

различий опухолей. Таким образом, показатель содержания ДНК в опухолевых клетках можно рассматривать в качестве фундаментального переходного моста между лабораторными и клиническими исследованиями больных со злокачественными опухолями вообще и слизистой оболочки полости рта и гортани в частности.

В заключение следует подчеркнуть информативность определения плоидности ДНК в клетках карциномы головы и шеи для прогноза заболевания и возможной индивидуализации последующего лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Алферов В. С. Органосохраняющие методы лечения рака гортани: Дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1993.
2. Матякин Е. Г., Ольховская И. Г. // Журн. ушн., нос. и горл. бол. — 1991. — № 3. — С. 36—39.
3. Николаева Т. Г., Добрынин Я. В., Басов Б. Н. и др. // Вестн. ОНЦ РАМН. — 1994. — № 1. — С. 30—37.
4. Николаева Т. Г., Добрынин Я. В., Алферов В. С. и др. // Там же. — 1995. — № 1. — С. 17—22.
5. Николаева Т. Г., Полоцкий Б. Е., Басов Б. Н. и др. // Там же. — № 3. — С. 40—45.
6. Arai Y., Tsukuda M., Ito K. et al. // Auris Nasus Larynx. — 1997. — Vol. 24, N 2. — P. 193—198.
7. Beerman Y., Kluin H., Hermans J. et al. // Int. J. Cancer. — 1990. — N 45. — P. 34—39.
8. Cook L., Cook T., Bootz F. et al. // Br. J. Cancer. — 1990. — Vol. 61, N 5. — P. 759—762.
9. Cook L., Cook T., Forster G. et al. // Cein otolaryng. — 1994. — Vol. 19, N 2. — P. 131—134.
10. Crisman J., Zabro P. // Arch. Otolaryng. Head Neck Surg. — 1991. — Vol. 117, N 2. — P. 182—184.

© Коллектив авторов, 2000

УДК 616.441-006.6-08-039.71:575.224

Ф. А. Амосенко, В. Н. Калинин, В. М. Козлова, Л. Н. Любченко, Т. П. Казубская, Р. Ф. Гарькавцева

МУТАЦИИ В ПРОТООНКОГЕНЕ RET У БОЛЬНЫХ С МЕДУЛЛЯРНЫМ РАКОМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ВОЗМОЖНОСТИ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ НОСИТЕЛЕЙ ЭТОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Медико-генетический научный центр РАМН, Москва, Хирургическая клиника Гамбургского университета, Германия, НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Медуллярный рак щитовидной железы (Medullary Thyroid Carcinoma — MTC) — эндокринная опухоль, образующаяся из кальцитонинпродуцирующих С-клеток щитовидной железы и составляющая 4 — 20% от всех карцином данной локализации. МТС может возникать спорадически (в 75% случаев) или как часть синдромов множественной эндокринной неоплазии типа 2 (MEN 2). MEN 2 — семейный раковый синдром, наследуемый по аутосомно-доминантному типу.

11. Danesil D., Spanol M., Altavisa P. et al. // Cytometry. — 1997. — Vol. 30, N 2. — P. 85—97.
12. Ensley G., Maciorowski Z., Hassan H. et al. // Ibid. — 1989. — Vol. 10, N 3. — P. 334—338.
13. Ensley G., Maciorowski Z., Pietrazkiewicz M. et al. // International Conference on the Adjuvant Therapy of Cancer, 7-th. March 10—13. — Ticson, 1993. — P. 12.
14. Ensley G. F. // Cancer Metastasis Rev. — 1996. — Vol. 15, N 1. — P. 133—141.
15. Fu K., Hammond P., Pajak F. et al. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. — 1994. — Vol. 29, N 4. — P. 661—174.
16. Jones A., Roland N., Caslin A. et al. // J. Laryng. otol. — 1994. — Vol. 108, N 10. — P. 859—864.
17. Gregg C., Beals T., McClatchy et al. // Otolaryng. Head Neck Surg. — 1993. — Vol. 108, N 6. — P. 731—757.
18. Hemmer J., Thein N., van Heerden // Cancer. — 1997. — Vol. 79, N 12. — P. 2309—2313.
19. Kallioniemi O.-P., Blanko M., Alairo M. et al. // Ibid. — 1988. — N 62. — P. 2183—2190.
20. Kearsley J., Bryson G., Battistutto D. et al. // Int. J. Cancer. — 1991. — Vol. 47, N 1. — P. 31—37.
21. Kokal W., Gardiner R., Sheiban K. et al. // Proc. Am. Soc. clin. Oncol. — 1988. — N 7. — P. 149.
22. Lampe H. B. // Laryngoscope. — 1993. — Vol. 103, N 3. — P. 637—644.
23. Rapol S., Caldini A., Fanelli A. et al. // Cytometry. — 1996. — Vol. 26, N 2. — P. 192—197.
24. Volm H. // Tumor diagnostic therapie. — 1989. — N 10. — P. 229—232.
25. Wolf G., Fisher S., Truelson J. et al. // Laryngoscope. — 1994. — Vol. 104, N 4. — P. 479—483.

