

**МУТАЦИИ ГЕНОВ KRAS (2 EXON, 3 EXON) И BRAF (15 EXON)
В СИНОНАЗАЛЬНЫХ ПАПИЛЛОМАХ ИНВЕРТИРОВАННОГО
И ОНКОЦИТАРНОГО ТИПОВ, А ТАКЖЕ АССОЦИИРОВАННЫХ
С НИМИ СИНОНАЗАЛЬНЫХ КАРЦИНОМАХ**

¹Бахтин А.А., ¹Дайхес Н.А., ¹Карнеева О.В., ²Туманова Е.Л.

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр оториноларингологии Федерального медико-биологического агентства», Москва, e-mail: lor-pathology@yandex.ru;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Синоназальные папилломы – группа доброкачественных, относительно редко встречающихся опухолей синоназального тракта с различным клиническим течением. В современной классификации Всемирной организации здравоохранения принято выделять три подтипа – наиболее часто встречающиеся инвертированный тип, онкоцитарный и экзофитный. В последнее время появилась концепция о том, что различные типы синоназальных папиллом – это не варианты одной опухоли, а скорее отдельные опухоли. Так, онкоцитарный тип синоназальной папилломы показывает KRAS-мутации, патогенез инвертированного типа связан с EGFR-мутациями; а экзофитный тип тесно ассоциирован с инфекцией, вызванной вирусом папилломы человека низкого риска злокачественности. Цель – дать сравнительную характеристику генов KRAS (2 экзон, 3 экзон) и BRAF (15 экзон) по результатам секвенирования по Сэнгеру в синоназальных папилломах инвертированного и онкоцитарного типов, а также ассоциированных с ними синоназальных карциномах. Секвенирование было выполнено в 87 случаях синоназальных папиллом, из них 13 образцов представляли онкоцитарный тип, 66 – инвертированный тип и 5 образцов плоскоклеточного рака, ассоциированного с синоназальной папилломой. ДНК выделяли из архивных образцов операционного материала, фиксированного в парафине. Статистически значимые события были обнаружены в гене KRAS. Так, в группе синоназальных папиллом онкоцитарного типа в гене KRAS (2 экзон) из 13 случаев в 3 случаях отмечалась миссенс-мутация G35A, с заменой глицина на аспарагиновую кислоту. В группе плоскоклеточного рака, ассоциированного с синоназальной папилломой, во всех 5 случаях в гене KRAS (3 экзон) отмечалась миссенс-мутация 125delC с высокой статистической значимостью в данной группе ($p < 0,001$). Причем данная мутация не встречалась в группах онкоцитарного и инвертированного типов синоназальных папиллом. Во всех трех группах различных типов синоназальных папиллом в гене BRAF (15 экзон) мутации отсутствовали.

Ключевые слова: синоназальная папиллома, инвертированный тип, онкоцитарный тип, малигнизация, секвенирование по Сэнгеру

**MUTATIONS IN KRAS (2 EXON, 3 EXON) AND BRAF (15 EXON) GENES IN
SINONASAL PAPILOMAS OF INVERTED AND ONCOCYTIC TYPES, AS WELL AS
ASSOCIATED SINONASAL CARCINOMA**

¹Bakhtin A.A., ¹Daykhes N.A., ¹Karneeveva O.V., ²Tumanova E.L.

¹National Medical Research Center of Otolaryngology of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, e-mail: lor-pathology@yandex.ru;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Sinonasal papillomas are a group of benign, relatively rare, tumors of the sinonasal tract with different clinical courses. In the current classification of the World Health Organization, it is customary to distinguish three subtypes - the most common are the inverted type, oncocyctic and exophytic. Recently, a concept has emerged that different types of sinonasal papillomas are not variants of a single tumor, but rather separate tumors. Thus, the oncocyctic type of sinonasal papilloma shows KRAS mutations, the pathogenesis of the inverted type is associated with EGFR mutations; and the exophytic type is closely associated with infection caused by the human papillomavirus of low risk of malignancy. The aim of the study is to provide a comparative characteristic of the KRAS (2 exon, 3 exon) and BRAF (15 exon) genes based on the results of Sanger sequencing in inverted and oncocyctic sinonasal papillomas and associated sinonasal carcinomas. Sequencing was performed in 87 cases of sinonasal papillomas, including 13 samples of the oncocyctic type, 66 samples of the inverted type and 5 samples of squamous cell carcinoma associated with sinonasal papilloma. DNA was isolated from archival samples of surgical material fixed in paraffin. Statistically significant events were detected in the KRAS gene. Thus, in the group of sinonasal papillomas of the oncocyctic type in the KRAS gene (2 exon) in 3 cases out of 13 cases a missense mutation G35A was noted, with the replacement of glycine with aspartic acid. In the group of

