

М.А. Голотюк, Н.В. Казанцева

СТАТУС ГЕНА BRAF И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ У ЖИТЕЛЕЙ СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

ГАУЗ СО «Свердловский областной онкологический
диспансер», г. Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. *Цель данного исследования* — изучить статус и спектр мутаций в гене BRAF у пациентов Свердловской области с установленным диагнозом меланомы, а также взаимосвязь наличия мутаций с клинико-морфологическими характеристиками. *Материалы и методы.* Исследовали 226 гистологических образцов, полученных от пациентов с меланомой после оперативного вмешательства. Предварительно производилась оценка пригодности материала к генетическому исследованию (не менее 20% опухолевых клеток), после чего выделяли ДНК из парафиновых блоков с тканью опухоли. Статус гена BRAF определяли методом пиросеквенирования согласно протоколу производителя набора реагентов. *Результаты.* Мутации в гене BRAF имели 44% пациентов с меланомой из 225. В 1 случае определить мутацию оказалось невозможным. Спектр и частота встречаемости мутаций у пациентов Свердловской области схож с данными других общемировых исследований. Чаще всего (84% случаев) нами была встречена мутация V600E у пациентов молодого возраста. В 11% случаев детектировалась мутация V600K, а в 5% случаев — другие редкие мутации в 600 кодоне. В основном мутации встречались в узловых меланомах (65%) и пигментных (70%). Обращает на себя внимание факт, что мутации V600 встречаются в меланомах на участках без хронической солнечной экспозиции, что указывает на отсутствие связи появления мутации с постоянным воздействием солнечных лучей (скорее, с эпизодическими сильными воздействиями, но в

молодом возрасте).

Ключевые слова: меланома кожи, ген BRAF, мутация V600E, соматические мутации

Введение

В общую структуру онкологических заболеваний в Российской Федерации рак кожи вносит 15% и занимает, таким образом, первое место. Почти 2% из этой цифры составляет меланома, наиболее агрессивный вид рака кожи. При этом за последние 10 лет прирост заболеваемости населения составил более 45%, и тенденция сохраняется [1]. Увеличивается и смертность от данной патологии, несмотря на революционные открытия в лечении онкозаболеваний, включая таргетную терапию и иммунотерапию. За последние годы удалось исследовать молекулярные механизмы развития и генетические подтипы, что существенно увеличило эффективность терапии в эру персонализированной медицины.

В последней классификации ВОЗ выделяется 9 категорий меланом и учитываются не только гистологические характеристики, но и мутационный статус определенных генов, что позволяет более точно классифицировать опухоль [2].

10 лет назад был зарегистрирован первый таргетный препарат для лечения пациентов с меланомой, клетки которой несут в себе мутированный ген BRAF. Мутации в этом гене приводят к аномальной активации сигнального пути RAS/RAF/MEK/MAPK (ERK), что в свою очередь приводит к злокачественной трансформации клеток. Действие таргетного препарата — селективного ингибитора, основано на блокировании киназы, белкового продукта мутантного гена BRAF, тем самым предотвращается дальнейшая опухолевая трансформация и значительно увеличивается общая продолжительность жизни пациентов.

Мутации в гене BRAF встречаются у 40-60% пациентов, это самое частое генетическое событие при меланомах. Наиболее распространена мутация в гене BRAF — V600E, замена валина на глутамин в 600 кодоне. Также распространена мутация

V600K, замена в 600 кодоне валина на лизин. Кроме того, встречаются и другие, более редкие мутации в 600 кодоне, которые потенциально также отвечают на BRAF-ингибиторы и имеют прогностическое значение [3].

Также отмечается взаимосвязь статуса гена BRAF и клинико-морфологических характеристик меланомы, а также с общей выживаемостью и прогрессированием заболевания [2].

Определение мутаций в гене BRAF на сегодняшний день является ключевым тестом для определения тактики лечения и прогноза пациентов с меланомой и входит во все стандарты и рекомендации.

Целью данной работы является определение статуса гена BRAF у пациентов Свердловской области, а также взаимосвязь мутационного статуса с клинико-морфологическими характеристиками опухоли.

Материалы и методы

Нами был проанализирован материал 226 пациентов с меланомой в течение 2020 года. Диагноз меланомы был установлен в соответствии с рекомендациями ВОЗ и гистологически подтвержден в ГАУЗ СО «СООД» или других медицинских учреждениях (с обязательным пересмотром гистологических стекол в ГАУЗ СО «СООД»). Возраст больных варьировал от 22 до 89 лет и составил в среднем 62 года. 57,5% (130) пациентов составляли женщины, 42,5% (96) больных составляли мужчины. У всех пациентов был известен гистологический тип и участок образования опухоли.

