

УЗЛОВОЙ МОМЕНТ

Авторы:

Полина Андреевна Федорова, сотрудник Научно-методического центра Минздрава России по молекулярной медицине ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Минздрава России

Владимир Дмитриевич Назаров, к.м.н., научный сотрудник Научно-методического центра Минздрава России по молекулярной медицине ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Минздрава России

Сергей Владимирович Лапин, к.м.н., заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний Научно-методического центра Минздрава России по молекулярной медицине ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Минздрава России

Дарья Владимировна Сидоренко, врач лабораторный генетик, Научно-методический центр Минздрава России по молекулярной медицине ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Минздрава России

Анастасия Константиновна Мусонова, сотрудник Научно-методического центра Минздрава России по молекулярной медицине ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Минздрава России

Роман Владимирович Аянка, сотрудник Научно-методического центра Минздрава России по молекулярной медицине ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Минздрава России

Любовь Ивановна Станкевич, к.м.н., директор по лабораторной медицине АО «ЛабКвест», доцент кафедры клинической лабораторной диагностики и патологической анатомии Академии постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России»

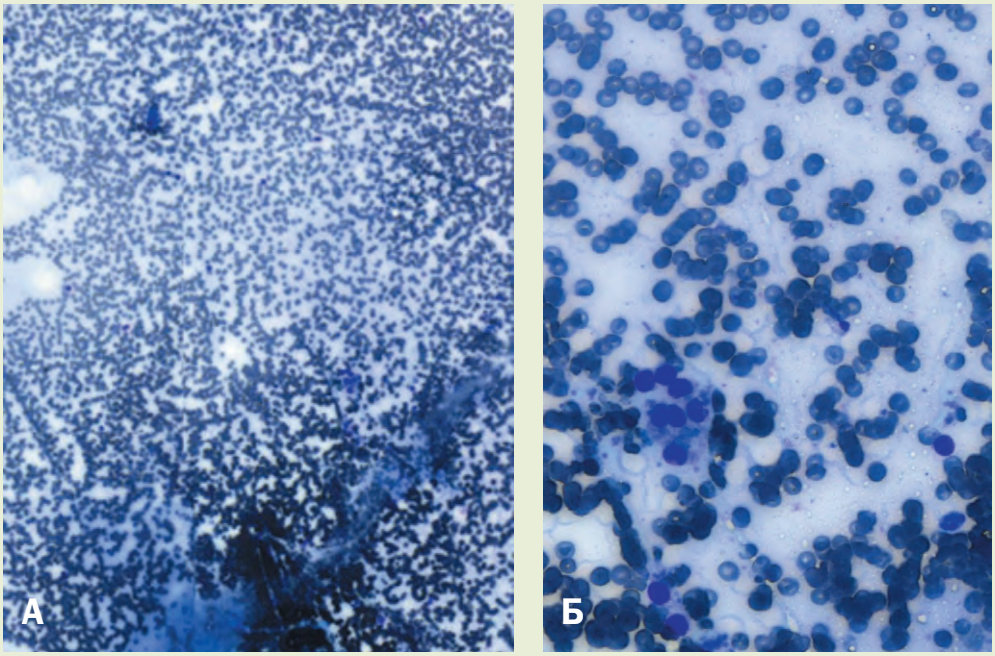
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛА ТОНКОИГОЛЬНЫХ БИОПСИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Рак щитовидной железы (РЩЖ) занимает первое место по распространенности среди злокачественных новообразований эндокринных органов. Среди общей онкологической заболеваемости он составляет около 1–1,5%. Клинически РЩЖ проявляется как узловая патология щитовидной железы (ЩЖ). В популяции узлы ЩЖ обнаруживаются пальпаторно у 4–7% населения, а при ультразвуковом скрининге – в 50% случаев. Заболеваемость РЩЖ увеличивается во всех экономически развитых странах с ежегодным приростом от 3 до 10%. Исследования показывают, что у людей, подвергшихся лучевому воздействию на ЩЖ, риск развития злокачественных опухолей значительно возрастает. Наиболее распространенный гистологический тип РЩЖ – папиллярный (ПРЩЖ) – 80–85% случаев, фолликулярный (ФРЩЖ) и медуллярный (МРЩЖ) типы составляют до 20 и 10% случаев соответственно. Низкодифференцированный РЩЖ (НРЩЖ) диагностируется в 0,5–3% случаев, а анапластический (АРЩЖ) – в 0,1–1% случаев [1–3].

