and *TERT* co-mutant melanoma

Kaplan-Meier plot was analyzed using a log-rank (*Mantel-Cox*) test. $P < 0.0001$

Progression free survival and tumour infiltrating lymphocytes (TIL)

All 150 patients were clinically followed up, and there were 37 incidences of locoregional recurrence or systemic metastasis. When patient's progression-free survival (PFS) was compared based on the presence of TILs (both low and high grade), the patients with high TILs had significantly better prognosis compared to patients with low TIL grade ($HR = 4.9$, 95% $CI = 2.3-11.20$, $p < 0.0001$) (Figure 8).

In addition, patient with *TERT* mutation and low TIL had significant better PFS compared to patients with *TERT* mutation and high TIL infiltration ($HR = 4.80$; 95%, $C.I = 2.30-7.890$, $P = 0.002$).

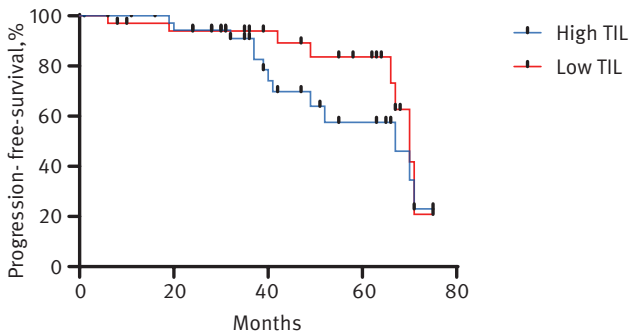


Figure 8. Progression-free survival in *TERT* mutant melanoma with high and low TIL infiltration

Kaplan-Meier plot using the log-rank (*Mantel-Cox*) test, $p < 0.0001$

4. DISCUSSION

In the current study genotype-phenotype associations in 150 patients with Stage IA–IIC according to AJCC classification were assessed in malignant invasive melanoma.

Histopathological examination of melanoma is currently a gold standard for the diagnosis of melanoma. In addition, such histopathological characteristics of invasive cutaneous melanoma as tumor size and type, lymphovascular invasion, ulceration, Breslow thickness, Clark level of invasion, mitotic rate and disease are well established powerful prognostic and predictive factors for melanoma (Shellenberger *et al.*, 2016; Bastian *et al.*, 2014; Clark *et al.*, 1989; Scolyer *et al.*, 2018). The development of melanoma is closely related to somatic and epigenetic changes. Activating mutations of the oncogenes *BRAF* and *NRAS* are of particular importance in melanoma progression (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). In addition, *BRAF* personalized treatment of melanoma significantly improved patients' prognosis (Rose *et al.*, 2006; Michielin *et al.*, 2019; Cancer Genome Atlas Network, 2020). However, the prognostic value of *BRAF* and *NRAS* mutation and its association with clinical and histopathological characteristics is still controversial, especially in early-stage melanoma.

Conventional prognostic characteristics of melanoma include melanoma type, lymphovascular invasion, ulceration, stage, Breslow thickness and mitotic rate, all of which are currently mandatory histopathologically assessed criteria in all primary melanomas (Scolyer *et al.*, 2018). TIL produced by the immune system in response to the invasion by the tumor, are frequently observed in tumor microenvironment, including those associated with cutaneous melanoma (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).

However, there is an unresolved debate in the literature whether the TIL grade is robust enough as a prognostic feature to be included in AJCC staging (Scolyer *et al.*, 2018). Immune measures, especially TIL grade, are not standard components for melanoma pathology reports because they have not yet been validated and appreciated to impact overall survival or clinical management significantly (8). Furthermore, the association of TIL with an improved prognosis in melanoma remains controversial (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).

Different histopathological approaches for grading TILs have been described (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). Firstly, Clark's method graded TILs as absent, non-brisk, and brisk (Clark *et al.*, 1989). Other studies graded TILs on a scale of 0 to 3 or only consider TILs as "present" or "absent" (Burton *et al.*, 2011; Mandala *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2013; Clemente *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 2016; Tas *et al.*, 2021). Some studies use a combined grading system by assessing TIL density and distribution by a final score from 0 to 6 (Maibach *et al.*, 2020).