Поступила 28.04.98 / Submitted 28.04.98

F.A.Amosenko, V.N.Kalinin, V.M.Kozlova, L.N.Lyubchenko, T.P.Kazubskaya, R.F.Garkavtseva

PROTOONCOGENE RET MUTATIONS IN PATIENTS WITH MEDULLARY THYROID CARCINOMA: PRECLINICAL DIAGNOSIS AND PROPHYLACTIC TREATMENT

Medical Genetics Research Center RAMS, Moscow; Surgery Clinic, University of Hamburg, Germany; Institute of Clinical Oncology, N.N.Blokhin Memorial CRC, RAMS, Moscow

Medullary thyroid carcinoma (MTC) is an endocrine tumor originating from calcitonin-producing C-cells of the thyroid and accounting for 4% to 20% of all thyroid carcinomas. The MTC may develop sporadically (75% of cases) or as a component of type 2 multiple endocrine neoplasia (MEN 2). The MEN 2 is a familial cancer syndrome with autosomal dominant inheritance and phenotypic polymorphism of clinical disease of three types: MEN 2A, MEN 2B and familial

Особенности клинического проявления этого синдрома — фенотипический полиморфизм, выраженный тремя типами заболевания: MEN типа 2A (MEN 2A), MEN типа 2B (MEN 2B) и семейный медулярный рак щитовидной железы (familial medullary thyroid carcinoma — FMTC). Для больных с MEN 2A, помимо МТС, характерно наличие феохромоцитомы (обнаружена примерно у 50% пациентов) и гиперплазии паращитовидной железы (обнаружена примерно у 20—30% пациентов) [50]. При MEN 2B наблюдаются те же симптомы, что и при MEN 2A, но отсутствует гиперплазия паращитовидной железы. Кроме того, для больных с MEN 2B характерны марфаноподобное телосложение, невромы слизистых оболочек и ганглионарный нейрофиброматоз кишечного тракта [20, 50]. Для больных с FMTC характерен только медулярный рак щитовидной железы [18].

Этиологическим фактором заболеваний с синдромами MEN 2 практически во всех изученных случаях являются наследуемые миссенсмутации в протоонкогене RET. Работы, сообщающие об этом, стали появляться с 1993 г. [21, 37]. Ген RET (RE-arranged during Transfection) локализован на длинном плече хромосомы 10 (10q11.2). Группа японских исследователей клонировала кДНК человека и мыши и определила первичную структуру RET-белков [25, 54, 55]. Ген охватывает около 60 kb геномной ДНК, включает 21 экзон [40, 45] и кодирует несколько видов мРНК, образующихся в результате альтернативного сплайсинга [34, 41, 53]. Продуктами гена RET являются тирозинкиназы (TK) рецепторного типа (полипептиды, состоящие из 1072—1114 аминокислот), которые участвуют в контроле пролиферации, миграции и/или дифференцировке клеток неврального гребня [54, 55]. Молекула RET-белка включает большой лигандсвязывающий экстраклеточный домен, гидрофобный трансмембранный домен и цитоплазматический домен с тирозинкиназной активностью. Экстраклеточный домен RET-белка отличается от аналогичных участков других рецепторных TK, присутствующих в клетках, тем, что содержит цистеинобогатую область (в непосредственной близости от трансмембранного домена). И кроме того, кадгеринподобный участок расположен в середине экстраклеточного домена [54].

Лигандом для рецептора, кодируемого протоонкогеном RET, являются два родственных нейротрофных фактора: GDNF (Glial cell linederived neurotrophic factor) [12, 58] и NTN (neurturin) [7, 30, 42], которые взаимодействуют с RET-рецептором через ко-рецепторы: GDNFR — α (Glycosyl-phosphatidylinositol-linked protein = GPI-linked protein) и NTN- α соответственно [27, 57]. В норме в результате образования комплекса GDNF/GDNFR — α /RET или NTN/NTN- α /RET происходит димеризация RET-белка на клеточной поверхности, что инициирует фосфорилирование тирозиновых остатков как самого RET-белка (автофосфорилирование), так и некоторых других клеточных белков [57].

В организме человека ген RET экспрессируется в нормальных и опухолевых тканях нейроэндокринной дифференцировки, включая парафолликулярные С-клетки и МТС, мозговой слой надпочечников и феохромоцитому, нейробластомы [24], периферические нервы и их опухоли.

medullary thyroid carcinoma (FMTC). Patients with MEN 2A besides MTC may have pheochromocytoma (about 50%) and parathyroid hyperplasia (20–30%) [50]. Patients with MEN 2B have the same symptoms as with MEN 2A less parathyroid hyperplasia plus Marfan syndrome-associated constitution, mucosal neuromas and intestinal ganglionic neurofibromatosis [20,50]. FMTC patients have medullary thyroid carcinoma alone [18].

Missense mutations of RET protooncogene are an etiological factor of practically all diseases related to the MEN 2 syndrome. Publications describing this condition have been appearing since 1993 [21,37]. The gene RET (RE-arranged during Transfection) is located in the long arm of chromosome 10 (10q11.2). Japanese investigators cloned human and murine cDNA to discover primary structure of RET proteins [25,54,55]. The gene covers about 60 kb of genomic DNA, consists of 21 exons [40,45] and encodes several mRNA types generated as a result of alternative splicing [34,41,52]. RET products are receptor tyrosine kinases (TK), polypeptides consisting of 1072–1114 amino acids, involved in control of proliferation, migration and/or differentiation of neural crest cells [54,55]. RET protein molecule consists of a ligand-binding extracellular domain, a hydrophobic transmembrane domain and a cytoplasmic domain with TK activity. The RET extracellular domain is different from similar regions of other receptor TK due to a cysteine-enriched site (in the vicinity of the transmembrane domain) and a cadherin-like domain in the middle [54].

Two related neurotrophic factors GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) [12,58] and NTN (neurturin) [7,30,42] are ligands of the RET encoded receptor. They interact with the RET-receptor via co-receptors GDNFR- α (glycosyl-phosphatidylinositol-linked protein = GPI-linked protein) and NTN- α , respectively [27,57]. Normally, generation of the complex GDNF/GDNFR- α /RET or NTN/NTN- α /RET results in dimerization of RET protein on the cell surface which initiates phosphorylation of tyrosine residues of both the RET protein itself and some other cell proteins [57].

