

УДК 616.441–006.6–089.12

BRAF—СТАТУС ПАПИЛЛЯРНЫХ ТИРЕОИДНЫХ КАРЦИНОМ И СТРАТЕГИЯ ИХ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

Ю. Н. Тарашченко, А. Е. Коваленко, М. Ю. Болгов, Б. Б. Гуда, Е. А. Шелковой,
К. А. Некрасов, О. С. Маньковская, В. И. Кашуба

Институт эндокринологии и обмена веществ имени В. П. Комиссаренко НАМН Украины,
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, г. Киев

BRAF—STATUS OF PAPILLARY THYROID CARCINOMAS AND STRATEGY OF SURGICAL TREATMENT

Yu. N. Tarashchenko, A. E. Kovalenko, M. Yu. Bolgov, B. B. Guda, E. A. Shelkovoy,
K. A. Nekrasov, O. S. Mankovskaya, V. I. Kashuba

Объем хирургического вмешательства у пациентов при небольших ПК ЩЖ обсуждается. Современные тенденции развития тиреоидной онкологии предусматривают персонализированный алгоритм решения этого вопроса. В частности, на конгрессе Американского общества клинической онкологии (ASCO, Чикаго, 2014) подчеркнута необходимость более широкого применения индивидуального подхода к лечению рака и принятия клинических решений с учетом молекулярно—генетических характеристик опухолей.

Доказано, что в ПК точечная мутация BRAF V600E ассоциирована с более высокой смертностью пациентов. Таким образом, она является важным молекулярным маркером, отражающим агрессивность биологического поведения опухолей и прогноз лечения для пациентов [1, 2].

Ген BRAF является протоонкогеном и кодирует белок, принадлежащий к семейству протеинкиназ RAF. BRAF является серин—треонин—киназой, обеспечивает взаимодействие белка RAS с сигнальным путем MAPK. RAS—BRAF—MAPK каскад ответственен за регуляцию клеточных ответов на внеклеточные сигналы (действие гормонов, цитокинов, различных факторов роста). По RAS—BRAF—MAPK пути сигнал достигает клеточного ядра, где в ответ на него происходит модуляция транскрипции генов, ответственных за пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клетки. Регуля-

Реферат

Проанализировано наличие мутации BRAF V600E в очаговых образованиях щитовидной железы (ЩЖ) при дооперационной диагностике папиллярной карциномы (ПК). Молекулярно—генетическое исследование проведено на пункционном аспирационном материале у 26 пациентов до оперативного вмешательства. Диагноз верифицирован по данным морфологического исследования. Мутации BRAF V600E выявлены только у пациентов при ПК ЩЖ. Таким образом, определение мутации BRAF V600E может быть маркером при дооперационной диагностике ПК ЩЖ.

Ключевые слова: щитовидная железа; папиллярная карцинома; дооперационная диагностика; мутации BRAF V600E.

Abstract

Analyzed the presence of BRAF V600E mutation in the focal thyroid gland in the preoperative diagnosis of papillary carcinoma (PC). Molecular genetic testing conducted on puncture aspirates from 26 patients before surgery. The diagnosis was verified according to the morphological investigations. Mutations in BRAF V600E detected only in patients with the thyroid PC. Thus, the definition of BRAF V600E mutation may be a marker in the preoperative diagnosis of thyroid PC.

Key words: thyroid gland; papillary carcinoma; preoperative diagnosis; BRAF V600E mutation.

ция этого пути является критичной для сохранения клеточного гомеостаза в ответ на изменения окружающей среды [3].

Мутации в генах—участниках этого киназного каскада выявляют в 30% всех злокачественных новообразований, в том числе в 7% — это мутации гена BRAF [3].

Точечная мутация, расположенная на 15—м экзоне гена BRAF, обуславливает замещение в соответствующей киназе аминокислоты валина на глутаминовую кислоту в положении 600 (BRAF V600E). В результате в мутированном белке BRAF активируется сайт регуляции фосфорилирования, что, в конечном итоге, способствует активации MAPK пути и, как следствие, повышению митотической и пролиферативной активности клетки, нарушению процесса

дифференциации и дизрегуляции естественной гибели клеток. Таким образом, при мутации в гене BRAF организм утрачивает контроль над ростом таких клеток, что способствует их опухолевому перерождению.

