

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РАЗВИТИЯ ФОЛЛИКУЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ*

Сазонов М. Е., Штандель С. А., Караченцев Ю. И.,
Хазиев В. В., Дубовик В. Н., Гопкалова И. В.

*ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины»,
Харьков, Украина
admin@iper.com.ua*

К дифференцированному раку щитовидной железы (РЩЖ) относят папиллярную и фолликулярную карциномы, которые отличаются медленным течением, благоприятным прогнозом и являются наиболее распространенными клиническими вариантами течения этого заболевания [1]. Папиллярная аденокарцинома (ПРЩЖ) является наиболее частым гистопатологическим типом и составляет 50–60 % всех РЩЖ. У женщин эта опухоль встречается в три раза чаще, чем у мужчин. Макроскопически ПРЩЖ представляет собой частично инкапсулированный или не имеющий капсулы узел с кистозными полостями, ворсинчатой внутренней поверхностью, участками фиброза и кальцинатами, которые выявляются у половины больных.

Фолликулярная аденокарцинома (ФРЩЖ) занимает второе место по частоте

среди всех карцином щитовидной железы (ЩЖ) и наблюдается у 10–20 % больных, среди которых женщины составляют подавляющее большинство. Опухоль представляет собой хорошо отграниченный плотный узел розово-красного цвета, часто содержащий кальцинаты. Внутрижелезистая диссеминация наблюдается редко. В ряде случаев ФРЩЖ проявляет функциональную активность. Частота лимфогенного метастазирования составляет 2–10 %, гематогенные метастазы наблюдаются в 20 % случаев, типично поражение костей. Опухоль характеризуется медленным развитием и благоприятным прогнозом. 5-летняя выживаемость составляет 80 %, более 10 лет живут 70–75 % больных [1, 2]. На развитие РЩЖ влияют многие факторы, среди которых основными являются узловые образования в щитовидной железе,

* Работа выполнена в соответствии с плановой НИР ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины» «Розробка нових підходів до диференційної діагностики та комплексного лікування хворих на фолікулярні неоплазії щитоподібної залози» (№ госрегистрации 0115U001036).

Учреждением, финансирующим исследование, является НАМН Украины.

Авторы гарантируют ответственность за объективность представленной информации.

Авторы гарантируют отсутствие конфликта интересов и собственной финансовой заинтересованности.

Рукопись поступила в редакцию 12.04.2018.

ионизирующая радиация и генетические факторы [3].

ФРЦЖ остается одной из наибольших проблем как в плане дифференциальной диагностики при узловом зобе, так и потому, что молекулярные основы его развития остаются невыясненными. Фолликулярные опухоли характеризуются повышенной анеуплоидией; и, к настоящему времени в них были обнаружены два генетических дефекта [4–6]. Одним из них является мутация генов *RAS* (H-, N- и K-*RAS*), которые были обнаружены как в фолликулярной аденоме (ФА), так и в ФРЦЖ, при этом в последнем несколько чаще [4, 7]. Обнаруженная взаимосвязь между активацией онкогена *RAS* и анеуплоидией [4, 8, 9] объясняет особенности клинического течения ФРЦЖ. Роль мутаций *RAS* многими принимается, хотя это плохо сочетается с теми данными о мутациях *RAS* при ПРЦЖ, которые имеются на сегодняшний день [10].

Вторым генетическим дефектом, участвующим в развитии ФРЦЖ, являются перестановки *PAX8-PPAR γ 1*, описанные Kroll и соавт. в 2000 году, [11]. Химерный ген *PAX8-PPAR γ 1* образуется при слиянии гена фактора транскрипции *PAX8* (на хромосоме 2) и гена рецептора γ , активируемого пролифератором пероксисом (*PPAR γ*) (на хромосоме 3). Значение для ЩЖ гена *PPAR γ* остается не вполне понятным. Тем не менее, исследования, выполненные на клеточных линиях тиреоцитов, показали, что *PPAR γ* может играть роль в контроле апоптоза и дифференцировки, а при мутации гена и образовании *PAX8-PPAR γ 1* происходит подавление функции как *PPAR γ* , так и *PAX8* [12, 13]. На сегодняшний день рядом исследований подтверждено, что *PAX8-PPAR γ 1* присутствует в клетках ФРЦЖ (26–56 %), а также в клетках ФА (13–25 %) [14–16]. В связи с этим появилось мнение, что наличие *PAX8-PPAR γ 1* в предположительно доброкачественной фолликулярной неоплазии может свидетельствовать о том, что это преинвазивный фолликулярный рак [17]. Значение этих молекулярных изменений для туморогенеза и канцерогенеза в фолликулярных тиреоцитах еще предстоит опре-