In humans RET is expressed in normal and neoplastic tissues of neuroendocrine differentiation including parafollicular C-cells and MTC, adrenal medulla and pheochromocytoma [24], neuroblastoma, peripheral nerves and their tumors.

In rat and mouse embryos high RET expression was found in the excretory system, peripheral and central neural systems including intestinal and sympatic neural systems and spinal marrow motor neurons [43,59]. These findings are supported by the absence of intestinal neurons and the presence of renal agenesis or dysgenesis in transgenic mice knocked out by both RET copies [51].

Clusterization is a common feature of most RET mutations seen in MEN 2 patients. They are located in one of two domains of RET protooncogene. The only point mutation in codon 918 (exon 16) is found in more than 95% of MEN 2 families [8,21,47]. This mutation (ATG → ACG) leads to substitution of treonine for methionine in the RET protein TK cytoplasmic domain. Missense mutations in one of the five cysteine codons [609, 611, 618, 620 (exon 10) or 634 (exon 11)] in the RET TK extracellular domain are identified in

При изучении экспрессии гена RET в эмбрионах крыс и мышей был обнаружен ее высокий уровень в развивающейся выделительной системе, а также в развивающихся периферической и центральной нервных системах, включая кишечную и симпатическую нервные системы, а также моторные нейроны спинного мозга [43, 59]. В подтверждение этих данных есть сообщение о том, что у трансгенных мышей, нокаутированных по обоим копиям гена RET, отсутствуют нейроны кишечника и имеет место почечный агенез или дисгенез [51].

Для большинства мутаций гена RET, выявляемых у больных с синдромами MEN 2, отмечается кластеризация. Они локализованы в одной из двух областей RET-протоонкогена. Единственная точечная мутация в кодоне 918 (экзон 16) обнаружена более чем в 95% семей с MEN 2B [8, 21, 47]. Эта мутация (ATG → ACG) приводит к замене метионина на треонин в цитоплазматическом тирозинкиназном домене RET-белка. Миссенс-мутации в одном из пяти цистеиновых кодонов [609, 611, 618, 620 (экзон 10) или 634 (экзон 11)] в экстраклеточном домене RET TK идентифицированы более чем в 95% семей, отягощенных по MEN 2A, и в 70–80% семей с FMTC [32, 37, 52]. Наиболее распространенными MEN 2A-мутациями являются мутации в кодоне 634, а среди них — замена TGC → CGC [9, 16]. Миссенс-мутации в кодонах 768 и 804 в тирозинкиназном домене были обнаружены у 5–10% пациентов с FMTC [4, 15]. Кроме того, в цитоплазматическом домене RET TK были описаны следующие MEN 2A- и FMTC-мутации, встречающиеся в единичных случаях: V804M в экзоне 14 [9, 19], L790F и Y791F в экзоне 13 [23], S891A в экзоне 15 [1, 22] и др.

В настоящее время достаточно хорошо установлено, что MEN 2A- и FMTC-мутации протоонкогена RET, затрагивающие один из пяти цистеинов в цистеинобогатой области экстраклеточного домена RET TK, приводят к конститутивной активации TK в результате образования ковалентно связанных гомодимеров RET-белка [26, 49]. В норме эти цистеиновые остатки участвуют в образовании внутримолекулярных дисульфидных связей, отвечающих за четвертичную структуру RET-рецептора. Замена одного из пяти crucialных цистеинов на другую аминокислоту приводит к тому, что свободный (неспаренный внутри молекулы) цистеин образует дисульфидную связь с соседней мутантной молекулой RET-белка, индуцируя тем самым лиганднезависимую гомодимеризацию RET TK, которая в свою очередь ведет к перманентной активации этого фермента, а в конечном итоге — к повышенному автофосфорилированию [49].

MEN 2B-мутация в кодоне 918 (тирозинкиназный домен) также приводит к лиганднезависимой конститутивной активации RET TK, но без димеризации последней [26]. Кроме того, мутация Met 918 Thr изменяет субстратную специфичность фермента [33, 44, 49], что приводит к автофосфорилированию тирозиновых остатков RET TK по новым сайтам [33], а также к фосфорилированию некоторых новых клеточных белков [3].

MEN 2-мутантные RET-онкогены способны трансформировать фибробласты [48, 49]. При этом RET-онкогены с различными MEN 2-мутациями проявляют различную трансформирующую активность [44].

more than 95% of MEN 2A and in 70–80% of FMTC families [32, 37, 51]. TGC → CGC mutations in codon 634 are most common in MEN 2A [9, 16]. Missense mutations in codons 768 and 804 in TK domain were found in 5 to 10 patients with FMTC [4, 15]. Besides, the RET TK plasmatic domain may have the following very rare MEN 2A and FMTC mutations: V804M in exon 14 [9, 19], L790F and Y791F in exon 13 [23], S891A in exon 15 [1, 22] and some others.

It is presently well established that MEN 2A and FMTC mutations of RET protooncogene affecting one of the five cysteines in the cysteine-enriched site of the RET TK extracellular domain lead to TK constitutive activation as a result of generation of covalently linked homodimers of RET protein [26, 49]. Normally these cysteine residues are involved in generation of intramolecular disulfide links responsible for RET receptor tertiary structure. The replacement of one of the five crucial cysteines for another amino acid results in formation of a disulfide link with a RET protein neighbor mutant molecule by free (not linked intramolecularly) cysteine and induction of ligand-independent homodimerization of RET TK which further leads to permanent activation of this enzyme and eventually to its increased autophosphorylation [49].