Из всех опухолей ЩЖ BRAF—мутации выявляют исключительно в ткани ПК и анапластической карциномы, они отсутствуют при фолликулярном, медулярном раке и доброкачественных образованиях ЩЖ [4]. По данным литературы, частота мутаций гена BRAF в ПК ЩЖ варьирует от 29 до 83% [5]. По результатам исследований установлены взаимосвязи BRAF—мутаций с возрастом пациентов, гистологическим вариантом опухоли, ее экстра-тиреоидным распространением, стадией заболевания, метастазированием в ре-

гионарные лимфатические узлы. Обнаружение BRAF V600E связано с высокой вероятностью возникновения рецидива рака ЩЖ даже у пациентов в начальной стадии заболевания [6].

фактора в оценке агрессивности ПК ЩЖ [1, 4, 5]. Такая мутация, вероятно, является единственным доступным молекулярным маркером, определяемым как фактор риска, до операции [5]. Обнаружение BRAF—

позволило бы упростить последующее наблюдение за этими пациентами, например, избежать профилактической диссекции шеи, ненужной радиойодтерапии после операции или даже ограничить вмешательст-

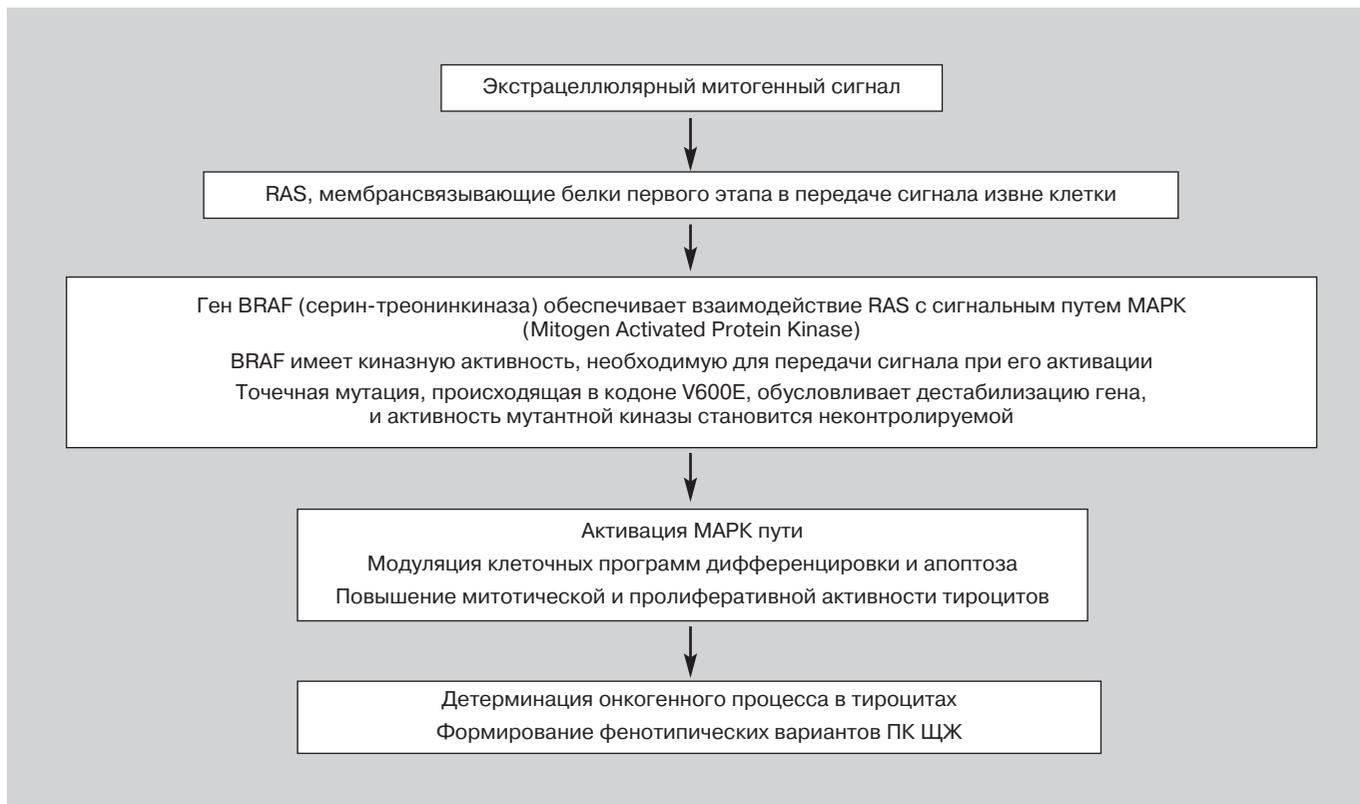


Рис. 1. Структурная активация RAS - BRAF - MAPK сигнального пути мутированным BRAF V600E в патогенезе ПК ЩЖ [1].