squamous cell carcinoma associated with sinonasal papilloma in all 5 cases in the KRAS gene (3 exon) a missense mutation 125delC was noted with high statistical significance in this group ($p < 0.001$). Moreover, this mutation was not found in the groups of oncocytic and inverted types of sinonasal papillomas. In all three groups of different types of sinonasal papillomas, mutations in the BRAF gene (15 exon) were absent.

Keywords: sinonasal papilloma, inverted type, oncocytic type, malignancy, Sanger sequencing

Введение

Синоназальные папилломы – группа доброкачественных, относительно редко встречающихся опухолей синоназального тракта с различным клиническим течением. В современной классификации ВОЗ принято выделять три подтипа: наиболее часто встречающийся инвертированный тип (ИСП), онкоцитарный (ОСП) и экзофитный (ЭСП). Первые два являются клинически более агрессивными, с наличием местно-деструктивного роста, частыми рецидивами и определенной способностью к малигнизации; экзофитный же тип, как правило, не рецидивирует, имеет экзофитный характер роста, случаи малигнизации описаны не были. Несмотря на это, все три подтипа синоназальной опухоли относятся к группе синоназальных папиллом [1, с. 140].

В последнее время появилась концепция о том, что различные типы синоназальных папиллом – это не варианты одной опухоли, а скорее отдельные опухоли. Так, ОСП показывает KRAS-мутации, патогенез ИСП связан с EGFR-мутациями; а ЭСП тесно ассоциирована с инфекцией, вызванной вирусом папилломы человека (ВПЧ) низкого риска злокачественности [2, 3].

Ген KRAS принадлежит к семейству малых гуанозинтрифосфатаз (ГТФаз) – Ras. KRAS имеет два близкородственных паралога, HRAS и NRAS, все три гена относительно часто мутируют при различных раках человека. Так, мутация KRAS обнаруживается примерно в 85 % рака поджелудочной железы, в 45 % колоректальных аденокарцином, в 30 % аденокарцином легких и с более низкой частотой в широком спектре других типов опухолей [4]. Подавляющее большинство нарушений в генах семейства Ras представляют собой мутации в трех «горячих точках» G12, G13 и Q61. Мутация Ras часто является биомаркером, связанным с плохим прогнозом и плохим ответом на таргетную терапию. Таким образом, решение проблемы мутаций KRAS гена является приоритетным направлением исследований рака [5].

Сигнальный путь и молекулярная биология Ras генов были относительно недавно подробно изучены [6]. KRAS, HRAS и NRAS представляют собой белки периферической мембраны, имеющие общий высокомолекулярный G-домен, который содержит каталитический сайт ГТФазы, и два региона, которые претерпевают конформационные изменения при обмене гуанозиндифосфат (GDP)/ гуанозинтрифосфат (GTP). С-конец этих белков расходится, и KRAS может подвергаться альтернативному сплайсингу с образованием двух изоформ KRAS4A и KRAS4B с различными последовательностями С-

конца. Посттрансляционная модификация белков Ras на их С-конце с помощью ряда ферментов приводит к их фарнезилированию (HRAS, NRAS, KRAS4A и KRAS4B) и пальмитоилированию (HRAS, NRAS и KRAS4A). Эти липидные присоединения позволяют Ras связываться с плазматической мембраной и другими эндомембранными компартментами клетки и необходимы для функционирования Ras.