The MEN 2B mutation in codon 918 (TK domain) also leads to RET TK ligand-independent constitutive activation but without TK dimerization [26]. Besides, the mutation Met918Thr alters the enzyme substrate specificity [33, 44, 49] which leads to autophosphorylation of RET TK tyrosine residues in new sites [33] as well as to phosphorylation of new cellular proteins [3].

The MEN 2B mutant RET oncogenes can transform fibroblasts [48, 49], the transfection activity depending upon the mutation type [44]. The MEN 2B transfection activity increases considerably in the presence of ligand GDNF [6].

So, the MEN 2 syndrome-associated mutations transform the normal RET protooncogene into a dominant transforming oncogene whose products demonstrate constitutive TK activity and increased ability to phosphorylation. The MEN 2B mutations also change RET TK substrate specificity. Mechanism of malignant RET transformation of C-cells in vivo is unknown.

It should be mentioned that heterozygotic point mutations in RET protooncogene are also found in patients with hereditary Hirschsprung disease [13, 46]. Unlike the MEN 2 mutations they are evenly distributed in the gene, i.e. among 21 exons. Secondly, these mutations (unlike the activating MEN 2 mutations inducing neoplasia) inactivate RET protein partially or completely thus inducing intestinal paresis. New findings of MEN 2A syndrome association with Hirschsprung disease were reported recently [10]. The RET protooncogene activation in papillary thyroid carcinoma results from a variety of somatic chromosomal aberrations leading to generation of chimeric oncogenes encoding cytosol chimeric proteins [5]. Like MEN 2A and FMTC the papillary thyroid carcinoma is associated with permanent dimerization of RET oncoproteins which results in RET TK constitutive activation.

Basing on the available data on MEN 2-associated RET mutations we may establish mutation pattern-phenotype correlations in individual cases. For example, the world largest sample of 477 families with MEN 2 collected by the

Эффективность MEN 2В-трансфекции существенно увеличивается в присутствии лиганда GDNF [6].

Итак, мутации, ассоциированные с MEN 2-синдромами, превращают нормальный протоонкоген RET в доминантный трансформирующий онкоген, продукты которого обладают конститутивной тирозинкиназной активностью и повышенной способностью к фосфорилированию. А в случае с мутацией MEN 2В RET ТК проявляют измененную субстратную специфичность. Механизм злокачественной RET-трансформации С-клеток *in vivo* в настоящее время неизвестен.

Следует отметить, что гетерозиготные точечные мутации в протоонкогене RET обнаружены также у пациентов с наследственной болезнью Гиршпрунга [13, 46]. Их отличие от MEN 2-мутаций заключается в том, что, во-первых, они распределены равномерно по всему гену, то есть охватывают 21 экзон. А во-вторых, эти мутации (в отличие от активирующих MEN 2-мутаций, приводящих к неоплазии) частично или полностью инактивируют RET-белок, что приводит к парезу кишечника. Недавно были получены интересные данные относительно ассоциации MEN 2А-синдрома и болезни Гиршпрунга [10]. Активация протоонкогена RET при папиллярном раке щитовидной железы осуществляется в результате различных соматических хромосомных перестроек с образованием химерных онкогенов, кодирующих цитозольные химерные белки [5]. Как и в случае с MEN 2А и FMTC при папиллярном раке щитовидной железы имеет место перманентная димеризация RET-онкобелков, приводящая к конститутивной активации RET ТК.

Накопленный к настоящему времени материал по MEN 2-ассоциированным RET-мутациям позволяет установить корреляцию между теми или иными мутациями, обнаруживаемыми у больных, и их фенотипом. Так, при исследовании самой большой выборки семей с MEN 2, собранной Международным консорциумом по RET-мутациям (477 семей), была установлена существенная корреляция между присутствием одной из мутаций в кодоне 634 и наличием феохромоцитомы и гиперплазии паращитовидной железы в данной семье [16]. Особенно строгая корреляция имеет место в случае мутации, вызывающей замену цистеина на аргинин в кодоне 634 (наиболее частая при MEN 2А мутация) и гиперплазией паращитовидной железы [56]. Интересно, что в семьях с FMTC эта мутация на сегодняшний день не обнаружена. Согласно данным Международного консорциума, мутации в кодонах 768 и 804 гена RET ассоциированы только с FMTC. А мутация в кодоне 918 обнаруживается только у индивидов с MEN 2В [9, 16].

У больных со спорадическими формами МТС обнаружены соматические RET-мутации, частично перекрывающиеся с мутациями, характерными для MEN 2. Наиболее частая из них — Met918 Thr во внутриклеточном тирозинкинашном домене RET-белка. Ее частота, согласно данным разных авторов, исследовавших различные выборки, варьирует от 23 до 70% [14]. С гораздо более низкой частотой были идентифицированы соматические мутации в том же тирозинкинашном домене RET белка в кодонах 883 (экзон 15) и 768 (экзон 13) [38]. Последняя мутация была также обнаружена в нескольких семьях с FMTC [4, 15]. У небольшого числа больных со спорадическим МТС были выявлены мутации

International Consortium on RET mutations demonstrated a considerable correlation between codon 634 mutation and pheochromocytoma and parathyroid hyperplasia [16]. The most marked correlation was discovered between arginine substitution for cysteine in codon 634 (the most common MEN 2А mutation) and parathyroid hyperplasia [56]. Interestingly, that no such mutation was found in FMTC families. According to the International Consortium mutations in RET codons 768 and 804 are associated with FMTC only, while mutation in codon 918 was found in individuals with MEN 2В only [9, 16].

