

Куницына Анастасия Владимировна

научный сотрудник, ассистент

Королева Анастасия Константиновна

лаборант-исследователь

Ачилов Атабег Батырович

магистрант, младший научный сотрудник

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-106992

ОЦЕНКА МУТАЦИОННОГО СТАТУСА ГЕНОВ BRAF, NRAS И CDKN2A В ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ОБРАЗОВАНИЯХ КОЖИ

Аннотация: невусы относят к доброкачественным меланоцитарным новообразованиям с неопределённым биологическим потенциалом. Между генами, ассоциированными с невусом и меланомой, а также между фенотипическими и клеточными особенностями невусов и меланомы проявляются выраженные корреляции. В связи с этим для эффективного мониторинга и ранней диагностики меланомы необходим одномоментный мультиплексный скрининг по всем основным драйверным мутациям. В статье отражены результаты молекулярно-генетических исследований мутаций генов BRAF, NRAS и CDKN2A пациентов с гистологическим заключением внутридермальный невус кожи.

Ключевые слова: меланома кожи, внутридермальный невус, *BRAF*, *NRAS*, *CDKN2A*.

Патогенез меланомы и формирование злокачественной меланомы проходит этапы – образование «простых», диспластических невусов, меланомы *in situ* и инвазивной меланомы [3]. Невусы – это доброкачественные меланоцитарные опухоли с неопределённым биологическим потенциалом, которые возникают внутриутробно (врожденные) или после рождения (приобретенные) [10]. «Драйверная» мутация даже в одном меланоците или предшественнике меланоцитов инициирует образование невуса, что приводит к повышению уровня пролиферации. В свою очередь бесконтрольная пролиферация ингибируется неповрежденными клеточными системами защиты, «выполняется» программа старения. Только при появлении дополнительных онкогенных изменений, которые могут обеспечить «уход» от онкоген-индуцированного старения, наблюдается злокачественная прогрессия невуса [2; 4]. У пациентов с множественными невусами процент трансформации в меланому достигает 50%, особенно в условиях повышенного воздействия УФ-излучения [6; 12]. Основную роль в опухолевой трансформации новообразований кожи, как злокачественных, так и доброкачественных (невус), играет активация сигнального пути MAPK (mitogen-activated protein kinase) [17; 18]. Активация пути MAPK происходит за счет мутаций в генах *BRAF* (в 40–60% случаев) и *NRAS* (в 20–25% случаев) и является первым важным фактором для меланоцитарной пролиферации, но недостаточным для трансформации невусов в меланому [17]. *BRAF^{V600E}* является хорошо известной «драйверной» мутацией, которая активирует сигнальный путь MAPK встречающейся при меланоме. Согласно различным литературным данным около 80% доброкачественных образований, которые в основном развиваются в течение первых 25 лет жизни [8], несут мутацию *BRAF* [1, 12]. Мутации гена *NRAS* являются еще одним онкогенным событием в развитии меланомы [7]. Наиболее распространенным

участком мутации является кодон 61 в экзоне 2. Причем замены C181A (Q61K) и A182G (Q61R) обнаруживаются чаще всего. *NRAS*-мутации были обнаружены примерно в 6–20% невусов [21]. При этом мутации в генах *BRAF* и *NRAS* являются взаимоисключающими. Вместе с тем, *BRAF*-негативные опухоли требуют дальнейшего исследования мутационного статуса на наличие мутаций в генах *NRAS*, *NF1* и *c-KIT*.

Второй сигнальный путь, активирующий развитие меланомы – PI3K-AKT-mTOR, является универсальным для большинства клеток, который блокирует апоптоз, рост, пролиферацию клеток, метаболизм. Так, в частности, ген *CDKN2A* является регулятором деления клеток, кодирует два разных белка: INK4A (p16^{INK4A}) и ARF (p14^{ARF} у человека) [19]. Утрата функции INK4A приводит к нарушению регуляции клеточного цикла [9]. Мутации зародышевой линии в p16^{INK4A} обуславливают семейную предрасположенность к меланоме [5]. Поскольку мутантный белок BRAF индуцирует старение клеток за счет повышения экспрессии гена *CDKN2A*, в связи с этим мутации гена *CDKN2A* также наблюдается в случае трансформации невуса в меланому [8].

Таким образом, между генами, ассоциированными с невусом и меланомой, а также между фенотипическими и клеточными особенностями невусов и меланомы проявляются выраженные корреляции [2]. Исходя из выше сказанного и меланома и невусы генетически многолики, в связи с этим для эффективного мониторинга и ранней диагностики меланомы необходим одномоментный мультиплексный скрининг по всем основным драйверным мутациям.