делить. Наличие одних и тех же генетических дефектов, как в ФА, так и в ФРЦЖ при их одинаковой морфологии позволяет предположить, но никак не доказывает возможность перехода аденомы в карциному. На сегодняшний день принята концепция, в соответствии с которой мутации *RAS* и перестановки *PAX8 — PPAR γ* являются при ФРЦЖ самостоятельными и независимыми феноменами. Могут ли эти два, вероятно, различных дефекта быть задействованы в каком-то одном сигнальном каскаде (по аналогии с ПРЦЖ) — неизвестно. В связи с этим наиболее вероятно, что самые важные детали в туморогенезе фолликулярных тиреоцитов еще не известны.

Для ПРЦЖ характерны мутации генов *BRAF* и *RAS*, а также *RET/PTC* и *TRK* перестройки [10]. Согласно результатам генетического, генетического и молекулярно-генетического анализа ФРЦЖ и ПРЦЖ являются генетически самостоятельными заболеваниями, имеющими в системе генетического контроля общие гены, формирующие развитие предрасположенности к РЦЖ [3, 10, 18]. Вышесказанное создает предпосылки для изучения особенностей распределения мутаций гена *PAX8-PPAR γ 1* у больных как фолликулярными, так и папиллярными новообразованиями.

Несмотря на большое количество публикаций, посвященных эпидемиологии, факторам риска, клиническому течению и результатам лечения ФРЦЖ, множество вопросов, в первую очередь эпидемиологии, объективной диагностики и патогенеза этого заболевания, до настоящего времени остаются невыясненными. Исходя из вышесказанного, актуально изучить особенности распределения мутаций гена *PPAR γ* у больных неоплазиями ЩЖ. Для их решения необходимы целенаправленные исследования в области злокачественной трансформации тиреоцитов. Понимание молекулярных основ развития новообразований ЩЖ расширит наше представление о канцерогенезе и позволит оптимизировать тактику и стратегию их лечения.

Цель работы: определить роль мутаций во 2 и 6 экзонах гена *PPAR γ* в прогнозировании развития неоплазий ЩЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для подготовки материала для дальнейшего молекулярно-генетического исследования использован операционный материал 128 больных (жители Харьковской области), прооперированных в хирургическом отделении клиники ГУ ИПЭП (29 лиц с ФА, 48 больных ФРЩЖ и 51 пациента с ПРЩЖ). При морфологическом анализе тиреоидной патологии полученный материал классифицировался согласно Международной гистологической классификации (ВОЗ, 2004 года). Больные РЩЖ отбирались по следующим критериям: женщины в возрасте 20–40 лет, отсутствие иной злокачественной патологии и повышенного уровня антител к тиреопероксидазе, эутиреоидный статус, стадия онкопроцесса T₁₋₂ N₀ M₀.

Проводилось исследование полиморфизмов P12A во 2 экзоне и H449H в 6 экзоне гена *PPAR γ* . Для анализа выше указанных мутаций использовали примерно 100 нг геномной ДНК, выделенной из образцов замороженной ткани ЩЖ при помощи набора «ДНК-сорб-В» (Россия) и парафиновых блоков с использованием набора blackPREP FFPE DNA Kit Analytic Jena AJ (Германия). Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) [19, 20] использовались следующие праймеры: для экзона 2 прямой — 5'-GACAAAATATCAGTGTGAA TTACAGC-3' и обратный 5'-CCCAATAGCCG TATCTGGAAGG-3' (ПЦР-продукт состоял из 270 п.н.); для экзона 6 прямой — 5'-CCGCCAGGTTTGCTGAATGTG-3' и обратный 5'-CAGTGGCTGAGGACTCTCTG-3'