Patients with sporadic MTC have somatic RET mutations partially overlapping those characteristic of MEN with the Met918Thr in TK intracellular domain being encountered most frequently (23% to 70% by different authors) [14]. Somatic mutations in codons 883 (exon 15) and 768 (exon 13) of the same RET TK domain are much less common [38], the latter being also discovered in some FMTC families [4, 15]. Few patients with sporadic MTC presented with RET extracellular domain mutations such as deletions of 6, 24 and 27 base pairs (b.p.) and insertion of 6 b.p. affecting codons 630 and 634 [11, 28, 29]. Deletion of 9 b.p. resulting in loss of three RET codons (633–635) was found in 14 of 15 Swedish families with aggressive sporadic MTC [2].

As mentioned above, the hereditary Met918Thr mutation is clearly associated with the initiating events in MTC development. Although C. Eng et al. [17] think that this correlation is not an obligatory characteristic of sporadic MTC since it is found as a late event in some tumor cells and in only few of the large number of metastases [17]. There are reports of several cases with MEN 2А and FMTC who have hereditary mutation in codon 634 (Cys634Arg) and present with somatic mutation in codon 918 [35]. A codon 919 mutation was discovered in a FMTC patient having hereditary mutation in codon 768 [36]. The appearance of somatic mutation (telomutation) in addition to the existing hereditary mutation (premutation) in the same gene may contribute to initiation of oncogenesis [6].

Application of therapeutic approaches to cases with RET mutations is just beginning. However, there is already some experience in this field. In economically developed countries all individuals at high risk of MEN 2 undergo screening for mutations in exons 10, 11, 13, 14, 15, and 16 of RET protooncogene. The screening consists of blood tests. The test findings may be used to make a more accurate diagnosis and to detect asymptomatic individuals from MEN 2 families at early age. The American Society of Clinical Oncology (ASCO) recommends that the genetic testing should be a routine procedure for MEN 2 patients. The identified asymptomatic individuals with RET mutations should undergo regular screening for MTC, pheochromocytoma and parathyroid hyperplasia as well as be recommended to undergo prophylactic removal of the thyroid [60]. Many foreign authors suggest that this surgery should be performed in children with RET mutations under 5 years of age in families with MEN 2А [10, 56, 60] and still earlier in MEN 2В families because it is in this age that MTC patients may develop metastases. Canadian and French surgeons recommend this operation for MEN 2А and MEN 2В patients even if they

в экстраклеточном RET-домене: делеции 6, 24 и 27 пар оснований (п. о.), а также инсерция 6 п. о., затрагивающие кодоны 630 и 634 [11, 28, 29]. Делеция 9 п. о., приводящая к утрате трех RET кодонов (633–635), выявлена у 14 из 15 обследованных неродственных шведских больных с агрессивной формой спорадического МТС [2].

Как уже отмечалось выше, наследственная Met918Thr-мутация четко ассоциирована с инициирующими событиями в канцерогенезе МТС. Однако, как полагают С. Eng и соавт. [17], это совсем необязательно в случае спорадического МТС, при котором эту мутацию можно обнаружить как позднее событие, поскольку она присутствует только в некоторых группах опухолевых клеток, полученных с помощью микродиссекции, и только в некоторых из множества метастазов [17]. Описано несколько случаев, когда соматическая мутация в кодоне 918 присутствует у MEN 2A и FMTC пациентов, несущих наследственную мутацию в кодоне 634 (Gys634Arg) [35]. Соматическая мутация в кодоне 919 была обнаружена у пациента с FMTC, несущего наследственную мутацию в кодоне 768 [36]. Возникновение соматической мутации (тело-мутации) в дополнение к уже предсуществующей наследственной мутации (премутации) в одном и том же гене может внести свой вклад в инициацию онкогенеза [6].

В мировой практике терапевтические подходы для носителей RET-мутаций только начинают проявляться. Тем не менее какой-то опыт уже существует. За рубежом всех индивидов из группы риска по MEN 2 обследуют на наличие мутаций в экзонах 10–16 протоонкогена RET. Материалом для исследования являются образцы крови. Результаты этого анализа можно использовать для уточнения клинического диагноза, а также для выявления бессимптомных членов MEN 2 семей с этим синдромом уже в раннем возрасте. Согласно рекомендациям Американского общества клинической онкологии (ASCO), генетическое тестирование предлагается в качестве стандартной помощи пациентам с MEN 2. Идентифицированных бессимптомных носителей RET-мутаций необходимо регулярно проверять на МТС, феохромоцитому и гиперплазию паращитовидных желез, а также предлагать профилактическое удаление щитовидной железы [60]. Большинство зарубежных специалистов рекомендуют проводить эту операцию для носителей RET-мутаций до 5-летнего возраста в семьях с MEN 2A [10, 56, 60] и еще раньше — в семьях с MEN 2B, поскольку при МТС у детей именно в этом возрасте могут возникать метастазы. Канадские и французские хирурги рекомендуют эту операцию для MEN 2A и MEN 2B больных даже при нормальном уровне кальцитонина (базальном и пентагастринстимулированном) [31, 39]. В случае с FMTC, менее агрессивной формой MEN 2-синдрома, вопрос об операции следует решать индивидуально. Японские ученые предлагают при выборе времени операции учитывать характер MEN 2-мутации [56]. В небольшом количестве семей с MEN 2, в которых не удается идентифицировать мутации в протоонкогене RET, главную роль при скрининге наследственной болезни играет биохимическая диагностика с использованием кальцитонинового теста, который, к сожалению, не всегда корректен. Это обусловлено тем,

have normal calcitonin (basal and pentagastrin-stimulated) tests [31, 39]. In cases with FMTC, i.e. a less aggressive MTC type, the need and reasonability of surgery should be considered individually in each case. Japanese investigators suggest that type of MEN 2 mutations should be taken into account when deciding upon age of surgical intervention [56].

