

ЧАСТОТА МУТАЦИИ ГЕНА *BRAF* В ПАПИЛЛЯРНОМ РАКЕ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ВЗРОСЛЫХ

МАНЬКОВСКАЯ С.В.*, ДЕМИДЧИК Ю.Е.**,
САЕНКО В.А.***, ЯМАСИТА С.***

ГУ «Институт физиологии НАН Беларуси»,
Республиканский центр опухолей щитовидной железы, Беларусь**,
Department of International Health and Radiation Research, Nagasaki
University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan****

Резюме. В работе определена частота мутации гена *BRAF* в папиллярном раке щитовидной железы и изучена взаимосвязь данного молекулярного события с клинико-морфологическими характеристиками пациентов.

Исследуемую группу составили 49 больных с папиллярной карциномой. Средний возраст пациентов составил $37,2 \pm 10,9$ лет. Мутация *BRAF* обнаружена в 22 (44,9%) случаях. Анализ клинических данных показал, что единственным фактором, достоверно связанным с частотой данной мутации, оказался старший возраст пациентов ($p=0,524$; $Pp=0,0001$).

Других корреляций с клинико-морфологическими показателями выявлено не было.

Ключевые слова: папиллярный рак щитовидной железы, онкогены, мутации гена *BRAF*

Abstract. In work the frequency of *BRAF* gene mutation in papillary thyroid cancer was determined and the correlation of the given molecular event with clinical and morphological parameters of patients was investigated.

The study group included 76 patients with papillary thyroid carcinomas. The average age at diagnosis was $37,2 \pm 10,9$ yr. *BRAF* mutation was identified in 22 (44,9 %) cases. It was age of patients alone that proved to be consistently associated with *BRAF* mutations ($p=0,524$; $Pp=0,0001$).

No correlation between mutation and other clinico-pathological features was established.

Работа подготовлена в рамках проекта БРФФИ №Б08МС-007

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 220072, г.Минск, ул.Академическая д. 28, ГУ «Институт Физиологии НАНБ», mankovskaya_sveta@tut.by. - Маньковская С.В.

Введение

Папиллярный рак щитовидной железы (ПРЩЖ) – преобладающий гистологический тип карциномы, составляющий 65 – 85% всех злокачественных образований данного органа [1]. Следует отметить, что ПРЩЖ отличается разнообразием клинических особенностей протекания и многочисленными морфологическими вариантами опухоли [10]. Несмотря на большое количество научных публикаций, связанных с эпидемиологией, факторами риска, клиническим течением и результатами лечения этого заболевания, многие вопросы, в первую очередь этиологии, объективной диагностики и патогенеза папиллярного рака, до сих пор не ясны. Для их решения необходимы целенаправленные исследования, особенно в области изучения механизмов злокачественной трансформации тиреоцитов. Знание молекулярных основ развития новообразования расширит наше представление о канцерогенезе и позволит оптимизировать тактику и стратегию лечения.

Результаты генетических исследований показали, что в развитии папиллярной аденокарциномы щитовидной железы принимают участие различные онкогены. Однако наиболее часто встречаются структурные перестройки *RET/PTC* и *NTRK1*, а также точковые мутации генов семейства *RAS* и *BRAF* [3]. Общая частота их встречаемости такова, что практически в 100% случаев папиллярно рака можно ожидать присутствия того или иного онкогена (прочие активированные протоонкогены обнаруживаются в единичных наблюдениях). Отметим, что вышеупомянутые мутации представляют три независимых и непересекающихся пути развития ПРЩЖ, т.е. эти генетические события не выявляются совместно в одной и той же опухоли.

К настоящему моменту установлено, что у взрослых пациентов в 29 – 69% случаев ПРЩЖ обнаруживается активирующая точковая мутация T1799A (1799 – порядковый номер нуклеотида в транслируемом участке мРНК; замена тимидин-содержащего нуклеотида на аденин-содержащий) в 15 экзоне гена *BRAF* (*BRAF^{T1799A}*) [5, 6, 8]. В 600-ом аминокислотном остатке соответствующего полипептида мутация приводит к замене валина на глутаминовую кислоту (V600E).