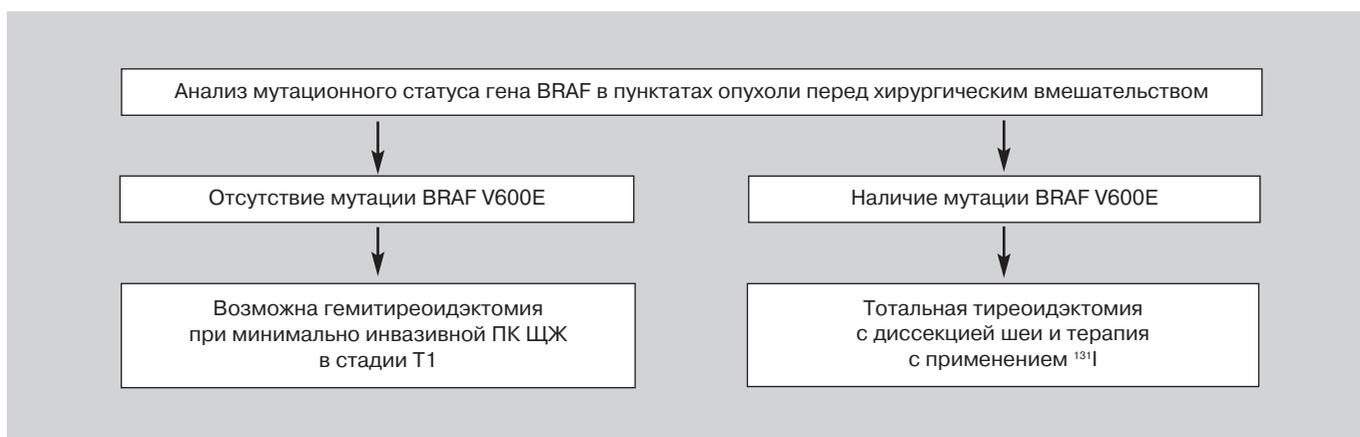


Рис. 2. Мутационный скрининг гена BRAF в хирургическом лечении ПК ЩЖ.

Наиболее важным вопросом для хирурга является правильная стратификация тактики до начала лечения, особенно по поводу небольших ПК ЩЖ. В последние годы мутацию BRAF V600E используют в качестве перспективного прогностического

фактора с оценкой стадии заболевания. Мутация позволяет до начала лечения разделить маленькие ПК ЩЖ на опухоли "низкого" и "высокого" риска. Многие исследователи отмечают, что отсутствие мутации гена BRAF при небольших ПК ЩЖ, возможно,

во односторонней гемитиреоидэктомией [7].

В частности, на основании анализа результатов комплексных молекулярно—биологических и клинических исследований клиницисты из Италии разработали блок—