Biochemical diagnosis involving calcitonin test plays the principal role in the screening of a small number of MEN 2 families with unidentifiable RET mutations. Unfortunately the test is not fully reliable because basal and pentagastrin-stimulated levels of calcitonin are not well defined in children. Besides, there are reports of false-positive and false-negative biochemical tests [32, 60]. The calcitonin testing is associated with stress and adverse events. Early molecular diagnosis of MEN 2 is a high-sensitivity method that detects children at increased risk before they develop clinical disease. It should be noted that there were no reports of MTC development in RET mutation-negative individuals from MEN 2 families with known RET mutations.

A cooperative study of the Molecular Genetics Laboratory, Medical Genetics Research Center RAMS and the Clinical Oncogenetics Laboratory, BMCRC, RAMS discovered the commonest heterozygotic mutation TGC → CGC in codon 634, exon 11 of RET in a Russian MEN 2 A family. This mutation leads to arginine substitution for cysteine amino acid residue in the protein extracellular domain. The mutation was discovered by restriction analysis and verified by sequencing. This finding was used to confirm clinical diagnosis in three members of the family and to undertake relevant measures.

Let us consider the family tree. **The proband** (III-2) aged 20 years applied for medical advice. The patient had a mutation in codon 634, exon 11, of protooncogene RET in heterozygotic state which was evidence of MEN 2A. Scan of the thyroid discovered bilobal enlargement of the gland. The patient also presented with thyroid dysfunction. Small right lobe lesions were also suspected. Ultrasound discovered no adrenal lesions and a follicle with large calcinates up to 0.5 cm in diameter in the right lobe of the thyroid. The patient was recommended to undergo thyroidectomy.

The proband's mother (II-3), aged 38 years, had underwent 5 operations for pheochromocytoma, at the age of 36 she underwent surgery for a C-cell thyroid tumor which was defined as medullary thyroid carcinoma.

The proband's aunt (II-2) died from sepsis. By autopsy she had a bilateral pheochromocytoma and thyroid enlargement.

The proband's grandmother (I-2) suffered from hypertension crises and died at the age of 29 years. Autopsy discovered enlargement of both adrenals. These findings suggest that the patient had MEN 2A.

The proband's cousin (III-1), 9 years of age. Examination at the Endocrinology Research Center in 1998 discovered focal lesions in the thyroid right lobe and increased calcitonin tests suggestive of MEN 2A. The diagnosis was confirmed by molecular genetic study performed by Dr Hopner, University of Hamburg, who discovered heterozygotic mutation TGC → CGC in codon 634 of RET. The girl's aunt (II-3), i.e. the proband's (III-2) mother, had a similar mutation. The girl

что базальный уровень кальцитонина и его уровень после стимулирования пентагастрином не достаточно хорошо определены у детей. Кроме того, из литературы известны ложноположительные и ложноотрицательные результаты биохимического тестирования [32, 60]. Проведение кальцитонинового теста сопряжено со стрессами и неприятными побочными эффектами у пациентов. Ранняя молекулярная диагностика MEN 2 является высокочувствительной. Она позволяет выявить детей из группы риска до появления у них клинических или биохимических признаков развития МТС. Следует отметить тот факт, что до сих пор не было ни одного сообщения о развитии МТС у не несущих RET-мутации индивидов из MEN 2-семей с известными RET-мутациями.

В результате совместной работы лаборатории молекулярной генетики Медико-генетического научного центра РАМН и лаборатории клинической онкогенетики РОНЦ РАМН в одной из российских семей с MEN 2A была выявлена известная и наиболее распространенная мутация TGC → CGC в кодоне 634, экзон 11 гена RET, в гетерозиготном состоянии. Эта мутация приводит к замещению цистеинового аминокислотного остатка в цистеинобогатом экстраклеточном домене белка на аргинин. Мутация была обнаружена в ходе рестрикционного анализа и подтверждена при секвенировании. Полученные результаты были использованы для подтверждения клинического диагноза у трех членов обследованной семьи и как указание на организацию эффективной помощи, необходимой при MEN 2A.

В качестве иллюстрации приводим схему родословной семьи.

Пробанд (III-2), 20 лет, обратился в медико-генетическую консультацию по поводу прогноза личного здоровья. По данным обследования у больного обнаружена мутация в кодоне 634, экзон 11 протоонкогена RET в гетерозиготном состоянии, подтверждающая диагноз MEN 2A. При скенировании получено изображение щитовидной железы, увеличенное за счет обеих долей. Кроме того, отмечалась функциональная недостаточность тиреоидной ткани, не исключено наличие мелкоочаговых поражений в правой доле. По данным УЗТ область надпочечников без особенностей, в правой доле щитовидной железы обнаружен фолликул с крупными кальцинатами до 0,5 см в диаметре. На момент обследования больному рекомендована операция тиреоидэктомия.

Мать пробанда (II-3), 38 лет, 5 раз оперирована в Эндокринологическом научном центре РАМН по поводу феохромоцитомы. В 36-летнем возрасте она была прооперирована там же по поводу С-клеточного новообразования щитовидной железы, которое явилось медуллярной карциномой щитовидной железы.

Тетя пробанда (II-2) по материнской линии, умерла от септического состояния. На вскрытии выявлены двусторонняя феохромоцитома, увеличение щитовидной железы.