Известно, что *BRAF^{T1799A}* выявляется исключительно в ткани папиллярной и анапластической карциномы (причем во многих случаях последнего типа опухоли зачастую встречаются остаточные участки папиллярного строения) и отсутствует в фолликулярном, медулярном раке и доброкачественных образованиях щитовидной железы [5, 6]. Данные о связи наличия *BRAF* мутации с клинической картиной заболевания носят противоречивый характер. Результаты нескольких исследований показали существование взаимосвязи *BRAF^{T1799A}* с экстра tireоидным распространением опухоли [5], стадией заболевания и метастазированием в регионарные лимфоузлы и отдаленные органы [6, 13]. Эти сведения, однако, не были подтверждены другими научными группами [7, 8, 11]. Однако было достоверно установлено, что частота мутации зависит от гистологического варианта ПРЩЖ [5, 6, 11] и возраста пациента [7, 8, 11]. Кроме того, оказалось, что присутствие *BRAF^{T1799A}* связано с вероятностью рецидива рака щитовидной железы даже у пациентов с

начальной стадией заболевания [13].

Цель настоящей работы заключалась в определении частоты распространения соматической мутации *BRAF* гена в папиллярной карциноме щитовидной железы у взрослых пациентов и анализ ее связи с клинικο-морфологическими характеристиками заболевания.

Методы

Исследовали 49 пунктатов пациентов (11 мужчин и 38 женщин, соотношение м:ж = 1:3,5) с ПРЩЖ. Возраст больных на момент исследования варьировал от 19,1 до 55,8 лет (в среднем $37,2 \pm 10,9$ лет). Во всех случаях предоперационная тонкоигольная аспирационная биопсия узлового образования проведена под контролем УЗИ. Полученный материал подвергался цитологическому исследованию, а смывы из аспирационной иглы использовались для молекулярных тестов. Диагноз ПРЩЖ был верифицирован гистологически у всех пациентов. Оценка степени распространения рака щитовидной железы проводилась в соответствии с TNM UICC 2002 года [10].

Для каждого случая собраны клинικο-анамнестические данные, представленные в таблице 1. Видно, что основной контингент составили лица женского пола с солитарными аденокарциномами до 2 см в наибольшем измерении, соответствующими категории pT1 (n=32; 65,3%). В значительном проценте наблюдений отмечалось метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов шеи.

Таблица 1

Клинικο-анамнестические характеристики пациентов

Переменная	Класс	Частоты и средние значения
1. Пол	Мужской	11 (22,4%)
	Женский	38 (77,6%)
2. Возраст (лет) на момент диагноза	Значение	19,1 – 55,8; средний – 37,2
3. Размер опухоли (мм)	Значение	3 – 70; средний – 18,6
4. Инвазивный потенциал опухоли	Интра tireоидная	41 (83%)
	Экстратиреоидная	8 (16,3%)
5. Характер роста опухоли	Солитарная	36 (73,5%)
	Мультифокальная	13 (26,5%)
6. Категория Т (TNM UICC)	T1	32 (65,3%)
	T2	9 (18,4%)
	T3	6 (12,2%)
	T4	2 (4,1%)
7. Категория N (TNM UICC)	N0	17 (34,7%)
	N1	32 (65,3%)

ДНК выделяли с помощью реагента TRIzol («Invitrogen», США) по методике производителя. Для амплификации фрагмента гена *BRAF* проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с парой праймеров: 5'–ACATACTTATTGACTCTAAGAGGAAAGATGAA–3' (прямой праймер, комплементарный участку интрона 14 *BRAF*) и 5' – GATTTTGTGAATACTGGGAACSTATGA – 3' (обратный праймер, комплементарный участку интрона 15 *BRAF*). В реакционную смесь (конечный объем 25 мкл) добавляли 5 мкл раствора исследуемой ДНК (10-100 нг) и проводили амплификацию с использованием полимеразы AmpliTaq Gold («Applied Biosystems», США) при следующих условиях: 95°C – 10 мин; 40 циклов 94°C – 30 сек, 60°C – 30 сек; 72°C – 30 сек.

Анализ продуктов ПЦР осуществляли методом электрофореза в горизонтальных блоках 1,5% агарозы с последующим окрашиванием бромистым этидием. Наличие целевого продукта определяли по присутствию в геле фрагмента ДНК длиной 400 п.о.

Далее 8 мкл ПЦР продукта обрабатывали реагентом ExoSap-IT («USB», США) при условиях: 37°C – 40 мин, 80°C – 20 мин и секвенировали с помощью набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 («Applied Biosystems», США) и прямого праймера. Реакция протекала при условиях: 94°C – 2 мин; 30 циклов 96°C – 10 сек, 60°C – 4 мин. Анализ полученных образцов проводили в 16 капиллярном автоматическом секвенаторе ABI 3100 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью теста ранговой корреляции Спирмена и точного двустороннего теста Фишера.

Результаты

Мутация *BRAF*^{T1799A} была выявлена в 22 (44,9%) из 49 случаев ПРЦЖ.