Previous studies have focused on the prognostic significance of TILs in primary melanoma (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). However, the results are controversial. Several studies did not demonstrate the association between TIL presence and disease-free survival (Maibach *et al.*, 2020). Other studies showed a significant correlation between the TIL infiltration and patients' survival (Azimi *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2015; Burton *et al.*, 2011; Mandala *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2013).

Our study showed that high TIL infiltration in primary Stage I–II melanoma corresponded to a better prognosis, while low TIL infiltration demonstrated worse PFS. Recently, it was shown that brisk TIL grade is a favorable prognostic factor in primary melanomas and is a distinct group from non-brisk TIL grade based on disease progression and immunoregulatory gene expression profiles (Thomas *et al.*, 2013). Besides, TIL grade is an independent predictor of survival and SLN status in patients with melanoma. Patients with a pronounced TIL infiltrate overall have a better prognosis (Azimi *et al.*, 2012), and high levels of TILs in primary invasive melanoma are associated with favorable survival outcomes (Azimi *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2015; Maibach *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2017).

Our results were consistent with a recent study demonstrated that coexistence of tumor regression and TIL is associated with more favorable survival in melanoma (Clemente *et al.*, 1996).

However, in our study the association between tumor regression and TIL has not been demonstrated. This could be explained that in our study only patients with stage IA–IIC were enrolled.

In our study, the patients with nodular melanoma demonstrated downregulation of TIL compared to superficial spreading melanoma. Previous studies have demonstrated decreased TILs in nodular melanomas compared with matched superficial spreading ones (Weiss *et al.*, 2016). However, this observation was found only in thin (≤ 2 mm) melanomas and in males' patients (Weiss *et al.*, 2016). These findings suggested the differences in immunological response between the gender and tumor thickness. Furthermore, the tumor stage and immunologic heterogeneity of tumor-infiltrating lymphocyte subpopulation could contribute to it (Tas *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2016; Weiss *et al.*, 2016).

BRAF mutations in primary melanomas are seen at a rate of 22%–72% (Platz *et al.*, 2008; Yaman *et al.*, 2015; Bezic *et al.*, 2019; Spathis *et al.*, 2019;

Kim *et al.*, 2015). In our study, *BRAF* V600 mutation was found in 53.3% of all cases analyzed.

Previous studies showed the different value of *BRAF* mutational status in association with clinicopathological characteristics and PFS of melanoma (Bezic *et al.*, 2019; Spathis *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2015; Estrozi *et al.*, 2014).

It has been demonstrated that *BRAF* mutational status correlate with younger age and female gender (Platz *et al.*, 2008).

Age is an independent negative predictor of melanoma survival (Platz *et al.*, 2008). Nonetheless, the melanoma association with gender appears to be controversial. There are studies demonstrating associations with the male gender (Yaman *et al.*, 2015) and other studies showing associations with the female gender (Bezic *et al.*, 2019). Varying patterns of immunological responses might be involved in the age and gender differences of melanoma prognosis (Platz *et al.*, 2008).

Previous studies demonstrated the association of *BRAF* mutational status and tumor ulceration, solar elastosis, advanced melanoma stage and histologic subtype (Nu *et al.*, 2020; Rose *et al.*, 2006).

At contrast, in young patients the study showed that there was no significant association between *BRAF* mutational status and gender, histologic subtype, the Clark and Breslow level, solar elastosis and lymphovascular invasion, suggested different tumorigenesis pathways in younger population (Spathis *et al.*, 2019).

The results of our study are consistent with previous findings and extent these by demonstrating that both Clark and Breslow level correlated with *BRAF* mutational status. In addition, the association of *BRAF* mutational status and vascular invasion and TIL has been observed. This observation led us to the suggestion that stage I–II *BRAF* mutant melanoma compared to wild type characterized by more invasive pattern.

Some previous studies have shown the association of *BRAF* mutational status and solar elastosis (Platz *et al.*, 2008). Although, the correlation between *BRAF* mutational status and solar elastosis was not observed in our study. The geographical characteristics and differences in sun exposure could contribute to it.

Some previous studies also demonstrate the association of *BRAF* mutational status and ulceration (Platz *et al.*, 2008; Yaman *et al.*, 2015), while other analyses did not observe a significant association (Bezic *et al.*, 2019).

The association of *BRAF* mutational status with ulceration was not observed in our study. It could be suggested that ulceration in larger tumors could be related to *BRAF* mutational status, however the median tumor size was smaller compared to previous studies (Platz *et al.*, 2008; Yaman *et al.*, 2015).