Бабушка пробанда (I-2) по материнской линии страдала гипертоническими кризами, умерла в 29-летнем возрасте. При вскрытии отмечено увеличение обоих надпочечников. Все эти данные позволяют предположить, что умершая страдала MEN 2A.

was referred to the Institute of Pediatric Oncology, RCR RAMS, to undergo prophylactic thyroidectomy. Histological study of the surgical specimen found medium-size to large follicles with follicular epithelial hyperplasia, fibrosis and sclerosis of the partitions, node formation imitating areas. There were no signs of C-cell hyperplasia. These findings were evidence of preclinical MEN 2A syndrome.

In conclusion, the molecular genetic testing will play an important role in early (preclinical) diagnosis and prevention of cancer in near future. Therefore a register of pathological gene bearers at high (up to 100%) risk of cancer should be made up to carry out their clinical genetic monitoring and to settle legal, ethical and moral problems associated with preclinical diagnosis of hereditary proneness to cancer.

This study was in part supported by grant 05.01.05, project 05 «Genetic Diagnosis and Genetic Therapy of Socially Important Human Diseases».

Двоюродная сестра пробанда (III-1), 9 лет, в 1998 г. была обследована в Эндокринологическом научном центре РАМН, где ей был установлен диагноз MEN 2A на основании фокальных изменений правой доли щитовидной железы и повышенного уровня кальцитонина на стимулированной пробе. Этот диагноз был подтвержден и в ходе молекулярно-генетических исследований, проведенных в Гамбургском университете д-ром Хопнером, который выявил гетерозиготную мутацию TGC → CGC в кодоне 634 гена RET. Аналогичная мутация была выявлена у ее тети (II-3), которая приходится родной матерью обследованному нами пробанду (III-2). Девочка была направлена в НИИ детской онкологии РОНЦ РАМН, где ей произведена профилактическая тиреоидэктомия. Гистологическое заключение: щитовидная железа состоит из средней и крупной величины фолликулов с явлениями очаговой гиперплазии фолликулярного эпителия и явлениями склероза и фиброза перегородок. На отдельных участках с имитацией узлообразования признаков С-клеточной гиперплазии не обнаружено. Анализ всех полученных данных больной свидетельствует о наличии синдрома MEN 2A (доклиническая стадия).

Таким образом, генетическое тестирование на молекулярном уровне в недалеком будущем будет иметь огромное значение для ранней (доклинической) диагностики и профилактики злокачественных новообразований в России. В связи с этим представляется совершенно необходимым создание канцеррегистра лиц — носителей патологических генов, дающих высокий (иногда 100%) риск онкологических заболеваний, с последующей организацией и координацией клинко-генетического мониторинга за состоянием их здоровья и решением юридических, этических и моральных проблем, связанных с целесообразностью доклинической диагностики наследственной предрасположенности к развитию злокачественных новообразований.

Работа выполнена частично за счет гранта № 05.01.05 проекта 05 «Генодиагностика и генотерапия социально значимых заболеваний человека».