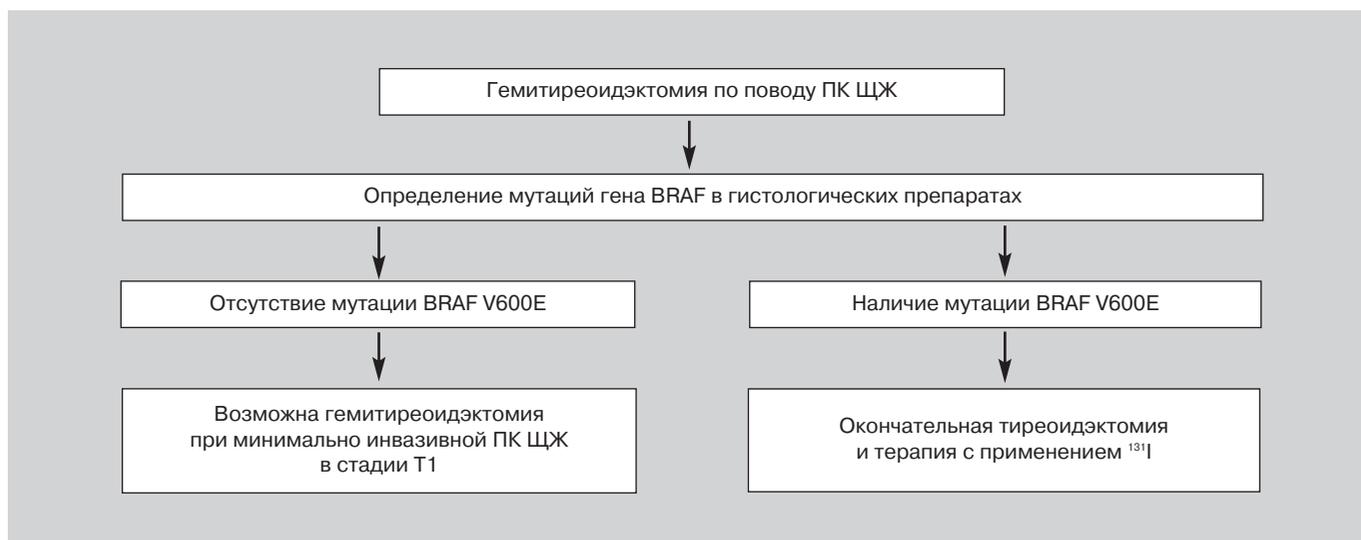


Рис. 3.

Мутационный скрининг гена BRAF после органосохраняющих операций по поводу ПК ЩЖ.

схему хирургической тактики на основе оценки BRAF—статуса при лечении ПК ЩЖ (рис. 1 — 3) [7].

Возможны два варианта идентификации мутаций BRAF: дооперационная, на цитологических образцах пунктатов опухоли, что может повлиять на выбор первичного лечения; и послеоперационная, на фиксированном материале с парафиновых блоков, что имеет клиническое значение для установления показаний к выполнению окончательной тиреоидэктомии.

При выявлении BRAF—мутаций до операции следует предполагать более агрессивное течение ПК ЩЖ, что обосновывает необходимость более радикального лечения — тотальной тиреоидэктомии, профилактической лимфаденэктомии центрального отдела шеи с последующей абляцией ^{131}I . С другой стороны, при отсутствии BRAF—мутации в пунктатах минимально инвазивной ПК в стадии T1 возможно решать вопрос о выполнении гемитиреоидэктомии.

Исследование BRAF—мутации по данным гистологического исследования после операции позволит объективизировать дальнейшую лечебную программу. При первичном выполнении гемитиреоидэктомии и обнаружении BRAF—мутации обосновано выполнение окончательной тиреоидэктомии с абляцией ^{131}I . При отсутствии BRAF—мута-

ции в минимально инвазивных ПК в стадии pT1 гемитиреоидэктомии можно считать достаточной и не проводить терапию ^{131}I без риска для пациента.

Однако такую точку зрения разделяют не все клиницисты, поскольку некоторые из них не отметили взаимосвязи между агрессивностью ПК ЩЖ и наличием в них мутации BRAF V600E [8, 9].

Цель исследования: определить возможность выявления мутации гена BRAF в пункционном материале и оценить значение обнаружения мутации BRAF V600E в дооперационной диагностике ПК ЩЖ и на этапе планирования хирургического лечения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 26 пациентов, у которых обнаружены очаговые образования ЩЖ. Возраст пациентов в среднем ($48,0 \pm 8,5$) года; соотношение мужчин и женщин 1 : 10.

До операции всем больным проведена тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия (ТАПБ) опухолей ЩЖ под контролем ультразвукового исследования. Полученный материал направляли для цитологического исследования и проведения молекулярных тестов. Гистологический диагноз и степень распространения рака ЩЖ устанавли-

вали в соответствии с классификацией TNM UICC (2002) [10].

Затем проводили молекулярно—генетические исследования для выявления возможной мутации V600E гена BRAF.

Подготовительный этап. Материал, полученный с помощью ТАПБ, помещали в пробирки со стабилизирующим реагентом RNAlater (Ambion, США). Образцы хранили при температуре -80°C до момента экстракции ДНК.