The value of *BRAF* mutational status and TIL has been addressed in several studies, however, the results were controversial. Our study showed that TIL was upregulated in *BRAF* V600 mutant melanoma compared to *BRAF* wild type. However, some recent studies did not found associations between TIL and *BRAF* mutational status (Platz *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2015).

At contrast, it has been demonstrated that the intratumoral density of TIL was significantly higher in *BRAF* mutant melanoma (Estrozi *et al.*, 2014). Intratumor heterogeneity of melanoma with different cytokine milieu and expression of immunomodulatory genes might contribute to it. In addition, a recent study has demonstrated that higher TIL clusters are associated with response to immunotherapy in *BRAF V600E/K* mutated melanoma (Aksenenko *et al.*, 2015).

Our study showed that *BRAF V600* mutations were identified in 56.8% and *NRAS (Q61; G12 and G13)* mutations in 29.6% of cases. Furthermore, while *BRAF V600* mutational status did not associated with PFS, the *NRAS* mutational status significantly correlated with PFS. In addition, in patients with *BRAF V600* and *NRAS* co-mutant melanoma, the PFS was significantly worse compared to *BRAF V600* mutant melanoma.

BRAF mutations in primary melanomas have been observed at a rate of 22%–72% (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). In our study, the frequency of *BRAF* mutation fall within this range. Over 90% of the mutations in *BRAF* result in substitution of the valine at position 600, resulting in activation of the downstream effectors of the *RAS-RAF-MEK-MAPK* pathway (Hessler *et al.*, 2020).

Furthermore, the associations of *BRAF V600* mutational status and Breslow thickness, patient gender, Breslow thickness and peritumoral lymphocytes infiltration was revealed, which supported our previous evidence (Havel *et al.*, 2019).

Previous studies showed the different value of *BRAF* mutational status in association with clinicopathological characteristics and PFS of melanoma (Burton, *et al.*, 2011; Mandala *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2019; Clemente *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 2016). Our study did not find the association between *BRAF* mutational status and PFS of melanoma.

It has been demonstrated that *BRAF* mutational status correlate with younger age and female gender (Lin *et al.*, 2016; Weiss *et al.*, 2016). However, some studies demonstrated associations between male gender (Mandala *et al.*, 2009). In our study *BRAF* mutation correlated with female gender and older patients' age. This observation could be explained that only early-stage melanoma was enrolled in our study. In addition, some studies showed the importance of immunological tolerance mechanisms in the development of *BRAF* mutant melanoma (Havel *et al.*, 2019; Platz *et al.*, 2008).

Previous studies about *BRAF* and *NRAS* co-mutant melanoma have been discordant. *NRAS* gene mutation was found in 15–25% of melanoma cases (Raaijmakers *et al.*, 2016; Chiappetta *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015). In our study *NRAS* mutation was observed in up to 30% of melanoma cases.

We assume that the high prevalence of *NRAS* mutations could be explained by older median age of enrolled patients in our study, e.g., 67 years. It has

been demonstrated that patients with *NRAS* mutant melanoma compared to *BRAF* mutant melanoma were usually older (>55 years) with previous history of UV exposure. *NRAS* mutant melanoma commonly found in upper extremities and characterized by increased Breslow tumor thickness (Hessler *et al.*, 2020; Raaijmakers *et al.*, 2016; Chiappetta *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015).

The results of our study showed that *NRAS* (Q61; G12 and G13) mutations associated with Breslow thickness, nodular melanoma tumor type, mitotic activity and lymphovascular invasion. In addition, we assume that *NRAS* mutations in primary stage IA–IIC melanoma could have potentially relevant predictive value.

The *NRAS* gene is most frequently mutated at hotspots in exon 2 (codons 12 and 13) and exon 3 (codon 61) [Platz *et al.*, 2008]. *NRAS* mutation characteristic for nodular melanoma localized in sun-damaged skin (Yang *et al.*, 2020).