В связи с этим целью нашей работы являлось выявление мутаций генов *BRAF*, *NRAS* и *CDKN2A* пациентов с гистологическим заключением внутридермальный невус кожи.

Материалы и методы. Источником ДНК для молекулярно-генетического анализа на наличие мутаций генов *BRAF*, *NRAS* и *CDKN2A* служили парафиновые срезы с FFPE-блоков 22 пациентов с гистологическим заключением внутридермальный невус кожи (ВДН) (*intradermal naevus cutis*)

топологически различных участков тела, разного пола и возраста. ДНК выделяли с помощью коммерческого набора «ExtractDNA FFPE» (Евроген, Россия), согласно инструкции производителя. Анализ мутаций выполняли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами (табл. 1) к «горячим точкам» генов *BRAF*, *NRAS* и *CDKN2A* (табл. 1) с последующим секвенированием по методу Сенгера.

Секвенирующая амплификация проводилась по стандартному протоколу для набора BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, США), по следующей программе: первичная денатурация при 95°C – 5 минут и 35 циклов в режиме: денатурация – 95°C – 20 сек., отжиг – 62°C – 20 сек., синтез при 72°C – 1 мин.

Прямое секвенирование исследуемых ампликонов по методу Сэнгера проводили с использованием генетического анализатора ABI 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Перевод хроматограмм и обработка результатов секвенирования по Сэнгеру в нуклеотидную последовательность осуществлялся в программе UGENE (Unipro, Russia) с помощью функции выравнивания прочтений на референсную последовательность с корректировкой результатов вручную.

Таблица 1

Ген	Мутация	Праймеры	Длина продукта, пн
<i>BRAF</i>	p.V600E (c.1799T>A)	прямой: ctagtaactcagcagcatctcagg обратный: gaaagcatctcacctcctcctaас	434
<i>NRAS</i>	p.Q61H (c.183R>Y)	прямой: aagctctatcttccttagtgtg обратный: gacaаaccagataggcagaaatgg	409
	p.Q61R (c.182A>G); p.Q61L (c.182A>T)		
	p.Q61K (c.181C>A)		
<i>CDKN2A</i>	p.P114L (c.341C>T)	прямой tgctggaaaatgaatgctctgagc обратный: atgtaggggtacttagacacctgg	403
	p.W110* (c.330G>A)		
	p.W110* (c.329G>A)		
	p.R80* (c.238C>T)		
	p.R58* (c.172C>T)		
	p.Q50* (c.148C>T)	прямой ctattcctcttcttggtcc обратный: agcaccggaggaagaaagaggag	466
	p.P48L (c.143C>T)		

Результаты и их обсуждение. При микроскопировании гистологических препаратов невусов кожи, окрашенных гематоксилин-эозином отмечено: у 9-ти из 22-х пациентов невоидные клетки с выраженным пигментным компонентом (ПК), что составляет 40,9% (рис. 3) от общей выборки.

От общей выборки пациенты женского пола составляли большую часть (табл. 2). В зависимости от возраста выделили 4 группы – 18–30 лет, 31–45 лет, 46–60 лет и более 61 года (рис. 2). Образования преимущественно располагались на туловище, то есть на участках кожи не подверженных постоянному солнечному излучению, реже – на лице, и в меньшей степени – в области верхней и нижней конечности (табл. 3). Относительно локализации невусов в литературных источниках приводятся различные данные, так, например, Prata A.Y в своей работе отмечает, что чаще всего невусы локализуются на лице и волосистой части головы, теле, конечностях и некоторых областях, часто подвергающихся воздействию солнечных лучей [11].

Таблица 2

Пол пациентов (n = 22)

<i>Характеристика</i>		<i>Кол-во – n пациентов, %</i>
<i>Пол</i>	женский	17 (77,3)
	мужской	5 (22,7)

Таблица 3

Локализация невусов (n = 22)

<i>Характеристика</i>		<i>Кол-во – n пациентов, %</i>
<i>Локализация новообразования</i>	лицо	5 (22,7)
	туловище	14 (63,6)
	верхняя и нижняя конечность	3 (13,7)

Молекулярно-генетические исследования мутаций анализируемых генов выявлено – мутация гена *BRAF*^{V600E} выявлена у 8 пациентов, у остальных пациентов данный вид мутации не обнаружен (рис.1).