(ПЦР-продукт — 267 bp). Амплификация 2 и 6 экзонов гена *PPAR γ* проводилась в 20 мкл смеси, содержащей 0,3 мкл прямого и обратного праймеров, 0,3 мкл 0,25 mM dNTP, 1 U Taq DNA полимеразы и 2,0 мкл 10-кратного буфера. Амплификация проводилась в следующих условиях: для экзона 2 — первоначальная денатурация 4 минуты при 94°C, последующие шаги — 94°C 30 сек, 66°C 1 мин (35 циклов) и 1 цикл 72°C 6 минут. Для экзона 6 — первоначальная денатурация 3 минуты при 94°C, последующие шаги — 94°C 30 сек, 66°C 30 сек, 72°C 40 сек (35 циклов) и 1 цикл 72°C 6 минут. Идентификация полиморфизмов экзонов 2 и 6 проводилась при помощи рестриктоного анализа. Полиморфизм P12A (CCA→GCA) определялся при помощи 6U рестриктазы BstUI. Рестрикция проводилась в течение часа при температуре 66°C. В результате рестрикции наличие нормального аллеля определялось по фрагменту 270 п.н., мутантного — по фрагментам 227 п.н. и 43 п.н. Полиморфизм H449H (CAC→CAT) определялся при помощи 10U рестриктазы PmlI. Рестрикция выполнялась в течение 16 часов при температуре 37°C. В результате рестрикции мутантный аллель определялся по наличию фрагмента 267 п.н., мутантный — по фрагментам 160 п.н. и 107 п.н.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием критерия χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование выявило дифференцированную взаимосвязь исследуемых мутаций с клиническими формами неоплазий ЩЖ.

Показаны значимые различия (таблица 1) в распределении генотипов экзона 2 гена *PPAR γ* в образцах ФРЩЖ и ПРЩЖ ($\chi^2 = 44,441$; $df = 2$; $p = 0,000$) и ФА и ПРЩЖ ($\chi^2 = 47,360$; $df = 2$; $p = 0,000$). Среди больных ФРЩЖ и ФА мутация P12A/P12A встречалась значимо чаще, чем при ПРЩЖ (61,70, 68,97 vs 4,35 %; $\chi^2 = 31,861$; $p = 0,000$ и $\chi^2 = 32,778$; $p = 0,000$ соответственно).

Значимых различий в распределении генотипов экзона 6 гена *PPAR γ* в образцах ФРЩЖ и ПРЩЖ выявлено не было ($\chi^2 = 4,460$; $df = 2$; $p = 0,080$). Частота мутантных гомозигот при ФРЩЖ и ПРЩЖ была практически одинаковой и составляла 22,91 и 25,50 %, соответственно; $\chi^2 = 0,000$; $p = 0,993$.

Таким образом, мутация P12A/P12A в экзоне 2 гена *PPAR γ* является более значимой для прогнозирования риска развития фолликулярных неоплазий, чем полиморфизм H449H в 6 экзоне гена *PPAR γ* .

**Распределение частот генотипов
по исследуемым полиморфизмам у больных
разными клиническими вариантами неоплазий ЩЖ, %**

Полиморфизм	Генотип	Больной		
		ФА, n = 29	ФРЩЖ, n = 48	ПРЩЖ, n = 51
P12A	C/C	0,00	10,62	73,91
	C/G	31,03	27,66	24,74
	G/G	68,97	61,70	4,35
H449H	C/C	6,90	14,58	31,37
	C/T	48,28	62,50	45,10
	T/T	44,83	22,91	25,50

Значимые отличия наблюдались в распределении больных с ФА и ПРЩЖ по генотипам экзона 6 гена *PPARγ* ($\chi^2 = 7,121$; $df = 2$; $p = 0,026$), тогда как при распределении больных с ФРЩЖ и ФА таких различий выявлено не было ($\chi^2 = 4,338$; $df = 2$; $p = 0,114$). Среди лиц с ФА отмечалось меньше носителей нормального аллеля C/C, чем у больных ПРЩЖ: 6,90 и 31,37 %, соответственно ($\chi^2 = 4,313$; $df = 1$; $p = 0,038$).