Выделение ДНК. ДНК выделяли из материала с использованием набора "Проба—НК" (ДНК—Технология, Россия) в соответствии с инструкцией. Образцы ДНК хранили при температуре -20°C .

Проведение цепной реакции с полимеразой (ЦПР) в реальном времени. Точечные мутации BRAF V600E определяли методом двунаправленной аллельспецифичной амплификации с детекцией результатов в режиме реального времени ("real—time" ЦПР).

Реакционная смесь содержала: 2 мкл ДНК, по 14 пмоль каждого праймера, Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, США), в составе которого: Maxima™ HS taq—полимераза, дНТФ, дУТФ, буфер, SYBR green. В исследовании использовали праймеры как для мутированного, так и дикого аллеля гена BRAF (для контроля уровня амплификации мРНК). Последователь-

Таблица 1. Частота выявления мутации BRAF в опухолях ЩЖ

| Показатель | Число пациентов | BRAF+ | | p |
|---------------------------|-----------------|-------|------|-------|
| | | абс. | % | |
| Возраст, лет | | | | |
| до 45 | 8 | 2 | 25 | <0,05 |
| старше 45 | 11 | 8 | 73 | |
| Пол | | | | |
| ж | 12 | 7 | 58 | >0,05 |
| м | 7 | 3 | 43 | |
| Гистологический тип | | | | |
| доброкачественная опухоль | 7 | 0 | 0 | <0,01 |
| ПК ЩЖ | 19 | 10 | 52,8 | |
| ТАПБ | | | | |
| ПК | 15 | 8 | 53,3 | >0,05 |
| Предположение о ПК ЩЖ | 4 | 2 | 50 | |
| Инкапсулированность | | | | |
| неинкапсулированная | 13 | 7 | 53,8 | >0,05 |
| инкапсулированная | 6 | 3 | 50 | |
| Мультифокальность | | | | |
| солитарные | 14 | 8 | 57,1 | >0,05 |
| мультифокальные | 5 | 2 | 40 | |

ность использованных праймеров: обратный праймер (общий для дикого и мутантного аллелей гена BRAF) RP—BRAF 5'—GGC—CAAAATT—TAATCAGTGGGA+3' и 2 прямых праймера: FW—BRAF 5'—TAGGT—GATTTTGGTCTAGC—TACAGT—3' — для дикого типа и FM—BRAF 5'—GGT—GATTTTGGTCTAGCTACA—3' — для мутированного аллеля гена [8].

Амплификацию проводили с помощью прибора CFX96 real—time PCR detection system (Bio—Rad, США). Программа амплификации включала начальную денатурацию (при 94°C в течение 10 мин) и 49 циклов денатурации (при 94°C в течение 20 с), гибридизации матрицы с праймерами (при 61°C в течение 30 с), элонгации (при 72°C в течение 40 с). Результаты анализировали с использованием программного обеспечения прибора, интерпретировали на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции на использованном канале с установленной на соответствующем уровне пороговой линии, что определяло наличие или отсутствие в данной пробе ДНК порогового цикла Ct (cycle threshold). Образец считали положительным, если Ct на канале FAM/Green не превышал 40.

Статистическая обработка данных при сравнении BRAF—позитивных и BRAF—негативных опухолей, а также оценка частоты мутации BRAF V600E проведена с использованием критерия χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ПК ЩЖ выявлены у 19 пациентов. Из больных, у которых обнаружены доброкачественные очаговые образования ЩЖ, у 5 — диагностировали фолликулярную аденому, у 1 — многоузловой коллоидный зоб, у 1 — диффузный тиреотоксический зоб.

У пациентов при верифицированной ПК ЩЖ по данным цитологического исследования злокачественная опухоль обнаружена у 15 (78,9%), у остальных — предположение о ее наличии.

В доброкачественных новообразованиях ЩЖ мутации BRAF V600E не выявлены, что достоверно отличало их от злокачественных опухолей (табл. 1), при этом мутации обнаружены у 10 (52,6%) больных. Установлена четкая взаимосвязь: частота BRAF—мутации увеличивалась по мере увеличения возраста пациентов. BRAF—мутации выявлены у 73% больных старше 45 лет и у 25% — моложе 45 лет.