Для диагностики образования ЩЖ ключевым моментом является дифференциальный диагноз между злокачественным и доброкачественным процессом. Для оценки морфологической картины новообразования ЩЖ необходимо выполнение биопсии. «Золотым стандартом» диагностики РЩЖ в настоящее время является тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) и цитологическое исследование полученного материала. Существует несколько диагностических категорий согласно классификации Bethesda:

- **Bethesda I** – неинформативная пункция;
- **Bethesda II** – доброкачественное образование (коллоидные и аденоматозные узлы, хронический аутоиммунный тиреоидит, подострый тиреоидит);
- **Bethesda III** – атипия неопределенного значения (сложная для интерпретации пункция с подозрением на опухолевое поражение);

Рис. 1. Клинический случай 1. Цитологический препарат из архива отделения патоморфологии лаборатории ЛабКвест (А – ×100; Б – ×400)



Пациентка: пол жен., 57 лет. *Материал:* ТАБ щитовидной железы. *Заключение:* единичные группы клеток фолликулярного эпителия без атипии. *Фон:* умеренный коллоид, элементы крови. Цитологическая картина более всего соответствует коллоидному зобу. Bethesda System II.

- **Bethesda IV** – фолликулярная неоплазия или подозрение на фолликулярную неоплазию;
- **Bethesda V** – подозрение на злокачественную опухоль (подозрение на папиллярный рак, медуллярный рак, метастатическую карциному, лимфому);
- **Bethesda VI** – злокачественная опухоль (папиллярный, низкодифференцированный, медуллярный, анапластический рак).

Пример цитологической картины, классифицированной как Bethesda II, представлен на рис. 1.

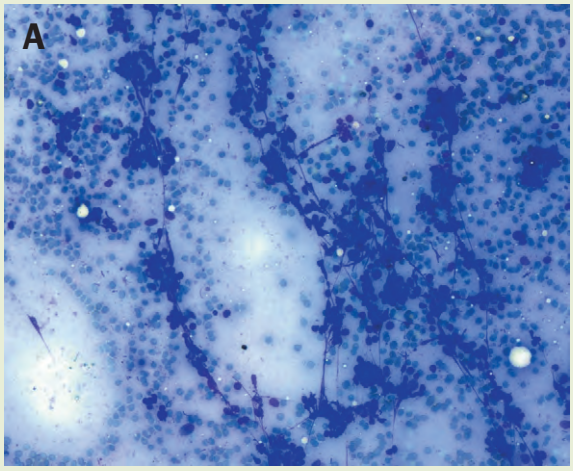
Однако настоящий метод обладает рядом недостатков. Один из них – вероятность выявления цитологии неопределенного значения, когда не представляется возможным однозначно подтвердить или опровергнуть диагноз злокачественного процесса из-за отсутствия характерных признаков. Согласно классификации Bethesda вышеописанные образцы относятся к III–V категории. Пример цитологической картины, классифицированной как Bethesda III, представлен на рис. 2. Пациентам с цитологической картиной Bethesda III–V показана повторная процедура ТАБ или диагностическая гемитиреоидэктомия, которая будет излишней для большинства пациентов с доброкачественными опухолями. Для остальных больных, новообразования которых имели цитологию неопределенной значимости, но оказались злокачественными согласно постоперационному гистологическому исследованию, необходимо повторное оперативное вмешательство в объеме тиреоидэктомии. Включение в алгоритм иных дополнительных инструментов диагностики, таких как молекулярно-генетическое тестирование образца ТАБ, сможет помочь избежать ненужных операций и повторных инвазивных вмешательств.

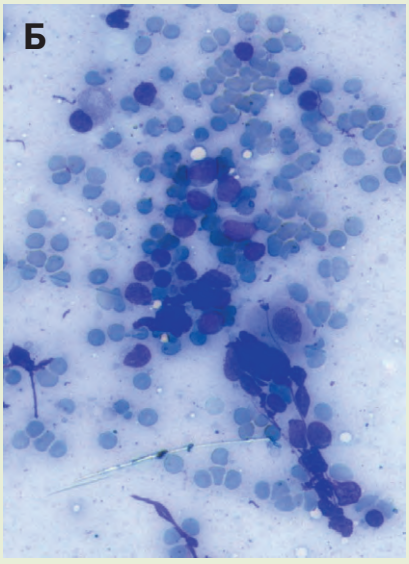
ОНКОГЕНЫ И ИХ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Большинство мутаций при РЩЖ возникает в генах, кодирующих белки MAPK-киназного и PI3K/AKT путей [3].