Всем пациентам было проведено молекулярно-генетическое исследование, включающее поиск мутаций в 15 экзоне гена BRAF в ДНК, полученной из гистологического материала, заключенного в парафиновый блок. Предварительно гистологическое стекло каждого пациента, окрашенное гематоксилин-эозином, было пересмотрено квалифицированным патоморфологом с целью определения количества опухолевых клеток. Образцы, содержащие менее 50% опухолевых клеток, подвергались ма-

кродиссекции.

Получали 2-6 срезов толщиной 5 мкм с каждого блока, и экстрагировали ДНК с помощью набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Анализ 15 экзона 600 гена BRAF проводили с помощью метода пиросеквенирования, который позволял не только детектировать наличие мутации в 600 кодоне, но и дифференцировать ее тип (табл. 1).

Таблица 1
Список мутаций 600 кодона гена BRAF, определяемый с помощью набора BRAF Ryo Kit (Qiagen, Германия)

Мутация	Замена нуклеотидов	Замена валина	COSMIC ID
V600E	1799T>A	Глутаминовая кислота	476
V600K	1798_1799 GT>AA	Лизин	473
V600M	1798G>A	Метионин	1130
V600D	1799_1800 TG>AT	Аспарагиновая кислота	477
V600R	1798_1799 GT>AG	Аргинин	474
V600E complex	1799_1800 TG>AA	Глутаминовая кислота	475
V600A	1799T>C	Аланин	18443
V600G	1799T>G	Глицин	6137

Использовали наборы реагентов BRAF Ryo Kit (Qiagen, Германия) и RyoMark Gold RQ96 (Qiagen, Германия). Согласно инструкции, первым этапом проводилась ПЦР с праймерами с целью амплификации материала. Далее ПЦР продукт иммобилизовали с помощью стрептавидиновой сефарозы, подготавливали одноцепочечную ДНК с помощью вакуумной рабочей станции RyoMark Q24 (Qiagen, Германия), отжигали с соответствующими праймерами для секвенирования. Дальнейшая реакция пиросеквенирования происходила в приборе RyoMark Q24 (Qiagen, Германия).

Полученные пирограммы анализировались с помощью специального программного обеспечения, которое позволяло отличить нормальный генотип и изменения последовательности

нуклеотидов (рис. 1, 2)

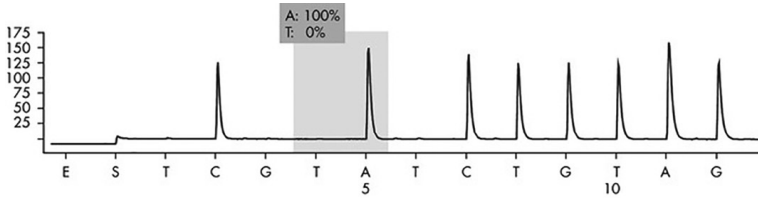


Рисунок 1. Пирограмма нормального генотипа 600 кодона гена BRAF

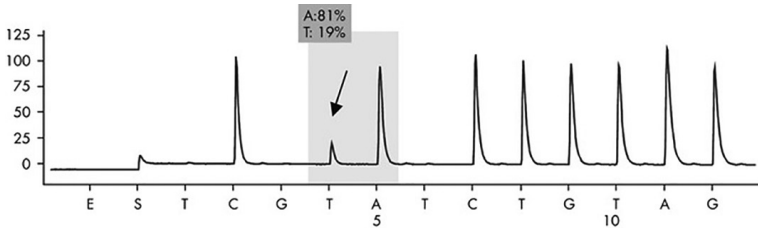


Рисунок 2. Пирограмма мутации V600E в гене BRAF (замена триплета GTG, кодирующего валин, на триплет GAG, кодирующий глутамин)

Результаты и их обсуждение

В ходе исследования мутационный статус удалось определить у 225 пациентов из 226. В одном случае нам не удалось получить ДНК, пригодную для дальнейшего анализа. Скорее всего, это связано с нарушением проводки ткани или времени фиксации формалином, что необратимо воздействует на ДНК, деградируя ее.

Из 225 пациентов мутации обнаружались у 44% (99), остальные 56% (130) пациентов имели дикий тип гена BRAF.

Помимо самой часто встречаемой мутации V600E в 84% случаев, мы обнаружили мутацию V600K у 11% пациентов. Кроме того, были обнаружены и другие редкие мутации в 600 кодоне, где аминокислота валин меняется на другие: V600E complex (замена на глутаминовую кислоту) — у 2 пациентов, V600M (замена на метионин) в 1 случае, V600D (замена на аспаргиновую кислоту) в 1 случае, V600R (замена на аргинин) в 1 случае (рис. 3).