Анализ клинических данных показал отсутствие взаимосвязи этого молекулярного нарушения с полом, размером, фокальностью и степенью распространения опухоли (табл.2).

Таблица 2

Частота выявления клиничко-морфологических различий ПРЦЖ

Параметр	Наличие мутации <i>BRAF</i>	Отсутствие мутации <i>BRAF</i>	P
Количество случаев	22 (44,9%)	27 (55,1%)	
Пол			
мужской	5 (10,2%)	6 (12,2%)	1,00
женский	17 (34,7%)	21 (42,9%)	
Размер опухоли			
< 10 мм	9 (18,4%)	8 (16,3%)	0,55
≥ 10 мм	13 (26,5%)	19 (38,8%)	
Метастазирование в лимфоузлы			
N0	10 (20,4%)	7 (14,3%)	0,23
N1	12 (24,5%)	20 (40,8%)	

Параметр	Наличие мутации <i>BRAF</i>	Отсутствие мутации <i>BRAF</i>	P
Инвазивный потенциал опухоли			
Интратиреоидный	21 (42,9%)	23 (46,9%)	0,36
Экстратиреоидный	1 (2,0%)	4 (8,2%)	
Характер роста опухоли			
Солидарный	15 (30,6%)	21 (42,9%)	0,53
Мультифокальный	7 (14,3%)	6 (12,2%)	
Стадия заболевания			
III - IV	8 (16,3%)	4 (8,2%)	0,10

Установлено, что точковая мутация T1799A в 15 экзоне гена *BRAF* чаще встречалась у больных с расширенной стадией заболевания (табл.2), хотя статистическая достоверность не была достигнута.

Метастазы в регионарные лимфоузлы шеи найдены в 11 (22,4%) случаях с *BRAF*^{T1799A} и у 20 (40,8%) больных с неизменным *BRAF*^{T1799A} геном. Наблюдаемые различия оказались также статистически незначимы.

При гистологическом исследовании удаленной ткани, опухоли с классическим сосочковым строением обнаружены в 38 (77,6%) наблюдениях, фолликулярный вариант папиллярного рака щитовидной железы установлен в 7 (14,3%), диффузный склерозирующий и солидный - в 4 (8,2%) случаях. При этом мутированный ген найден в 57,9% случаях ПРЩЖ преимущественно сосочкового строения.

На момент исследования возраст пациентов варьировал от 19,1 до 55,8 лет. Оказалось, что у больных старшей возрастной группы частота мутации гена *BRAF* достоверно увеличивается ($p=0,524$; $Pp=0,0001$). Результаты определения этого генетического дефекта в изученной когорте представлены на рисунке.

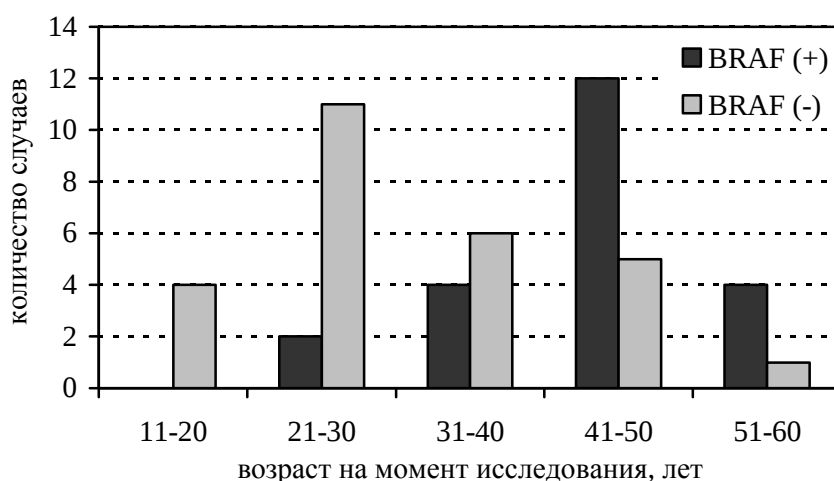


Рис. Частота встречаемости дикого (BRAF(-)) и мутированного (BRAF(+)) типа *BRAF* у пациентов различного возраста.

Обсуждение

Рак щитовидной железы не относится к наиболее распространенным злокачественным опухолям человека. Однако в последние десятилетия отмечается увеличение количества случаев данного заболевания во многих странах, что обуславливает повышенный интерес к изучению фундаментальных и прикладных аспектов этой патологии.