Активность белков семейства Ras контролируется эпидермальным фактором роста, различными цитокиновыми и гормональными рецепторами. Активация рецептора фактора роста стимулирует обмен GDP-GTP на Ras, чему способствует семейство факторов обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF), которые рекрутируются в адаптерные белки, связывающие рецептор. GTP-связанный Ras претерпевает конформационные изменения, которые позволяют его областям переключения I и II взаимодействовать и активировать ряд нижестоящих эффекторных белков. Последующий гидролиз GTP под действием Ras, реакция, которая значительно ускоряется за счет его связывания с белками, активирующими ГТФаз (GAP), возвращает Ras в неактивное, связанное с GDP состояние. Вышеупомянутые мутации «горячих точек» Ras либо нарушают связывание GAP (мутации G12 и G13), либо внутреннюю активность ГТФазы (мутации Q61) Ras. Эти мутации резко сдвигают равновесие белка Ras, чтобы он существовал в основном в GTP-связанном состоянии и эффективно отсоединял белки Ras от входных сигналов вышестоящих рецепторов и направлял конститутивную передачу сигналов на нижестоящие эффекторные пути Ras [7].

Основная причина частого выбора мутаций Ras при раке заключается в том, что Ras передает сигналы множественным эффекторным путям, активация которых способствует онкогенной трансформации. К ним относятся путь MAP-киназы (MAPK), путь PI 3-киназы (PI3K)/АКТ/mTOR, малые GTPases Rho, Rac и Ral и фосфолипаза C. Вместе эти пути контролируют пролиферацию и рост клеток, регулируют клеточный метаболизм, подвижность клеток и множество программ транскрипции генов. Конститутивно активируя эти пути, онкопротеин Ras обеспечивает рост, выживаемость и метастатический потенциал раковой клетки [8].

При изучении синоназальных папиллом и ассоциированных с ними карцином (с-г), в последнее время также возник интерес и к гену BRAF. Наиболее распространенной генетической мутацией является замена одного нуклеотида, которая приводит к образованию конститутивно активной киназы BRAF (BRAF^{V600E}), та, в свою очередь, поддерживает непрерывную пролиферацию клеток. Кроме того, BRAF^{V600E} провоцирует острое воспалительное состояние с тканеспецифическим привлечением нейтрофилов и макрофагов, а также трансдифференцировку эпителия [9].

Так, было показано наличие мутаций с низкой частотой встречаемости в ОСП, при этом мутации как KRAS, так и BRAF отсутствовали в группе синоназальных карцином [10]. В другом исследовании было показано наличие мутации гена BRAF в 15 экзоне в ИСП [11].

Цель исследования – дать сравнительную характеристику генов KRAS (2 экзон, 3 экзон) и BRAF (15 экзон) по результатам секвенирования по Сэнгеру в ИСП и ОСП, а также ассоциированных с ними синоназальных карциномах.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования послужили 87 случаев операционного и биопсийного материала от пациентов с различными типами синоназальных папиллом, из них 13 случаев представляли ОСП, 66 – ИСП и 5 образцов плоскоклеточного рака, ассоциированного с СП. Материал был фиксирован в 10 % забуференном формалине на протяжении 12 ч с дальнейшим изготовлением парафиновых блоков по стандартной схеме. С помощью микротомы Thermo Scientific HM 340E изготовлена серия срезов толщиной 5–6 мкр с дальнейшим монтированием их на предметные стекла. Срезы окрашивались гематоксилином Майера и водно-спиртовым эозином Y по стандартному протоколу.

Секвенирование было выполнено во всех 87 случаях синоназальных папиллом, из них 13 образцов представляли ОСП, 66 – ИСП и 5 образцов плоскоклеточного рака, ассоциированного с СП. ДНК выделяли из архивных парафиновых блоков операционного и биопсийного материала. Выделение ДНК проводили с использованием набора «Экстракт ДНК FFPE» (ООО «Номотек», Москва), согласно инструкции производителя. Концентрацию выделенной ДНК определяли методом количественной ПЦР в реальном времени с использованием тест-системы для выявления гена сурвивина человека для научного применения (ООО «Нанодиагностика», Москва).

Имя праймера	Ген	Экзон	Последовательность праймеров (5'– 3')
BRAFex15F	BRAF	15	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> GATAATGCTTGCTCTGATAGGA
BRAFex15R	BRAF	15	CGACCTTCAATGACTTTCTAGTA
KRASex2F	KRAS	2	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> GGTGGAGTATTTGATAGTGTAT
KRASex2R	KRAS	2	GAATGGTCCTGCACCAGTA
KRASex3F	KRAS	3	<u>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</u> GACTGTGTTTCTCCSTTCTC
KRASex3R	KRAS	3	CATGGCATTAGCAAAGACTCA

5'-концы прямых праймеров содержат последовательность, комплементарную праймеру для секвенирования (подчеркнуто).