Полученные результаты говорят о том, что исследуемые мутации не связаны с развитием злокачественного процесса, а ассоциированы с фолликулярным строением неоплазий. Это соответствует данным литературы, которые свидетельствуют лишь о различии генотипов *RAS* у больных с ФА

и ФРЩЖ. Так что если бы был возможен переход ФА в карциному, а *PAX8-PPARγ* был бы триггером в механизме этой трансформации, тогда в одной и той же опухоли должны были бы выявляться оба химерных гена: как *RAS*, так и *PAX8-PPARγ*, если конечно *RAS* не теряется в процессе опухолевой трансформации. Но показано, что генотип *N-RAS* преимущественно ассоциирован с ФА, тогда как *H-RAS* чаще обнаруживался при ФРЩЖ [6, 7, 17]. Таким образом, по имеющимся данным, можно принять концепцию, в соответствии с которой мутации *RAS* и перестановки *PAX8-PPARγ* являются при ФРЩЖ самостоятельными и независимыми феноменами [17].

ВЫВОДЫ

1. Выявлен дифференцированный вклад исследуемых мутаций в манифестацию ФРЩЖ. Большее прогностическое значение имеет полиморфизм P12A во 2 экзоне гена *PPARγ*.
2. Мутации P12A и H449H во 2 и 6 экзонах гена *PPARγ* ассоциированы с фолликулярной структурой неоплазий, но не влияют на злокачественный или доброкачественный вариант их развития.
3. Специфичность мутации P12A во 2 экзоне гена *PPARγ* по отношению к фолликулярному варианту течения неоплазий ЩЖ, может иметь практическое значение как полезный дополнительный метод дифференциальной диагностики узловых новообразований ЩЖ.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Mihnin AE. *Prakticheskaja Onkologija* 2007; 8 (1): 17-25.
2. Paches AI, Propp RM. *Rak shhitovidnoj zhelezy, Moskva, 1995: 372 p.*
3. Kazubskaja TP, Kozlova VM, Kondrat'eva TT, et al. *Arhiv Patologii* 2014; 5: 3-12.
4. Fagin JA. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 903-911.
5. Castro P, Eknaes M, Teixeira MR, et al. *J Pathol* 2005; 206: 305-311.
6. Sobrinho-Simoes M, Preto A, Rocha AS, et al. *Virchows Arch* 2005; 447: 787-793.

7. Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, et al. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2745-2752.
8. Rochefort P, Caillou B, Michiels FM, et al. *Oncogene* 1996; 12: 111-118.
9. Santelli G, De FV, Portella G, et al. *Cancer Res* 1993; 53: 5523-5527.
10. Fjurer D. *Mezhdunar Jendokrinol Zhurn* 2007; 3 (9), available at: http://www.mif-ua.com/archive/article_print/459.
11. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, et al. *Science* 2000; 289: 1357-1360.
12. Gregory PJ, Wang X, Allard BL, et al. *Oncogene* 2004; 23: 3634-3641.
13. Au AY, McBride C, Wilhelm KG, et al. *Endocrinology* 2006; 147: 367-376.
14. Cheung L, Messina M, Gill A, et al. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 354-357.
15. Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, et al. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3947-3952.
16. Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, et al. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 1016-1023.
17. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, et al. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2318-2326.
18. Shtandel' SA, Haziev VV, Dubovik VN, et al. *Innovacionnye tehnologii v jendokrinologii : tezisy III Vseros jendokrinol kongr s mezhdunar ucha-stiem, Moskva, 2017*: 59.
19. Valve R, Sivenius K, Miettinen R, et al. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3708-3712.
20. Chung-Jen Y, Beamer BA, Negri C, et al. *Bioch Biophys Res Commun* 1997; 241 (2): 270-274.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РАЗВИТИЯ Фолликулярного рака щитовидной железы

Сазонов М. Е., Штандель С. А., Караченцев Ю. И.,
Хазиев В. В., Дубовик В. Н., Гопкалова И. В.