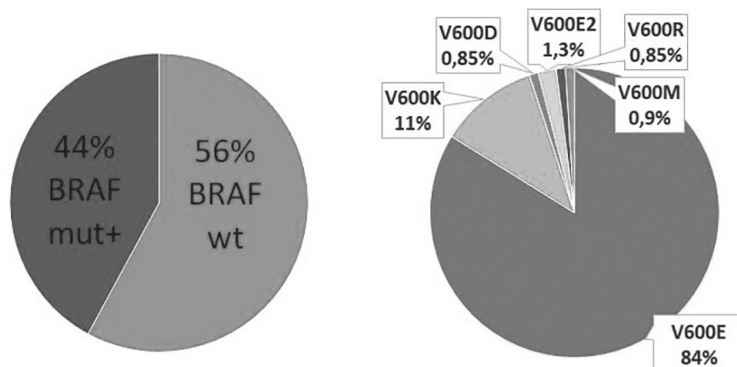


Рисунок 3. Частота встречаемости и спектр мутаций в 600 кодоне гена BRAF у пациентов Свердловской области

Спектр мутаций и процент их встречаемости коррелирует с общероссийскими данными. Также обращает на себя тот факт, что 5% пациентов имели редкие мутации в 600 кодоне. Это важно учитывать при выборе тест-системы, с помощью которой тестируются образцы, поскольку во многих коммерческих наборах возможна детекция лишь двух наиболее частых мутаций. Тем не менее эти мутации патогенетические и также отвечают на терапию ингибиторами киназ [4].

Как и в большинстве исследований, нами не получено достоверных различий в частоте встречаемости мутаций у женщин и у мужчин ($p > 0,05$). Мутации встретились у 56 женщин из 130 (43%), и у 43 мужчин из 96 (44,7%).

Интересным выглядит распределение мутаций по возрасту пациентов (рис. 4).

Частота встречаемости мутаций в гене BRAF достоверно снижается с возрастом ($p < 0,001$). При этом следует отметить, что мутация V600K встречалась преимущественно у пожилых пациентов. Таким образом, среди пациентов с мутацией в гене BRAF большинство имеют молодой возраст, что может свидетельствовать о различных механизмах возникновения данного вида опухоли.

В ряде исследований сообщается, что наличие мутаций в гене BRAF характерно для меланом, образующихся на участках тела, которые не подвергаются хронической солнечной экспози-

ции [5]. В нашем исследовании частота встречаемости мутации в гене BRAF в локализациях с низкой солнечной экспозицией составляет 53%, тогда как в местах подверженных солнечному излучению достоверно ниже — всего 34%, ($p < 0,01$) (рис. 5).

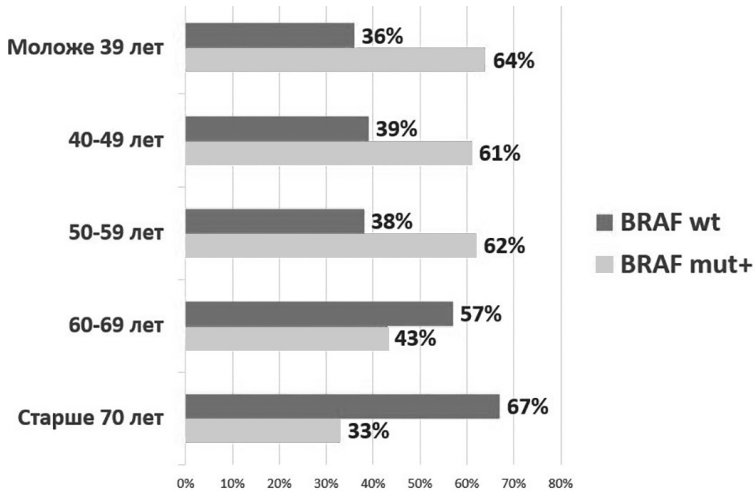


Рисунок 4. Статус мутации в гене BRAF в зависимости от возраста пациентов

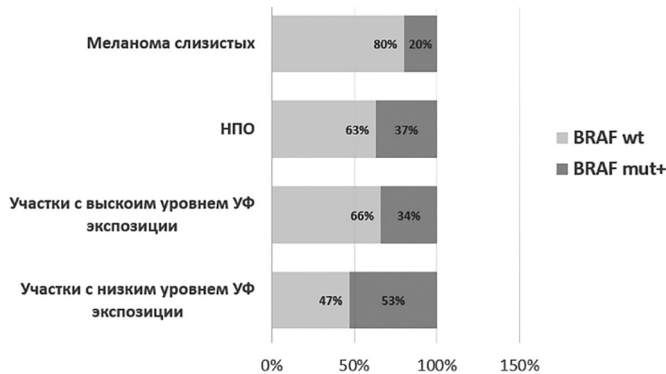


Рисунок 5. Частота встречаемости мутаций в гене BRAF в зависимости от локализации опухоли

Данный факт показывает, что мутации в гене BRAF не связаны напрямую с воздействием УФ-излучения, которое является самостоятельным фактором канцерогенеза в развитии мелано-

цитарных опухолей кожи. В совокупности с наблюдением, что мутации встречаются чаще в молодом возрасте (по некоторым данным, такие пациенты имеют в анамнезе сильное воздействие УФ-излучения [6]), вероятно можно сделать вывод, что изменения в гене BRAF ассоциированы не с хроническим солнечным повреждением, а с последствиями паталогического механизма воздействия УФ-излучения именно в молодом возрасте.