MAPK-протеинкиназы представляют собой три семейства белков-протеинкиназ: p38, JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase / stress-activated

Рис. 2. Клинический случай 2. Цитологический препарат из архива отделения патоморфологии лаборатории ЛабКвест (А – х200; Б – х400)





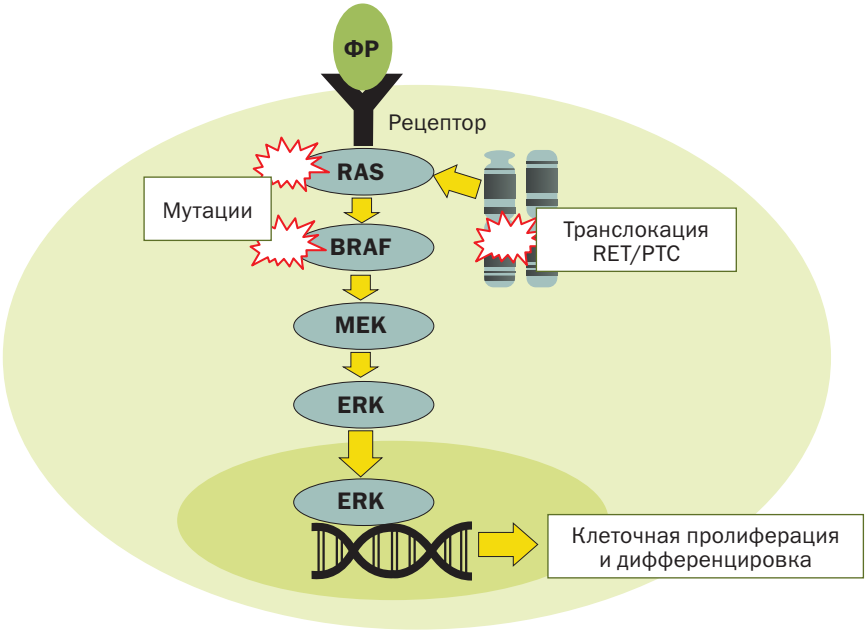
Пациентка: пол жен., 61 год. *Материал:* ТАБ щитовидной железы. *Заключение:* материал обильно разбавлен кровью, частично дегенеративно изменен. На фоне эритроцитов слабая лимфоидная инфильтрация, преимущественно зрелые формы, клетки пролиферирующего фолликулярного эпителия с нерезко выраженными признаками атипии. Цитологическую картину трудно дифференцировать между реактивными изменениями, связанными с хроническим тиреоидитом и неопластическим процессом. The Bethesda System III. Атипия неясного генеза или изменения клеток фолликулярного эпителия неясной этиологии.

protein kinase) и ERK (extracellular signal-regulated kinase) (рис. 3). Семейство ERK включает в себя протеинкиназы, отвечающие за пролиферацию и выживание клеток, в то время как протеинкиназы семейств p38 и JNK отвечают за индукцию апоптоза. Активация MAPK является одним из ключевых этапов развития РЩЖ. Регистрация рецепторами непрерывных сигналов клеточного роста и пролиферации является одним из эффектов активации MAPK-киназного пути посредством мутаций в гене BRAF. Гены семейства RAS также выполняют важную функцию в сигнальных путях, связанных с клеточным ростом и выживанием. Аберрации в генах RAS приводят к постоянной активации RAS-белков, что в свою очередь активирует MAPK-путь, и также участвуют в канцерогенезе РЩЖ.

Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR представляет собой внутриклеточный каскад, центральными компонентами которого являются ферменты фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназы AKT и mTOR (рис. 4). Это один из универсальных сигнальных путей, характерных для большинства клеток человека. Он отвечает за избежание апоптоза, рост, пролиферацию клеток, метаболизм. Сигнальный путь PI3K также играет важную роль в спорадическом канцерогенезе ЩЖ. Мутации с участием генов сигнального пути PI3K/AKT/mTOR встречаются в фолликулярных карциномах. Активация PI3K/AKT считается ключевой в инициации фолликулярной карциномы и может быть вызвана активирующей мутацией в генах семейства RAS (KRAS, HRAS, NRAS), PIK3CA и AKT1, а также инактивацией PTEN. В целом мутации, затрагивающие сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR, можно рассматривать как универсальный митогенный и антиапоптотический механизм, активация которого позволяет опухолевой клетке не только активно делиться, но и успешно противостоять и адаптироваться к воздействию повреждающих факторов.

Мутации в гене BRAF являются наиболее распространенными среди РЩЖ. BRAF представляет собой серин-треониновую киназу, которая транспортируется к клеточной мембране после связывания и активации RAS, что приводит к фосфорилированию и активации MAPK-киназы и вторичных посредников. Для изменений в гене BRAF характерны точечные мутации, малые делеции, инсерции, а также хромосомные перестройки. Наиболее распространенным вариантом аберраций является однонуклеотидная за-

Рис. 3. Сигнальный путь MAPK



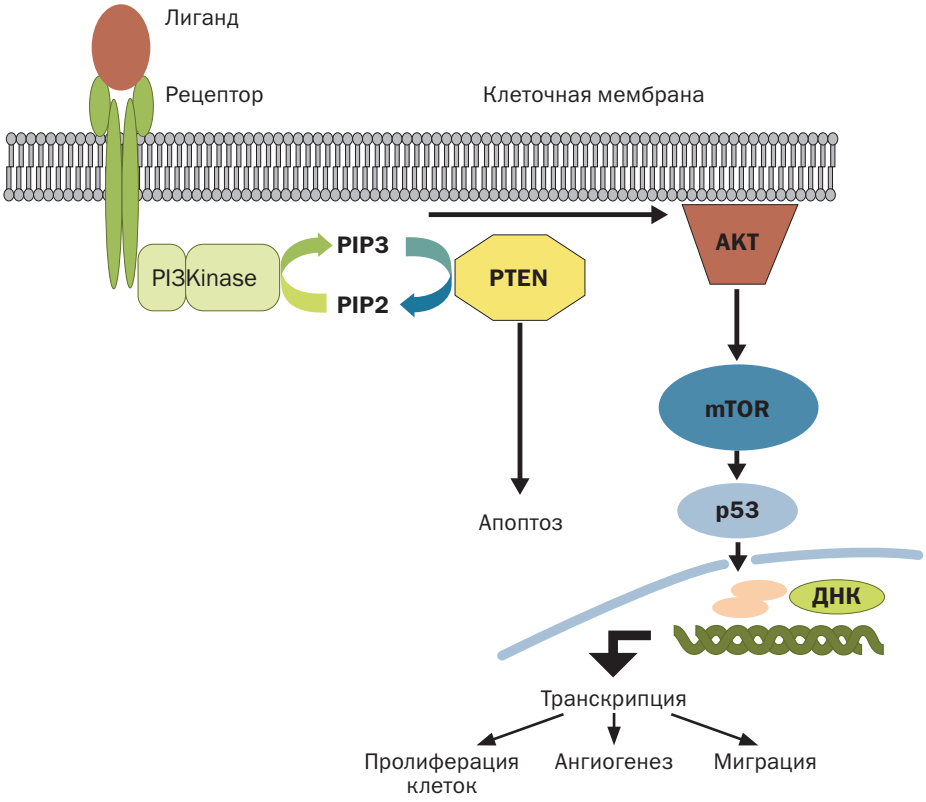
Примечание. ФР – фактор роста. В норме каскад активируется внешними сигналами, передающимися через рецептор внутрь клетки. В опухолевых клетках появляются мутации, приводящие к неконтролируемой активации сигнального пути и, как следствие, к «бесконечной» клеточной пролиферации и дифференцировке.

мена тимина на аденин в 1799-й позиции. Для конечного белка это изменение характеризуется заменой валина на глутамин в 600-й позиции (Val600Glu). При РЩЖ распространенность мутации V600E среди всех мутаций гена BRAF составляет 98–99% [4]. Также существуют иные, реже встречающиеся генетические изменения, такие как однонуклеотидная замена Lys601Glu, инсерции и делеции около кодона 600, а также перестройка AKAP9/BRAF. Последняя мутация представляет собой парацентрическую инверсию хромосомы 7q, что в результате приводит к слиянию части гена BRAF, кодирующей протеинкиназный домен, и части гена AKAP9. Все точечные мутации и перестройки являются причиной активации BRAF-киназы и, как следствие, постоянной стимуляции MAPK-пути.