По возрастным группам встречаемость мутаций генов *NRAS* и *CDKN2A* не выявлена, тогда как мутация *BRAF^{V600E}* у пациентов в возрастной группе 31–45 лет встречается выше в сравнении с другими возрастными группами. Из 11 пациентов данной возрастной группы у 4-х обнаружена мутация *BRAF^{V600E}*. Группа 18–30 лет включала 6 пациентов, из которых только в одном случае была обнаружена мутация (рис. 2).

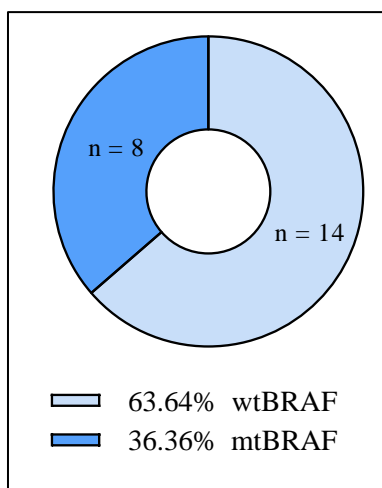


Рис. 1. Частота мутации (%) *BRAF^{V600E}* в исследуемой группе

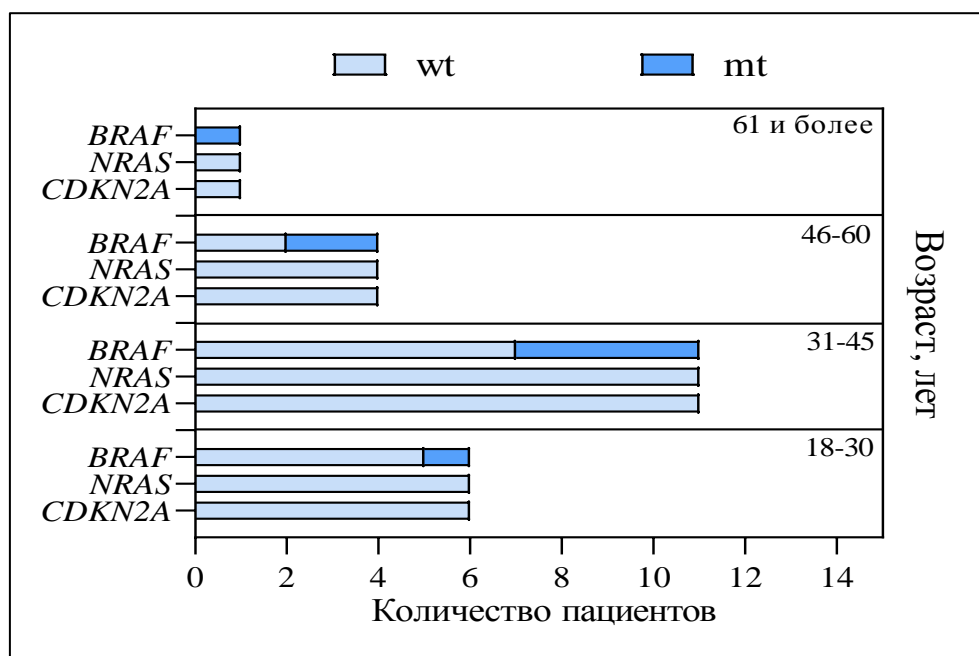


Рис. 2. Результаты молекулярно-генетического анализа мутаций в генах *BRAF*, *NRAS* и *CDKN2A* в разных возрастных группах

Частота встречаемости мутации $BRAF^{V600E}$ по гендерному признаку характеризуется отсутствием явных отличий (табл. 4).

Таблица 4

Количество пациентов с мутацией $BRAF^{V600E}$

Характеристика		Кол-во – n пациентов с мутацией $BRAF^{V600E}$, %
Пол	женский	6 (35,3)
	мужской	2 (40,0)

В зависимости от локализации новообразования, мутация $BRAF^{V600E}$ чаще всего обнаруживается в новообразованиях на участках кожи не подверженных хронической солнечной инсоляцией, таких как туловище (область спины, живота и т. д.) (табл. 5).

Таблица 5

Количество пациентов с мутации $BRAF^{V600E}$ в соответствии с локализацией новообразования

Характеристика		Кол-во – n пациентов с мутацией $BRAF^{V600E}$, %
Локализация новообразования	лицо	1 (20,0)
	туловище	6 (42,8)
	верхняя (нижняя) конечность	1 (33,3)

Полученные нами данные согласуется с работами других авторов. Так, в работе Shitara D. et al., [16] было показано, что трансформация невусов в меланому чаще всего происходит на коже не подверженной хронической солнечной инсоляции (без CSD) у относительно молодых пациентов. При этом меланомы, которые развиваются на коже с CSD (например, на голове и шее), лишь изредка связаны с невусами [14]. Bastian и его коллеги предположили [2], что меланомы, возникающие на коже с CSD и без CSD, действительно принципиально генетически различаются. Меланомы без CSD имеют больше мутаций $BRAF^{V600E}$.