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины»,
Харьков, Украина
admin@iper.com.ua

Получены данные относительно частот мутаций P12A и H449N во 2 и 6 экзонах гена *PPARγ* у больных неоплазиями щитовидной железы. 128 образцов ткани щитовидной железы (29 — фолликулярная аденома, 48 — фолликулярный рак, 51 — папиллярный рак) были исследованы на наличие мутаций. Показан дифференцированный вклад исследуемых мутаций в манифестацию фолликулярной карциномы. Мутации P12A и H449N во 2 и 6 экзонах гена *PPARγ* ассоциированы с фолликулярной структурой неоплазий, но не влияют на злокачественный или доброкачественный вариант их развития. Представленные результаты имеют непосредственное практическое значение. Так как мутация P12A во 2 экзоне гена *PPARγ* специфична по отношению к фолликулярному варианту течения неоплазий ЩЖ, то ее определение может являться полезным дополнительным методом дифференциальной диагностики узловых новообразований ЩЖ.

Ключевые слова: щитовидная железа, фолликулярные и папиллярные неоплазии, рак щитовидной железы, мутации P12A и H449N во 2 и 6 экзонах гена *PPARγ*.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ РОЗВИТКУ Фолікулярного раку щитоподібної залози

Сазонов М. Є., Штандель С. А., Караченцев Ю. І.,
Хазієв В. В., Дубовік В. М., Гопкалова І. В.

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України»,
м. Харків, Україна
admin@iper.com.ua

Отримано дані щодо частот мутацій P12A та H449N в 2 і 6 екзонах гена *PPARγ* у хворих на неоплазії щитоподібної залози. Було досліджено 128 зразків тканини щитоподібної залози (29 — фолікулярна аденома, 48 — фолікулярний рак, 51 — папілярний рак) на наявність мутацій. Показано диференційований внесок мутацій, що вивчались, у розвиток фолікулярної карциноми. Мутації P12A та H449N в 2 і 6 екзонах гена *PPARγ* асоційовані із фолікулярною структурою неоплазій, але не впливають на їх малігнізацію. Отримані результати мають безпосереднє практичне значення. Тоді як мутація P12A в 2 екзоні гена *PPARγ* специфічна по відношенню до фолікулярного варіанту перебігу неоплазій, то її визначення може виявитися корисним допоміжним методом диференціальної діагностики вузлових новоутворень щитоподібної залози.

Ключові слова: щитоподібна залоза, фолікулярні та папілярні неоплазії, рак щитоподібної залози, мутації P12A та H449N в 2 і 6 екзонах гена *PPARγ*.

**MOLECULAR-GENETIC MARKERS
OF THE THYROID GLAND'S FOLLICULAR CANCER DEVELOPMENT**

**M. E. Sazonov, S. A. Shtandel, Y. I. Karachentsev,
V. V. Khaziev, V. N. Dubovik, I. V. Gopkalova**

*SI «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine»,
Kharkiv, Ukraine
admin @ipep.com.ua*

The frequencies of P12A and H449H mutations in the 2 and 6 exons of the PPAR γ gene in patients with thyroid neoplasia were obtained. 128 thyroid tissue samples (29-follicular adenoma, 48-follicular cancer, 51-papillary cancer) were investigated for the presence of mutations. A differentiated contribution of the investigated mutations to the manifestation of follicular carcinoma is shown. The mutations P12A and H449H in the 2 and 6 exons of the PPAR γ gene are associated with the follicular structure of the neoplasia, but do not affect the malignant or benign variant of their development. The presented results are of direct practical importance. Since the P12A mutation in the 2 exon of the PPAR γ gene is specific to the follicular variant of the thyroid neoplasia, its determination may be a useful additional method for differential diagnosis of nodal tumors of the thyroid.

Key words: thyroid gland, follicular and papillary neoplasias, thyroid cancer, P12A and H449H mutations in the 2 and 6 exons of the PPAR γ gene.