Nevertheless, the value of *NRAS* mutation on disease progression and prognosis is still controversial. Some studies showed that *NRAS* mutation was associated with favorable prognosis (Platz *et al.*, 2008). At contrast, other studies demonstrated that *NRAS* gene mutation was associated with worse prognosis (Chiappetta *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015; Jakob *et al.*, 2012; Ugurel *et al.*, 2007; Devitt *et al.*, 2011; Heppt *et al.*, 2017). Whereas some studies did not find any significant association between *NRAS* mutation and prognosis of melanoma (Heppt *et al.*, 2017; Ellerhorst *et al.*, 2011).

Similarly, in stage IV melanoma data about *NRAS* mutation is also controversial. While one study suggested that *NRAS*-mutated tumor genotype in metastatic Stage IV melanoma was associated with increased overall survival compared to the *BRAF*-mutated and WT tumor genotypes (Kim *et al.*, 2015). Other studies in opposite did not support this evidence (Leslie *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2021).

In addition, it has been demonstrated that *NRAS* mutation status was an independent predictor of shorter survival after a diagnosis of stage IV melanoma (Jakob *et al.*, 2012).

It could be suggested that molecular mechanisms involving *NRAS* genetic pathway could be different in metastatic Stage IV and early-Stage IA–IIC melanoma.

The results of our research are in line with previous studies demonstrated that *NRAS* mutations associated with higher Breslow's thickness and poor disease prognosis (Chiappetta *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015, Jakob *et al.*, 2012; Ugurel *et al.*, 2007; Devitt *et al.*, 2011). In addition, our study showed that *NRAS* mutations are associated with increased mitotic activity of tumor and lymphovascular invasion, which could be one of potential explanations of aggressive tumor behavior carried *NRAS* mutation. Furthermore, the results of our study demonstrated that *NRAS* mutational status in primary Stage IA–IIC melanoma is a powerful predictive factor, which significantly associated with progression free survival.

NRAS personalized treatment of melanoma is challenging. *Lanafarnib*, *tipifarnib* has been studied for the *NRAS* mutant melanoma (Hessler *et al.*, 2020). In addition, selective MEK inhibitors could have potential benefit in *NRAS* mutant melanoma (Nagore *et al.*, 2014). Nevertheless, the potential significant value of our study is the finding of significant predictive value of *NRAS* mutations in Stage IA–IIC melanoma. Therefore, routine assessment of *NRAS* mutations in Stage IA–IIC melanoma could be potentially beneficial for the prediction of disease progression. It should be stress out that our study subjects included only those with local disease, *e.g.* at the time of diagnosis patients did not have local recurrence, regional lymph node metastasis or distant metastasis.

Third most common mutation in early melanoma was *TERT* gene mutation. The association between *TERT* mutation and Breslow thickness, patient age, mitotic activity, and TIL infiltration was observed in our study. In addition, patients with *TERT* mutation had significant worse PFS compared to *TERT* wild melanoma. The results of our research are in line with previous studies demonstrated that *TERT* promoter mutations were associated with clinical and histopathological characteristics (Horn *et al.*, 2013; Andres-Lencina *et al.*, 2019; Hang *et al.*, 2020). In addition, *TERT* and *BRAF* co-mutant melanoma has significant worse PFS compared to *BRAF* mutant melanoma.

Several limitations of our study should be mentioned. A significantly higher number of case-cohort with equal gender distribution would be beneficial. At the same time, the strength of the present study was the demonstration of significant role of *NRAS* and *BRAF/NRAS* mutational status in patients with early-stage IA–IIC non-metastatic melanoma. Furthermore, all patients were enrolled from the single oncology hospital, which served up to 85% of all melanoma cases in Latvia.

To conclude, the patients with *TERT/BRAF* and *NRAS/BRAF* co-mutant Stage IA–IIC melanoma had worse progression free survival compared to *NRAS* wild, *TERT* wild and *BRAF* wild melanoma. The complex *BRAF*, *TERT* and *NRAS* assessment in melanoma in routine clinical practice is beneficial for the risk stratification of disease progression and therefore could be recommended in routine clinical practice also for patients with Stage IA–IIB melanoma.