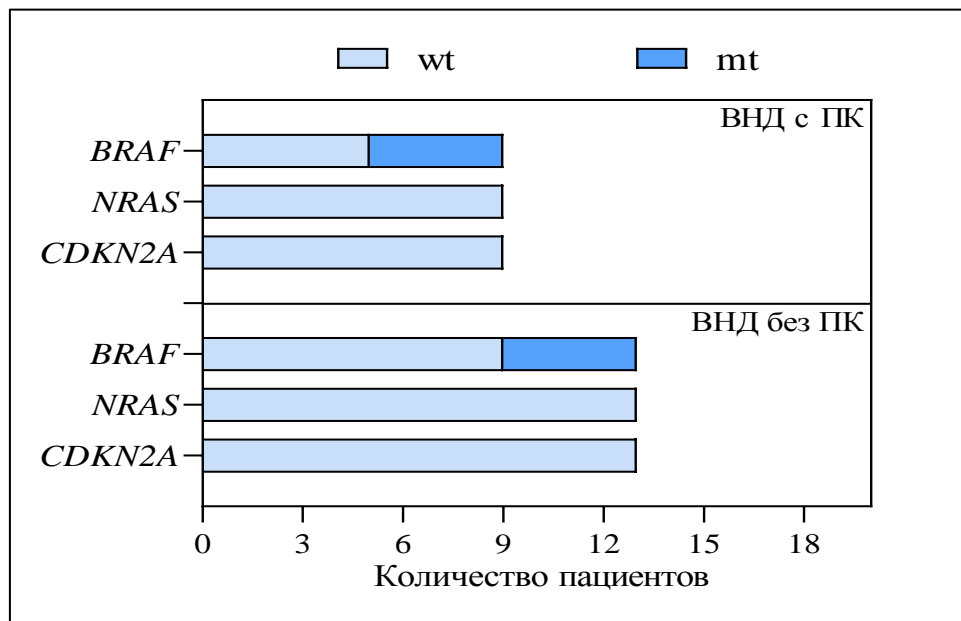


Рис. 3. Результаты молекулярно-генетического анализа мутаций в генах *BRAF*, *NRAS* и *CDKN2A* в группах ВДМ с ПК и без ПК

Во ВДН с ПК в 4 из 9 случаях обнаружена мутация *BRAF*^{V600E}. Так же в 4-х из 13 случаях мутация обнаружена в образцах ВДН без ПК. Мутации генов *NRAS* и *CDKN2A* в представленных образцах не выявлены. Все генотипы по основным «горячим точкам» – дикого типа (WT) (рис. 3).

Полученные данные о частоте встречаемости мутации *BRAF*^{V600E} изученных ВДН согласуется с гипотезой о том, что эта мутация может быть ранним событием в меланоцитарном онкогенезе, даже если одной ее недостаточно для прогрессирования до меланомы [15]. Поскольку в остальных образцах мутации не выявлены по всем трем генам, в дальнейшем планируется провести дополнительное исследование на наличие мутации в генах *NF1*, *c-Kit*, *MC1R*, *MIFT*, на примере большей выборки с целью определения механизмов онкогенеза меланомы по невус-ассициированному пути, в связи с тем, что с возрастом обычные невусы могут формировать клинически выраженные формы в условиях дополнительного мутационно-направленного роста.