Амплификацию целевых фрагментов первоначально проводили в присутствии SYBR-Green для оценки эффективности амплификации каждой пробы. По результатам этой амплификации пробы распределяли на группы с близкими пороговыми циклами. Нарработку ампликонов для секвенирования проводили при оптимальном количестве циклов для каждой группы проб. Очистку ПЦР-продуктов проводили переосаждением в этаноле. Секвенирование по Сэнгеру проводили в компании Евроген (Москва). Полученные сиквенсы «обрезали» по границам экзонов и выравнивали с использованием программы MEGA v. 11.0.13. В качестве референс-последовательности для гена KRAS и BRAF использовали NC000007.14.

Статистический анализ производили в программном обеспечении Jamovi version 2.5.3. Для оценки статистической значимости различий двух и более показателей применялся метод непараметрического анализа – критерий хи-квадрат Пирсона. Уровень значимости был статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При гистологическом исследовании ИСП характеризовалась преимущественно эндофитным типом роста эпителиального пласта, как правило, в отечную строму. Эпителиальный пласт мог быть представлен как многослойным плоским неороговевающим эпителием с дистрофическими изменениями, так и эпителием респираторного типа с гиперплазией базальных клеток (рис. 1).

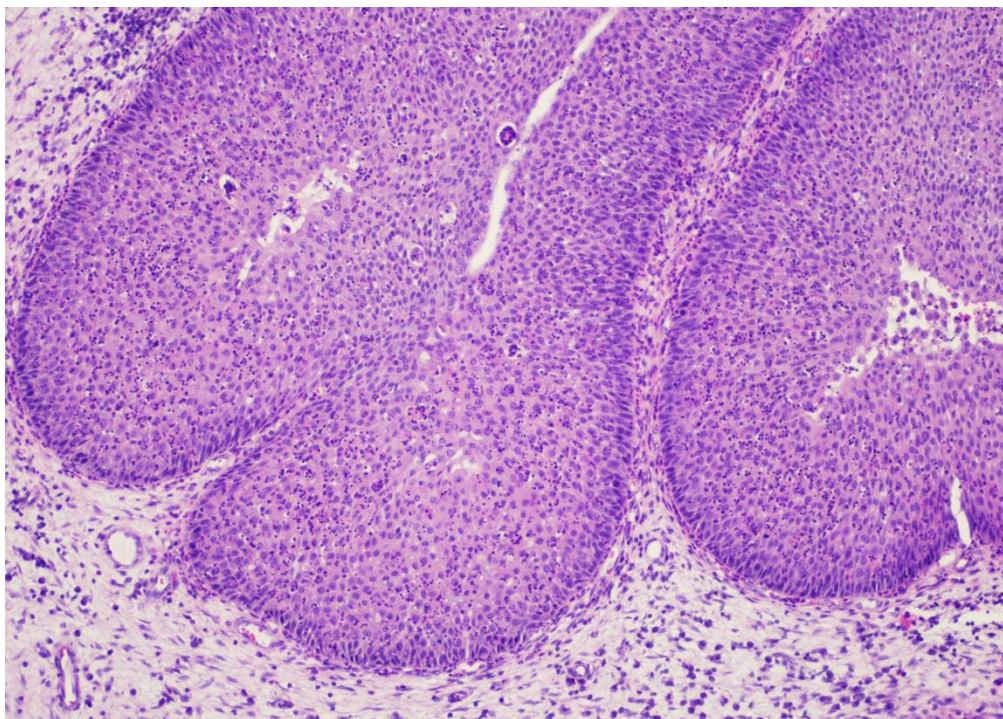


Рис. 1. Морфологическая картина ИСП. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: x100

ОСП характеризовалась экзо- и эндофитным характером роста с формированием папиллярных структур, покрытых цилиндрическим реснитчатым эпителием с выраженной

эозинофильной цитоплазмой, а также формированием интраэпителиальных микроабсцессов (рис. 2).