Результаты таких работ очень важны для нашей республики, где тиреоидный рак остается актуальной проблемой. За 19-летний период после Чернобыльской аварии эта патология установлено у 12 136 больных [2]. Текущая эпидемиологическая ситуация заключается в продолжающемся росте количества случаев ПРЩЖ среди взрослого работоспособного населения (19 лет и старше). В этой выборке часто встречаются агрессивные формы папиллярной карциномы, которые характеризуются экстра tireоидной инвазией, мультифокальным ростом, множественными метастазами в регионарные лимфоузлы и отдаленные органы. Предполагается, что такое клиническое течение заболевания, скорее всего, связано с молекулярно-генетическими нарушениями в опухолевых клетках, что создает предпосылки для проведения исследований в этой области.

Ген *BRAF* кодирует цитоплазматическую серин/треониновую-киназу, которая считается одним из наиболее мощных активаторов MAP-киназного (Mitogen Activated Protein Kinase) сигнального каскада, участвующего в ряде клеточных программ, таких как пролиферация, дифференцировка и апоптоз. Активирующие точечные мутации этого протоонкогена обнаружены в 70% меланом, 15% карцином толстой кишки, 22% холангиокарцином [4]. Наиболее распространенной, составляющей до 80 % всех повреждений *BRAF*, является трансверсия T1799A в 15 экзоне гена. Она приводит к замене в белке аминокислотного остатка валина на глутаминовую кислоту в 600 позиции и образованию онкогенного протеина с высокой киназной активностью. Предполагаемый механизм действия мутации заключается в следующем. Активация киназы *BRAF* в нормальных условиях происходит за счет фосфорилирования остатков треонина (в позиции 599) и серина (в позиции 602). Отрицательный заряд глутаминовой кислоты, которую содержит мутантный белок в положении 600, имитирует отрицательный заряд фосфорилированной (активной) формы *BRAF*. Таким образом, активность мутантной киназы *BRAF* перестает регулироваться фосфорилированием T599 и S602 и становится неконтролируемой.

По данным различных авторов, частота мутаций гена *BRAF* в ПРЩЖ варьирует в широких пределах, 29% – 83% [5, 6, 8, 12]. При этом в подавляющем большинстве случаев (в среднем до 45 %) обнаруживается именно трансверсия T1799A. Различия в частоте распространенности *BRAF*^{T1799A} в папиллярной карциноме можно объяснить как численной и гистологической неоднородностью исследованных групп, так и чувствительностью методов, использованных для выявления данного генетического повреждения.

В нашей работе, выполненной с помощью прямого секвенирования амплифицированных фрагментов ДНК, $BRAF^{T1799A}$ обнаружена в 44,9% случаев ПРЦЖ у взрослых в опухолях преимущественно сосочкового строения и не была найдена ни в одном случае фолликулярного или диффузного склерозирующего вариантов. Это согласуется с ранее опубликованными данными о наиболее высокой распространенности трансверсии T1799A в папиллярной карциноме с классическими сосочковым или смешанным строением [5, 6, 11]. В единичных случаях фолликулярного и солидного варианта ПРЦЖ могут выявляться другие мутации гена $BRAF$ [12].

Статистическая обработка данных свидетельствуют о том, что частота $BRAF^{T1799A}$ увеличивается с возрастом больных. Так в подгруппе «41-50 лет на момент исследования» вышеуказанная мутация выявлена в большинстве наблюдений ($n=13$, 76,5 %). В то же время полученные результаты подтверждают выводы о том, что это молекулярное событие не характерно для ПРЦЖ у молодых пациентов [7, 8]. Взаимосвязь трансверсии с возрастом больных позволяет считать её наиболее характерным генетическим нарушением в папиллярной тиреоидной карциноме у взрослых. При этом следует заметить, что во всех международных классификациях более старший возраст пациента на момент установления диагноза зафиксирован как фактор, ухудшающий прогноз рака щитовидной железы. Таким образом, учитывая полученные данные, можно предположить, что наличие $BRAF$ мутации отражает биологические особенности развития опухолевого процесса в различных возрастных группах.

Из данных литературы известно, что в папиллярной микрокарциноме щитовидной железы $BRAF^{T1799A}$ обнаруживается в 20 – 40 % наблюдений (в среднем около 30 %) [9, 11]. Согласно нашим результатам, мутация найдена в 13 из 21 (61,9%) биоптатов узлов диаметром менее 10 мм. В тоже время в опухолях, размер которых превышал 10 мм, $BRAF^{T1799A}$ была выявлена в 9 из 28 (32,1%) случаев. Таким образом, частота распространения мутации в папиллярных микрокарциномах у наших пациентов оказывается несколько выше, чем в других популяциях, что может быть частично связано с относительно небольшим числом опухолей, исследованных в настоящей работе. Во всяком случае, полученные результаты позволяют рассматривать мутацию гена $BRAF$ как раннее молекулярное событие канцерогенеза ПРЦЖ.