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Калинин В. Н., Амосенко Ф. А., Пушкаш К. и др. //Генетика. — 1998. — Т. 34. — С. 1157—1159.
2. Alemi M., D Lucas S., Sallstrom J. F. et al. //Oncogene. — 1997. — Vol. 14. — P. 2041—2045.
3. Bocciardi R., Mograbi B., Pasini B. et al. //Ibid. — Vol. 15. — P. 2257—2265.
4. Bolino A., Schuffenecker I., Luo Y. et al. //Ibid. — 1995. — Vol. 10. — P. 2415—2419.
5. Bongarzone I., Butti M. G., Coronelli S. et al. //Cancer Res. — 1994. — Vol. 54. — P. 2979—2985.
6. Bongarzone I., Viganò E., Alberti L. et al. //Oncogene. — 1998. — Vol. 16. — P. 2295—2301.
7. Buj-Bello A., Adu J., Pinon L. G. P. et al. //Nature. — 1997. — Vol. 387. — P. 721—724.
8. Carlson K. M., Dou S., Chi D. et al. //Proc. natl. Acad. Sci. USA. — 1994. — Vol. 91. — P. 1579—1583.
9. Decker R. A., Peacock M. L. //Cancer. — 1997. — Vol. 80. — P. 557—568.
10. Decker R. A., Peacock M. L. //J. Pediatr. Surg. — 1998. — Vol. 33. — P. 207—214.
11. Donis-Keller H. //J. intern. Med. — 1995. — Vol. 238. — P. 319—325.
12. Durbec P., Marcos-Gutierrez C., Kilkenny C. et al. //Nature. — 1996. — Vol. 381. — P. 789—793.
13. Edery R., Lyonnet S., Mulligan L. M. et al. //Ibid. — 1994. — Vol. 367. — P. 378—380.
14. Eng C., Smith D. P., Mulligan L. M. et al. //Hum. mol. Genet. — 1994. — Vol. 3. — P. 237—241.
15. Eng C., Smith D. P., Mulligan L. M. et al. //Oncogene. — 1995. — Vol. 10. — P. 509—513.
16. Eng C., Clayton D., Schuffenecker I. et al. //J.A.M.A. — 1996. — Vol. 276. — P. 1575—1579.
17. Eng C., Mulligan L. M., Healey C. S. et al. //Cancer Res. — 1996. — Vol. 56. — P. 2167—2170.
18. Farndon J. R., Leight G. S., Dilley W. G. et al. //Br. J. Surg. — 1986. — Vol. 73. — P. 278—281.
19. Fink M., Weinhausel A., Niederle B. et al. //Int. J. Cancer. — 1996. — Vol. 69. — P. 312—316.
20. Gorlin R. J., Sedano H. O., Vickers R. A. et al. //Cancer. — 1968. — Vol. 22. — P. 293—299.
21. Hofstra R. M. W., Landsvater R. M., Ceccherini I. et al. //Nature. — 1994. — Vol. 367. — P. 375—376.
22. Hofstra R. M., Fattoruso O., Quadro L. et al. //J. clin. Endocrinol. Metab. — 1997. — Vol. 82. — P. 4176—4178.
23. Hoppner W., Haase R., Ritter M. et al. //Intern. Workshop MEN and VHL, 6—th: Abstracts 242. — Noordwijkerhout, 1997. — P. 111.
24. Ikeda I., Ishizaka Y., Tahira T. et al. //Oncogene. — 1990. — Vol. 5. — P. 1291—1296.
25. Iwamoto T., Taniguchi N., Asai N. et al. //Ibid. — 1993. — Vol. 8. — P. 1087—1091.
26. Iwashita T., Asai N., Murakami H. et al. //Ibid. — 1996. — Vol. 12. — P. 481—487.
27. Jing S. Q., Wen D. Z., Yu Y. B. et al. //Scientist. — 1998. — Vol. 12. — P. 11.
28. Kalinin V. N., Frilling A. //J. molec. Med. — 1998. — Vol. 76. — P. 365—367.
29. Kimura T., Yoshimoto K., Yokogoshi Y. et al. //Endocr. J. — 1995. — Vol. 42. — P. 517—525.
30. Klein R. D., Sherman D., Ho W.—H. et al. //Nature. — 1997. — Vol. 387. — P. 717—721.
31. Lallier M., St-Vil D., Giroux M. et al. //J. Pediatr. Surg. — 1998. — Vol. 33. — P. 846—848.
32. Lips C. J. M., Landsvater R. M., Hoppener J. W. M. et al. //New. Engl. J. Med. — 1994. — Vol. 331. — P. 828—835.
33. Liu X., Vega Q. C., Decker R. A. et al. //J. biol. Chem. — 1996. — Vol. 271. — P. 5309—5312.
34. Lorenzo M. J., Eng C., Mulligan L. M. et al. //Oncogene. — 1995. — Vol. 10. — P. 1377—1383.
35. Marsh D. J., Andrew S. D., Eng C. et al. //Cancer Res. — 1996. — Vol. 56. — P. 1241—1243.
36. Miyauchi A., Egawa S., Futami H. //Jap. J. Cancer Res. — 1997. — Vol. 88. — P. 527—631.
37. Mulligan L. M., Kwok J. B., Healey C. S. et al. //Nature. — 1993. — Vol. 363. — P. 458—460.
38. Mulligan L. M., Ponder B. A. J. //J. clin. Endocrinol. Metab. — 1995. — Vol. 80. — P. 1989—1995.
39. Murat A., Modigliani E., Conte-Devolx B. et al. //Ann. Chir. — 1998. — Vol. 52. — P. 455—460.
40. Myers S. M., Eng C., Ponder B. A. J. et al. //Oncogene. — 1995. — Vol. 5. — P. 97—102.
41. Myers S. M., Eng C., Ponder B. A. J. et al. //Ibid. — Vol. 11. — P. 2039—2045.
42. Nozaki C., Asai N., Murakami H. et al. //Ibid. — 1998. — Vol. 16. — P. 293—299.
43. Pachnis V., Mankoo B., Costantini F. //Development. — 1993. — Vol. 119. — P. 1005—1017.
44. Pasini A., Geneste O., Legrand P. et al. //Oncogene. — 1997. — Vol. 15. — P. 393—402.
45. Pasini B., Hofstra R. M. W., Yin L. et al. //Oncogene. — 1995. — Vol. 11. — P. 1737—1743.
46. Romeo G., Ronchetto R., Luo Y. et al. //Nature. — 1994. — Vol. 367. — P. 377—378.
47. Rossel M., Schuffenecker I., Schlumberger M. et al. //Hum. Genet. — 1995. — Vol. 95. — P. 403—406.
48. Rossel M., Pasini A., Chappuis S. et al. //Oncogene. — 1997. — Vol. 14. — P. 265—275.
49. Santoro M., Carlomagno F., Romano A. et al. //Science. — 1995. — Vol. 267. — P. 381—383.
50. Schimke R. //Ann. Rev. Med. — 1984. — Vol. 35. — P. 25—31.
51. Schuchardt A., D'Agati V., Larsson-Blomberg L. et al. //Nature. — 1994. — Vol. 367. — P. 380—383.
52. Schuffenecker I., Billaud M., Calender A. et al. //Hum. Mol. Genet. — 1994. — Vol. 3. — P. 1939—1943.
53. Tahira T., Ishizaka Y., Itoh F. et al. //Oncogene. — 1990. — Vol. 5. — P. 97—102.
54. Takahashi M., Buma Y., Iwamoto T. et al. //Ibid. — 1988. — Vol. 3. — P. 571—578.
55. Takahashi M., Buma Y., Hiai H. //Ibid. — 1989. — Vol. 4. — P. 805—806.
56. Takami H. //Arch. Surg. — 1998. — Vol. 133. — P. 679.
57. Treanor J. J. S., Goodman L., de Sauvage F. et al. //Nature. — 1996. — Vol. 382. — P. 80—83.
58. Trupp M., Arenas E., Fainzilber M. et al. //Ibid. — 1996. — Vol. 381. — P. 785—789.
59. Tsuzuki T., Takahashi M., Asai N. et al. //Oncogene. — 1995. — Vol. 10. — P. 191—198.
60. Wells S. A. Jr, Chi D. D., Tushima K. et al. //Ann. Surg. — 1994. — Vol. 220. — P. 237—250.

Поступила 01.07.99 / Submitted 01.07.99