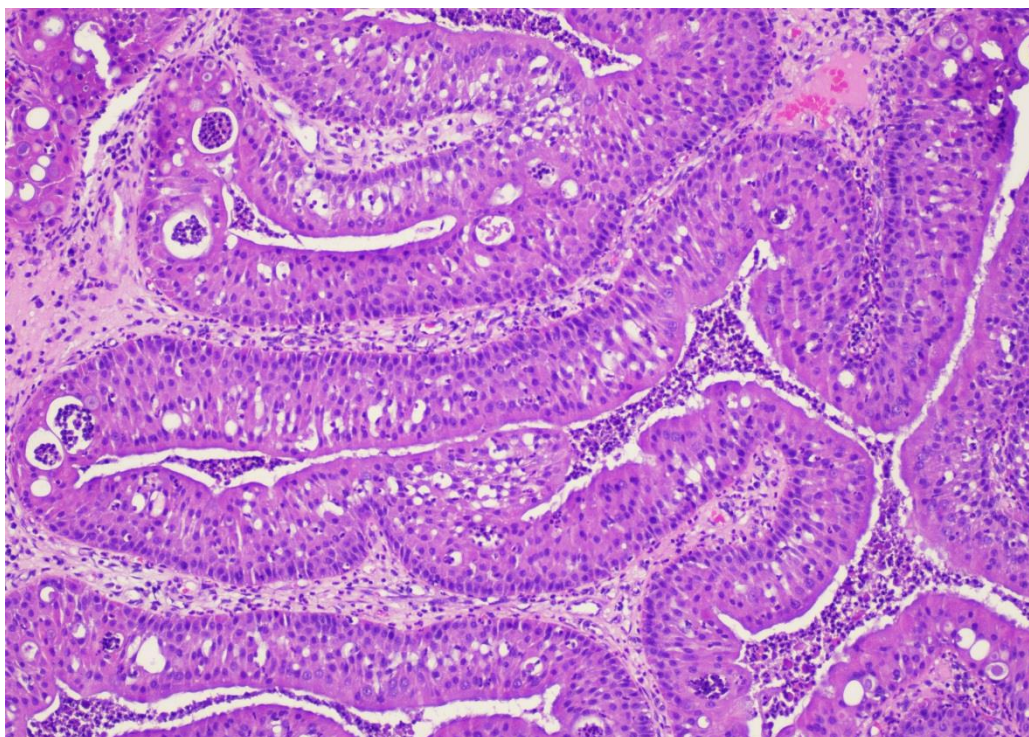


Рис. 2. Морфологическая картина ОСИ. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: $\times 100$

Группу с-г составили 5 случаев синхронного плоскоклеточного рака G2 и ИСП. Случаи синхронного плоскоклеточного рака и ОСИ на момент исполнения исследования отсутствовали. В данной группе отмечались участки вышеописанной ИСП с очагами грубых гистоархитектурных нарушений в виде нарушения полярности клеток эпителиального пласта; наличием ядерного и цитоплазматического полиморфизма; дискератоза; наличием высоких митозов, в том числе и атипических; а также инвазивным ростом в подлежащую строму (рис. 3).

При секвенировании по Сэнгеру в гене KRAS (2 экзон), в группе ИСП ($n = 69$), были обнаружены единичная синонимичная мутация G75A ($n = 1$) без замены кодирующей аминокислоты, и миссенс-мутация G110A ($n = 1$) с заменой лизина на аргинин. Эти две мутации не имели статистической значимости ($p = 0,879$). В группе ОСИ в гене KRAS (2 экзон) из 13 случаев в 3 случаях отмечалась миссенс-мутация G35A, с заменой глицина на аспарагиновую кислоту, при этом данная мутация имела статистически значимое различие от других групп ($p < 0,001$). В группе плоскоклеточного рака, ассоциированного с СП, в данном гене KRAS (2 экзон) мутаций не наблюдалось.