Список литературы

1. Соколикowa В.Б. Отличительные морфологические и молекулярно-генетические особенности меланомы кожи и диспластических невусов / В.Б. Соколикowa, Ю.В. Можинская, Е.М. Непомнящая [и др.] // Молодой ученый. – 2016. – №15.2 (119.2). – С. 5–37.
2. Bastian B.C. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia // Annual review of the Pathology. – 2014. – V. 9:239 – P. 71.
3. Clark W.H. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma / W.H. Clark, D.E. Elder, D. Guerry, M.N. Epstein, M.H Greene, M. Van Horn // Human Pathology. – 1984. – V. 15 (12). – P. 1147–1165.
4. Damsky W.E. Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship / WE Damsky, M Bosenberg // Oncogene. – 2017. – 36 (42). – P. 5771–16. – DOI 10.1038/onc.2017.189. – EDN YKCYLL
5. Gray-Schopfer V.C. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? / V.C. Gray-Schopfer, H. Chong, J. Chow, T. Moss, Z.A. Abdel-Malek, R. Marais, D. Wynford-Thomas, D.C. Bennett [et al.] // British journal of cancer. – 2006. – 95 (4). – P. 496–505. – DOI 10.1038/sj.bjc.6603283. – EDN KYNMOF
6. Haenssle H.A. Association of patient risk factors and frequency of nevus-associated cutaneous melanomas / H.A. Haenssle, A. Mograby, A. Ngassa [et al.] // JAMA Dermatology. – 2016. – vol. 152, no. 3, pp. 291–298.
7. Kelleher F.C. Targeting NRAS in melanoma / F.C. Kelleher, G.A. McArthur // Cancer Journal. – 2012. – 18 (2). – P. 132–6.
8. Mackiewicz-Wysocka M. Oncogenic BRAF mutations and p16 expression in melanocytic nevi and melanoma in the Polish population / M. Mackiewicz-Wysocka, Małgorzata [et al.] // Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii. – 2017. – V. 34 (5) – P. 490–498.

-
9. Mohammadpour A. Melanoma: where we are and where we go / A. Mohammadpour, M. Derakhshan, H. Darabi [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2019. – V. 234 (4). – P. 3307–3320. – DOI 10.1002/jcp.27286. – EDN BRXCCX
 10. Malladi N.S.N. A descriptive observational study on clinical and dermoscopic features of benign melanocytic neoplasms / NSN Malladi, SB Chikhalkar [et al.] // *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. – 2020. – 86 (3). – P. 251–261.
 11. Pratama A.Y. Description and Histopathology Type of Pigmentosus Nevus in Dustira Hospital and Cibabat Hospital Cimahi / A.Y. Pratama // *Conference: 12th Annual Scientific Meeting, Medical Faculty, Universitas Jenderal Achmad Yani, International Symposium on «Emergency Preparedness and Dis-aster Response during COVID 19 Pandemic»*. – 2021. – vol. 37. – P. 193–196.
 12. Schadendorf D. Melanoma / D. Schadendorf, A.C.J. van Akkooi, C. Berking [et al.] // *The Lancet*. – 2018. – vol. 392, no. 10151. – pp. 971–984. – DOI 10.1016/S0140-6736(18)31559-9. – EDN YKDORF
 13. Shain A.H. The genetic evolution of melanoma from precursor lesions / A.H. Shain, I. Yeh, I. Kovalyshyn [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2015. – vol. 373, no. 20. – pp. 1926–1936.
 14. Shain A.H. From melanocytes to melanomas / A.H. Shain, B.C. Bastian // *Nature reviews Cancer*. – 2016. – 16. – P. 345–58.
 15. Shitara D. Mutational status of naevus-associated melanomas / D. Shitara, G. Tell-Marti, C. Badenas [et al.] // *Br. J. Dermatol*. – 2015. – 173 (3). – P. 671–680.
 16. Shitara D. Nevus-associated melanomas: clinicopathologic features / D Shitara, MM Nascimento, S Puig [et al.] // *Am J Clin Pathol*. – 2014. – 142. – P. 485–491.
 17. Siegel R.L. Cancer statistics / R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal // *Cancer Journal for Clinicians* – 2020. – vol. 70, no. 1, pp. 7–30.
 18. Tan J.M. The BRAF and NRAS mutation prevalence in dermoscopic subtypes of acquired naevi reveals constitutive mitogen-activated protein kinase pathway

activation / J.M. Tan, L.N. Tom, K. Jagirdar [et al.] // British Journal of Dermatology. – 2018. – 178. – P. 191–7.

19. Wei Han. Identification, Validation, and Functional Annotations of Genome-Wide Profile Variation between Melanocytic Nevus and Malignant Melanoma / Wei Han, W.-H. Xu, J.-X. Wang et al. // BioMed Research International. – 2020. – 1840415.

20. Whiteman D.C. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent path-ways to cutaneous melanoma / D.C. Whiteman [et al.] // Journal of the National Cancer Institute. – 2003. – 95. – P. 806–812. – EDN ISMFFB

21. Yeh I. Bastian Clonal BRAF mutations in melanocytic nevi and initiating role of BRAF in melanocytic neoplasia / I. Yeh, B.C. von Deimling // Journal of the National Cancer Institute. – 2013. – 105. – P. 917–919.