5. CONCLUSIONS

During the work, the hypothesis initially put forward was confirmed: the associations between the clinical, histopathological, and genetic characteristics in patients with early-stage melanoma were observed. In addition, the associations between histopathological characteristics and *BRAF*, *NRAS*, *TERT* mutational status were found. Based on the results of the work, the following conclusions have been made:

1. Patients with Stage IA–IIC nodular melanoma had a higher Clark level of invasion, greater Breslow thickness, more frequent ulceration, a higher mitotic count, a greater tumor size and low-grade tumor infiltrating lymphocytes infiltration (TIL) compared to Stage IA–IIC superficial spreading melanoma. In addition, the nodular melanoma was more frequently found in males compared to females.
2. The clinical characteristics such as tumor size and patients gender correlated with histopathological characteristics of melanoma. In addition, TIL was associated with disease progression free survival, clinical and histopathological characteristics.
3. *BRAF V600* mutation was found in 53.3% of cases. *NRAS* mutation was found in 29.6%. 29 patients had *NRAS Q61* mutation and 10 patients had *NRAS G12*, *G13* mutations. 21.21% of melanoma cases was both *NRAS* and *BRAF* co-mutant. *TERT* promoter mutation was observed in 32.2% cases. The C228T (*NM_198253.3(TERT):c.-124C>T*) was identified in 12/38 (31.6%) cases, whereas the C250T substitution, *NM_198253.3(TERT):c.-146C>T* was observed in 26/38 (68.4%) cases.
4. The association between *BRAF*, *NRAS* and *TERT* mutational status and clinical, histopathological characteristics were demonstrated. The associations of *BRAF V600* mutational status and Breslow thickness, patient gender, Clark level, lymphovascular invasion (LVI), mitotic count and TIL infiltration was observed. The *NRAS (Q61; G12, G13)* mutational status was associated with Breslow thickness, disease stage, mitotic activity and LVI. The association between *TERT* promoter mutation and Breslow thickness, patient age, mitotic activity, and TIL infiltration was found.
5. Stage IA–IIC melanoma patients with high TIL infiltration had significantly better Progression-free survival (PFS) compared to patients with low TIL infiltration. The PFS did not differ between wild type and *BRAF* mutant melanoma. However, patients with *NRAS* mutant melanoma had significant worse PFS compared to *NRAS* wild type melanoma. In addition, patients with *TERT* promoter mutation had significant worse PFS compared to *TERT* wild melanoma. Furthermore, the patients with *TERT/BRAF* and *NRAS/BRAF* co-mutant Stage IA–IIC melanoma had worse PFS compared to *NRAS* wild, *TERT* wild and *BRAF* wild melanoma.

Practical implications and novelty of the study

The complex histopathological evaluation including the assessment of TIL and evaluation *BRAF*, *TERT* and *NRAS* mutational status in early-stage melanoma (Stage IA–IIC) in routine clinical practice is beneficial for the risk stratification of disease progression.

LITERATŪRAS SARAKSTS / REFERENCES

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., García-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., Zurrada, S., Collini, P., Cascinelli, N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*, 77(7), 1303–1310, 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), 564–569, 2016.
20. Dummer R., Ascierto, P. A., Gogas, H. J., Arance, A., Mandala, M., Liszky, 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, 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 J. J. 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., Cricker, 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., Krosgaard, 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.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude first to my family for supporting and believing me.

I am most grateful to my supervisors Professor Sergejs Isajevs and senior researcher, PhD, Dace Pjanova for the opportunity to begin the work, for their great support, persistent motivation and professional orientation which deeply influenced my personal growth not only in melanoma research, but also in pathology and molecular genetics.

My special thanks to the researcher of Latvian Biomedical Research and Study Centre Madara Kreismane for her invaluable support in genetical testing of melanoma tissue samples.

I am truly thankful to my colleagues at the Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Latvia Professor Immanuels Taivans and Assoc. Professor Gunta Strazda for valuable advice and suggestions during the preparation of Doctoral Thesis.

Thanks to my colleagues at Riga East University Hospital, Pauls Stradins University Hospital and Hospital of Traumatology and Orthopaedics for their support and ability to encourage when necessary.

I am truly thankful to the Secretary of Promotion Council of University of Latvia Assoc. Professor Liga Plakane for her practical guidance in the process of promotion.

I am most grateful to Ilze Danusevica, Sigita Kalke and Inga Skendere for their valuable support during PhD study.

I am very appreciating the valuable support during the PhD study and scientific research from the Professor Valdis Folkmanis, Dean of Faculty of Medicine, University of Latvia.

The study was supported by project “Strengthening of the capacity of doctoral studies at the University of Latvia within the framework of the new doctoral model” identification No. 8.2.2.0/20/I/006.