Полученными нами данные демонстрируют отсутствие зависимости наличия мутированного $BRAF$ с экстратиреоидным и мультифокальным характером роста опухоли. Кроме того, из 32 (65,3 %) случаев ПРЦЖ с метастазами в регионарные лимфоузлы шеи данная мутация найдена только у 10 (20,4 %) больных. Таким образом, хотя в ряде работ показана связь этой мутации с более высоким потенциалом злокачественности опухоли, агрессивностью роста и метастазированием [5, 6, 13], результаты проведенного исследования не разрешают сделать аналогичное заключение.

Следует отметить, что в изученной группе 7 (14,3%) пациентов с $BRAF$ мутацией имели IV стадию заболевания. На наш взгляд, несмотря на то, что во всех случаях найдены множественные метастазы в шейные лимфоузлы, это,

скорее всего, связано с возрастом больных (45 лет и старше), чем с выявленным генетическим дефектом.

Заключение

1. Обнаружено, что мутация *BRAF*^{T1799A} чаще встречается у пациентов старшей возрастной группы и связана с гистологическим вариантом папиллярной карциномы.

2. Найдено отсутствие взаимосвязи этого молекулярного нарушения с размером, характером роста и степенью распространения опухоли. Возможно, что дальнейший анализ наличия этой мутации в однородных по гистологическому строению карциномах позволит четче установить корреляцию с клинико-морфологическими особенностями заболевания.

3. Представленные результаты исследования имеют непосредственное практическое значение. Принимая во внимание высокую частоту распространения *BRAF*^{T1799A} в ПРЦЖ и ее строгую специфичность по отношению к данному типу тиреоидного рака, выявление мутированного *BRAF* в материале тонкоигольной аспирационной биопсии может оказаться полезным вспомогательным методом предоперационной дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы.

Литература

1. Валдина, Е. А. Заболевания щитовидной желез / Е. А. Валдина. – СПб.: Питер, 2006. – 368 с.

2. Чернобыль 20 лет спустя. Стратегия восстановления и устойчивого развития пострадавших регионов. 20 years after Chernobyl. Strategy for recovery and sustainable Development of the Affected regions: матер. междунаро. конф., Минск, 19-21 апр., 2006 г. / Ком. по проблемам последствий катастрофы на Чернобыль. АЭС при Совете Министров Республики Беларусь. – Минск: Беларусь, 2006. – 448 с.

3. Alternative mutations of *BRAF*, *RET* and *NTRK1* are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer / Y. Cohen [et al.] // *Oncogene*. – 2004. – Vol. 23. – P. 7436-7440.

4. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer / H. Davies [et al.] // *Nature*. – 2002. – Vol. 417, N 6892. – P. 949-954.

5. Korpaczynska, E. *BRAF* gene mutation in thyroid cancer / E. Korpaczynska, R. Junik, T. Tyrakowski // *Pol. Merkur Lekarski*. – 2006. – Vol. 20, N 116. – P. 210-213.

6. Clinical implication of hot spot *BRAF* mutation, V599E, in papillary thyroid cancers / H. Namba [et al.] // *J Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – Vol. 88. – P. 4393-4397.

7. Frequency of *BRAF* T1796A mutation in papillary thyroid carcinoma relates to age of patient at diagnosis and not to radiation exposure / N. Powell [et al.] // *J. Pathol.* – 2005. – Vol. 205, N 5. – P. 558-564.

8. *BRAF* (V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas / E. Puxeddu [et al.] // *J Clin. Endocrinol. Metab.* – 2004. – Vol. 89. – P. 2414-2420.

9. The BRAFT1796A transversion is a prevalent mutational event in human thyroid microcarcinoma / I. Sedliarou [et al.] // Int. J Oncol. – 2004. – Vol. 25, N 6. – P.1729-1735.
10. TNM Classification of Malignant Tumors, 6th Edition. Ed. H. Sobin, Ch.Witteking, 2002.
11. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness / V. Trovisco [et al.] // Virchows Arch. – 2005. – Vol. 446, N 6. – P.589-595.
12. A new BRAF gene mutation detected in a case of a solid variant of papillary thyroid carcinoma / V. Trovisco [et al.] // Hum. Pathol. – 2005. – Vol. 36, N 6. – P. 694-697.
13. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer / M. Xing [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2005. – Vol. 90, N 12. – P.6373-6379.