Нами не было обнаружено взаимосвязи между встречаемостью мутаций V600 и стадией заболевания, хотя обращает на себя внимание тот факт, что существует некоторая тенденция увеличения вероятности мутаций в гене BRAF с увеличением стадии заболевания (табл. 2). Кроме того, обращает на себя внимание, что большинство пациентов имели меланому I и II стадии, что говорит об относительно своевременном выявлении данной онкопатологии.

Таблица 2
Выявляемость мутаций в гене BRAF в зависимости от стадии меланомы у пациентов Свердловской области

Статус мутации Стадия заболевания	Мутация в гене BRAF (%)	Нет мутации в гене BRAF (%)
I	37,5%	62,5%
II	45%	55%
III	43,7%	56,3%
IV	58%	42%

Среди основных форм меланом выделяют несколько, среди которых узловые меланомы считаются наиболее агрессивными. В ишем исследовании чаще всего мутации в гене BRAF встречались именно в таких формах меланомы (рис. 6). В остальных формах (поверхностнораспространяющаяся, лентиго-меланоа, акркальрная лентигозная) — частота встречаемости мутаций была значимо ниже ($p < 0,01$). Кроме того, 70% меланом, несущих генетические поломки в гене BRAF, содержали пигмент, в то время как в беспигментных меланомах мутации встречались гораздо реже.

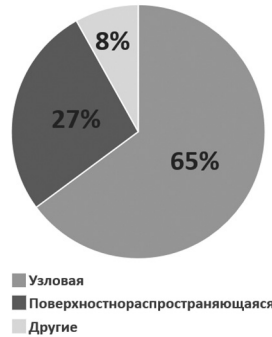


Рисунок 6. Частота встречаемости мутаций в гене BRAF среди различных форм меланом

Заключение

Активирующие мутации в гене BRAF имеют ключевое значение в биологии меланом. Среди пациентов Свердловской области такие мутации в 600 кодоне 15 экзона гена BRAF встречаются в 44% случаев. Такие пациенты имеют показание для назначения соответствующей таргетной терапии и, как следствие, увеличения общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования. Нами установлена связь, что большинство меланом с мутациями V600 — это узловые беспигментные формы, встречающиеся у молодых пациентов на участках без хронической солнечной экспозиции. Помимо самых распространённых мутаций — V600E и V600K 5% пациентов имели более редкие мутации в 600 кодоне, которые тем не менее имеют клиническую значимость.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн А.Д., ред., Старинский В.В., ред., Шахзадов А.О., ред. Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2020.
2. Elder D.E., Massi D., Scolyer R.A., Willemze R., ed. WHO Classification of Skin Tumours. 4th ed. International Agency for Research on Cancer; 2018: p. 470.

3. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*; 2002 Jun 27; 417(6892):949-54.

4. Teixido C, Castillo P, Martinez-Vila C, Arance A, Alos L. Molecular Markers and Targets in Melanoma. *Cells*; 2021; 10(9):2320.

5. Франк, Г.А. Первое Всероссийское молекулярно-эпидемиологическое исследование меланомы: результаты анализа мутаций в гене BRAF. *Архив патологии*; 2014; № 3 (76).

6. Bauer J, Büttner P, Murali R, Okamoto I, Kolaitis NA, Landi MT et al. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res.*; 2011 Apr; 24(2):345-51.

7. Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*; 2002; №414: 949-954.

8. Flaherty, K.T., Puzanov I., Kim K.B. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*; 2010; №363(9): 809 - 819.

9. Garnett, M.J., Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*; 2004; № 6 (4): 313-319.

10. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of Melanoma. *Med Sci (Basel)*; 2021; 9(4):63.

11. Berrino E, Balsamo A, Pisacane A, et al. High BRAF variant allele frequencies are associated with distinct pathological features and responsiveness to target therapy in melanoma patients. *ESMO Open*; 2021; 6(3):100133.

12. Ottaviano M, Giunta EF, Tortora M, et al. BRAF Gene and Melanoma: Back to the Future. *Int J Mol Sci.*; 2021; 22(7):3474.