BRAF—мутации в ПК ЩЖ несколько чаще выявляли у женщин, чем у мужчин — соответственно у 58,3 и 42,9%, однако различия недостоверны.

Стратификация риска, прогнозирование исхода заболевания, персонализация тактики лечения ПК ЩЖ основаны на таких факторах, как инвазивность, мультифокальность, поражение лимфатических узлов и BRAF—статус.

Частота обнаружения BRAF—мутации была практически одинаковой в инкапсулированных и неинкапсулированных ПК ЩЖ.

Мультифокальность опухоли — фактор, обосновывающий необходимость выполнения тиреоидэктомии. Исследователи не получили четких доказательств того, что BRAF V600E мутация связана с более высоким рейтингом мультифокальности опухоли и что прогнозировать интратиреоидную диссеминацию при BRAF—положительном статусе невозможно [2, 4]. Это подтверждают и наши данные: наличие мутации BRAF не было ассоциировано с мультифокальностью. Однако хотелось бы отметить, что в 50% наблюдений при предположении о наличии малигнизации по результатам ТАПБ обнаружены мутации BRAF, в том числе в 3 инкапсулированных ПК ЩЖ, которые не всегда можно выявить на интраоперационном этапе диагностики, в 2 из них — мутации BRAF V600E. Число таких наблюдений невелико, тем не менее, эти данные отчетливо свидетельствуют о возможности применения такого подхода в дооперационной диагностике новообразований ЩЖ, особенно инкапсулированных.

По данным сравнительного анализа BRAF—позитивных и BRAF—негативных ПК ЩЖ, генерация мутации не коррелировала с размерами опухоли, стадией заболевания, признаками экстратиреоидного распространения и наличием регионарных метастазов (табл. 2). При этом высокую (до 60%) частоту мутации выявляли в небольших ПК ЩЖ в стадии T1, при I клинической стадии такие мутации идентифицированы в 50% наблюдений.

Таким образом, по своим инвазивным характеристикам BRAF—позитивные ПК ЩЖ не были более агрессивными, чем BRAF—негативные. Взаимосвязь между прогностическими факторами и BRAF—статусом ПК ЩЖ является предметом широкого обсуждения.

Следует учитывать, что даже небольшие ПК ЩЖ могут иметь высокую биологическую агрессивность. Одним из маркеров такой потенциальной агрессивности считают BRAF—мутации. К такому выводу клиницисты пришли на основании обобщения большого фактического материала и сложного многофакторного анализа. При этом рассматривали не только инвазивные характеристики удаленной опухоли, но и отдаленные результаты лечения больных, в первую очередь, частоту рецидивов, отдаленных метастазов, радиойодрезистентность.

В силу объективных причин (у всех пациентов срок наблюдения менее 1 года после операции) мы не могли проанализировать данный аспект, но непременно планируем вернуться к нему в будущем. Возможно, проведение молекулярно—генетического тестирования в клинической практике позволит изменять избирательный терапевтический подход к лечению больных по поводу ПК ЩЖ, снизить риск возникновения хирургических осложнений, частоту рецидивов. С другой стороны, возможно уменьшение частоты выполнения тиреоидэктомии и выбор гемитиреоидэктомии как оперативного вмешательства достаточной радикальности.

ВЫВОДЫ

1. Молекулярное тестирование ПК ЩЖ при выборе лечебной программы позволяет персонализировать хирургическое лечение и применение радиоактивного йода. Воз-