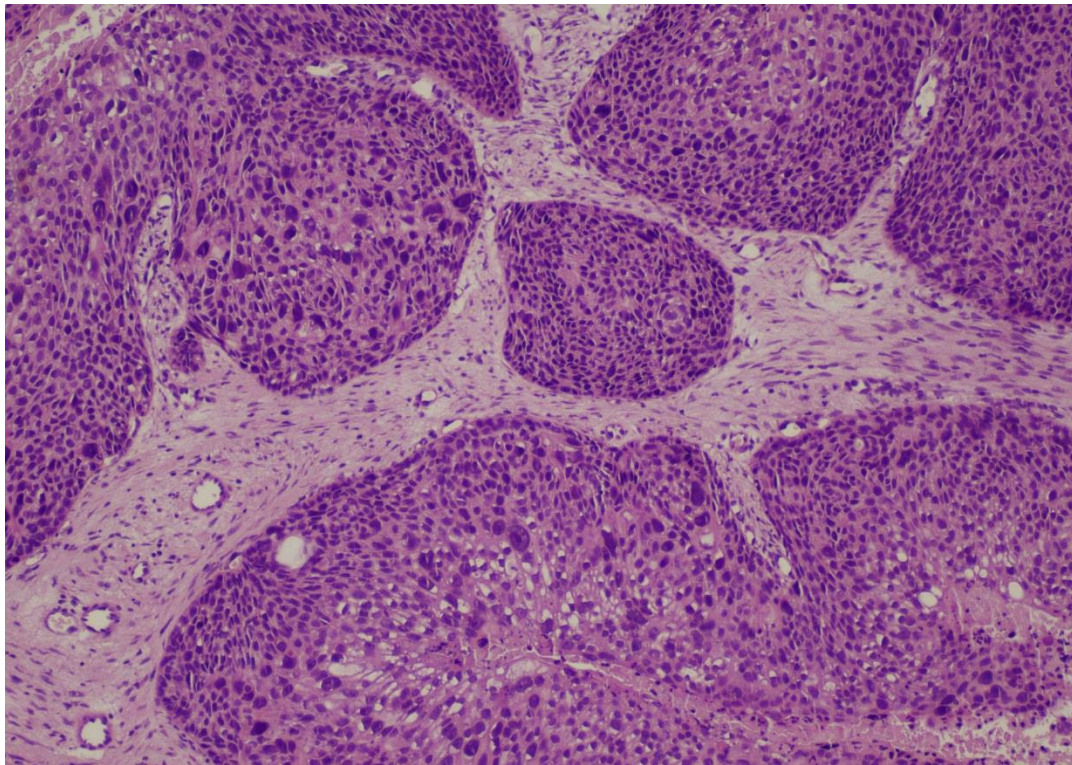


Рис. 3. Синхронный плоскоклеточный рак на фоне ИСП.
 Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: x100

В гене BRAS (15 экзон) во всех трех группах мутации не обнаружены. Обзор мутационных данных приведен в таблице.

Обзор мутационных данных генов KRAS
 (2 экзон, 3 экзон) и BRAF (15 экзон) в группах ИСП, ОСП и с-г ||

Локализация мутации		Тип опухоли n = 87			Значения критерия хи-квадрат Пирсона
		ОСП n = 13	ИСП n = 69	с-г n = 5	
KRAS 2 экзон	G35A ¹	3	0	0	*p < 0,001; df = 2; x ² = 17,7; n = 87
	G75A	0	1	0	p = 0,879; df = 2; x ² = 0,264; n = 87
	G110A ²	0	1	0	p = 0,879; df = 2; x ² = 0,264; n = 87
KRAS 3 экзон	117delC ³	3	13	1	p = 0,939; df = 2; x ² = 0,126; n = 87
	125delC ⁴	0	1	5	*p < 0,001; df = 2; x ² = 71,7; n = 87
	129delA ⁵	1	0	0	p = 0,056; df = 2; x ² = 5,76; n = 87
BRAF 15 экзон	—	—	—	—	

¹ Замена G (глицин) на D (аспарагиновая кислота); ² Замена K (лизин) на R (аргинин); ³ Замена S (серин) на ?; ⁴ Замена K (лизин) на ?; ⁵ Замена Q (глутамин) на ?. || ¹ Replacement of G (glycine) with D (aspartic acid); ² Replacement of K (lysine) with R (arginine); ³ Replacement of S (serine) with ?; ⁴ Replacement of K (lysine) with ?; ⁵ Replacement of Q (glutamine) with ?.

Заключение

Размер когорты в 87 случаев (66 ИСП, 13 ОСП и 5 случаев с-г, ассоциированных с синоназальными папилломами) делает данное исследование одним из наиболее обширных по сравнению с предыдущими работами, посвященными изучению генов KRAS и BRAF в СП различных типов. В исследовании статистически значимые события были обнаружены в гене KRAS. Так, в группе ОСП в гене KRAS (2 экзон) из 13 случаев в 3 случаях отмечалась миссенс-мутация G35A, с заменой глицина на аспарагиновую кислоту. В группе плоскоклеточного рака, ассоциированного с синоназальной папилломой, во всех 5 случаях в гене KRAS (3 экзон) отмечалась миссенс-мутация 125delC с высокой статистической значимостью в данной группе ($p < 0,001$). Причем данная мутация не встречалась в группах ОСП и ИСП. Статистически значимых мутаций в группе ИСП в гене KRAS обнаружено не было.

Во всех трех группах различных типов синоназальных папиллом в гене BRAF (15 экзон) мутации отсутствовали.

Список литературы

1. Franchi A. Nonsquamous lesions of the nasal cavity, paranasal sinuses, and nasopharynx // Gnepps diagnostic surgical pathology of the Head and Neck, third edition / Ed. Franchi A., Bishop A.J. Canada: Elsevir Inc. 2021. 1204 p.
2. Udager A.M., Rolland D.C.M., McHugh J.B., Betz B.L., Murga-Zamalloa C., Carey T.E., Marentette L.J., Hermsen M.A., DuRoss K.E., Lim M.S., Elenitoba-Johnson K.S.J., Brown N.A. High-frequency targetable EGFR mutations in sinonasal squamous cell carcinomas arising from inverted sinonasal papilloma // Cancer Res. 2015. Vol. 75, Is. 13. P. 2600–2606. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0340.
3. Udager A.M., McHugh J.B., Betz B.L., Montone K.T., Livolsi V.A., Seethala R.R., Yakirevich E., Iwenofu O.H., Perez-Ordóñez B., DuRoss K.E., Weigel H.C., Lim M.S., Elenitoba-Johnson K.S., Brown N.A. Activating KRAS mutations are characteristic of oncocytic sinonasal papilloma and associated sinonasal squamous cell carcinoma // J. Pathol. 2016. Vol. 239, Is. 4. P. 394–398. DOI: 10.1002/path.4750.
4. Cox A.D., Fesik S.W., Kimmelman A.C., Luo J., Der C.J. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? // Nat Rev Drug Discov. 2014. Vol. 13, Is. 11 P. 828–851. DOI: 10.1038/nrd4389.
5. Stephen A.G., Esposito D., Bagni R.K., McCormick F. Dragging RAS back in the ring // Cancer Cell. 2014. Vol. 25, Is. 3. P. 272–281. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.02.017.
6. Waters A.M., Der C.J. KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer // Cold Spring Harb Perspect Med. 2018. Vol. 4, Is. 8. DOI: 10.1101/cshperspect.a031435.

7. Simanshu D.K., Nissley D.V., McCormick F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease // *Cell*. 2017. Vol. 170, Is. 1. P. 17–33. DOI: 10.1016/j.cell.2017.06.009.
8. Pylayeva-Gupta Y., Grabocka E., Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web // *Nat Rev Cancer*. 2011. Vol. 11, Is. 11. P. 761–774. DOI: 10.1038/nrc3106.
9. Bosso G., Lanuza-Gracia P., Piñeiro-Hermida S., Yilmaz M., Serrano R., Blasco M.A. Early differential responses elicited by BRAFV600E in adult mouse models // *Cell Death Dis*. 2022. Vol. 10, Is. 13. P. 142. DOI: 10.1038/s41419-022-04597-z.
10. López F., García Inclán C., Pérez-Escuredo J., Alvarez Marcos C., Scola B., Suárez C., Llorente J.L., Hermsen M.A. KRAS and BRAF mutations in sinonasal cancer // *Oral Oncol*. 2012. Vol. 48, Is. 8. P. 692–697. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2012.02.018.
11. Zonnur S., Erbersdobler A., Schneider B. EGFR and BRAF mutations in inverted sinonasal papilloma – a more complex landscape? // *Virchows Arch*. 2021. Vol. 478, Is. 5. P. 915–924. DOI: 10.1007/s00428-020-02945-y.