Таблица 2. Сравнительный анализ BRAF—позитивных и BRAF—негативных ПК ЩЖ

| Показатель | BRAF + | | BRAF – | |
|------------------------------|--------|------|--------|------|
| | абс. | % | абс. | % |
| Возраст, лет | | | | |
| до 45 | 2 | 20,0 | 6 | 66,7 |
| старше 45 | 8 | 80,0 | 3 | 33,3 |
| Пол | | | | |
| ж | 7 | 70,0 | 5 | 55,6 |
| м | 3 | 30,0 | 4 | 44,4 |
| Размер опухоли, мм | | | | |
| до 10 | 3 | 30,0 | – | – |
| 11 – 40 | 6 | 60,0 | 7 | 77,8 |
| 41 и более | 1 | 10,0 | 2 | 22,2 |
| Инвазивный потенциал опухоли | | | | |
| интратиреоидная диссеминация | 8 | 80,0 | 7 | 77,8 |
| инвазия | 2 | 20,0 | 2 | 22,2 |
| Первичная опухоль, стадия | | | | |
| T1 | 6 | 60,0 | 4 | 44,5 |
| T2 | 1 | 10,0 | 2 | 22,2 |
| T3 | 1 | 10,0 | 3 | 33,3 |
| T4 | 2 | 20,0 | – | – |
| Регионарные метастазы | | | | |
| есть | 4 | 40,0 | 5 | 55,5 |
| нет | 6 | 50,0 | 4 | 44,4 |
| Стадия заболевания | | | | |
| I | 5 | 50,0 | 7 | 77,8 |
| II | 1 | 10,0 | – | – |
| III | 1 | 10,0 | – | – |
| IV | 3 | 30,0 | 2 | 22,2 |

можности проведения молекулярно—биологических исследований апробированы на пункционном материале, полученном из опухолей ЩЖ.

2. Частота мутаций BRAF V600E в ПК ЩЖ превышала 50%, установленная ее четкая взаимосвязь с возрастом: у пациентов старше 45 лет показатель почти в 3 раза выше, чем у пациентов моложе 45 лет.

3. Высокая частота и специфичность мутаций BRAF V600E для ПК ЩЖ свидетельствуют о возможности использования молекулярно—биологических методов в дооперационной диагностике опухолей ЩЖ.

4. У всех пациентов при наличии BRAF—мутации оптимальным методом лечения можно считать тиреоидэктомию с аблятивной терапией с применением ¹³¹I независимо от размеров опухоли.

5. В ближайшей перспективе важным результатом может быть уменьшение частоты выполнения завершающей тиреоидэктомии. В условиях отрицательного BRAF—статуса при минимально инвазивных ПК ЩЖ возможен выбор гемитиреоидэктомии как оперативного вмешательства достаточной радикальности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wojciechowska K. BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma / K. Wojciechowska, A. Lewinski // *Endocr. Regul.* — 2006. — Vol. 40, N 4. — P. 129 — 138.
2. Lee J. W. The prognostic implication and potential role of BRAF mutation in the decision to perform elective neck dissection for thyroid cancer / J. W. Lee, B. S. Koo // *Gland Surg.* — 2013. — Vol. 2, N 4. — P. 206 — 211.
3. Cantwell—Dorris E. R. BRAF V600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy / E. R. Cantwell—Dorris, J. J. O’Leary, O. M. Sheils // *Mol. Cancer Ther.* — 2011. — Vol. 10, N 3. — P. 385 — 34.
4. Impact of clinical risk scores and BRAF V600E mutation status on outcome in papillary thyroid cancer / S. M. Niederer—Wust, W. Jochum, D. Forbs [et al.] // *Surgery.* — 2015. — Vol. 157, N 1. — P. 119 — 125.

5. Association of BRAF(V600E) mutation with clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma: a study on a Chinese population / S. Liu, B. Zhang, Y. Zhao [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* — 2014. — Vol. 15, N 7. — P. 6922 — 6928.
6. Tang K. T. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications/ K. T. Tang, C. H. Lee // *J. Chin. Med. Assoc.* — 2010. — Vol. 73, N 3. — P. 113 — 128.
7. Miccoli P. BRAF mutation status in papillary thyroid carcinoma: significance for surgical strategy / P. Miccoli, F. Basolo // *Langenbeck's Arch. Surg.* — 2014. — Vol. 399, N 2. — P. 225 — 228.
8. Значение выявления мутации гена BRAF в дооперационной диагностике рака щитовидной железы / Д. Ю. Семенов, М. И. Зарайский, М. Е. Борискова [и др.] // *Клин. и эксперим. тиреологическая.* — 2009. — № 4. — С. 33 — 37.
9. Association between BRAF V600E mutation and regional lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma / Junliang Lu, Jie Gao, Jing Zhang [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* — 2015. — Vol. 8, N 1. — P. 793 — 799.
10. UICC: TNM Classification of Malignant Tumours; eds. L. H. Sobin, Ch. Wittekin — N. Y.: Wiley—Liss, 2002. — 6th ed. — 264 p.