Гены семейства RAS (HRAS, KRAS, NRAS) кодируют G-белки. Они закреплены на цитоплазматической стороне клеточной мембраны и являются посредниками в передаче сигнала от тирозинкиназных мембранных рецепторов к множеству эффекторных молекул. Таким образом происходит стимуляция каскада параллельных путей реакции фосфорилирования, которые в конечном итоге завершаются активацией ядерных факторов транскрипции. Однако для мутаций генов данного семейства характерен низкий уровень передачи сигналов по пути MAPK и, следовательно, высокий показатель дифференцировки опухолей ЩЖ, а также относительно гомогенный молекулярный профиль. Мутации генов RAS выявляются на всех стадиях онкогенеза ЩЖ, обнаруживаясь в 33% аденом, 53% дифференцированных фолликулярных карцином и 60% недифференцированных карцином [5].

Транслокация RET/PTC характерна в основном для ПРЩЖ. В результате транслокации ген RET сливается с рядом других генов PTC. Получающиеся химерные конструкции включают в себя часть гена RET, кодирующего тирозинкиназный домен рецептора RET, и активный промотор другого гена, который осуществляет экспрессию и лиганд-независимую димеризацию протеинового комплекса RET/PTC. Данная конструкция ведет к хронической стимуляции MAPK-сигнального пути и малигнизации клеток [6].

Рис. 4. Сигнальный путь PI3K



Примечание. PIP3 – фосфатидилинозитол-3-фосфат; PTEN (phosphatase and tensin) – гомолог фосфатазы и тензина; AKT – протеинкиназа B; mTOR (mammalian target of rapamycin) – цель рапамицина у млекопитающих, протеинкиназа серин-треониновой специфичности.

Теломеразная обратная транскриптаза (TERT) является каталитической субъединицей фермента теломеразы, необходимой для активности последней. Повышающая регуляция экспрессии TERT и, как следствие, активность теломеразы происходят при подавляющем большинстве злокачественных новообразований, включая РЩЖ, что приводит к клеточной пролиферации, предотвращению клеточного старения и гибели клеток. Активация транскрипции TERT может быть достигнута гетерозиготными точечными мутациями на промоторе гена TERT. Две наиболее распространенные активирующие мутации находятся выше сайта начала трансляции TERT в точках -124 и -146: -124G>A (C228T) и -146G>A (C250T) [7].

PPARγ представляет собой ядерный рецептор, участвующий в регуляции клеточного цикла и апоптоза. PAX8, в свою очередь, кодирует фактор транскрипции парного домена, специфичный для ЩЖ, который необходим для дифференцировки фолликулярных клеток и регуляции генов, специфичных для ЩЖ. Два гена могут объединяться посредством транслокации (2q:3p) (13:25) с образованием нового химерного гена, который экспрессирует белок PAX8/PPARγ.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ВЫЯВЛЕНИЯ ОНКОГЕНОВ

Молекулярно-генетическое исследование набирает популярность и клиническую значимость как в диагностике, так и в лечении РЩЖ. Данный инструмент позволяет оптимизировать диагностику РЩЖ и избежать пациентам ненужных инвазивных манипуляций. Многие метаанализы описывают различные корреляции между молекулярно-генетическими характеристиками и клинико-патоморфологическими признаками новообразований ЩЖ.

Таблица 1. Распространенность мутаций при различных типах рака щитовидной железы (РЩЖ)

Тип опухоли	TP53	TERT	RAS	BRAF V600E	PIK3CA
Низкодифференцированный РЩЖ	10–35%	20–50%	20–50%	5–15%	0–15%
Анапластический РЩЖ	40–80%	30–75%	10–50%	10–50%	5–25%
Фолликулярный РЩЖ	0%	10–35%	30–50%	0%	0–10%
Папиллярный РЩЖ	0%	5–15%	0–5%	40–80%	0–5%

Таблица 2. Спектр мутаций при опухолях щитовидной железы

Ген	Хромосома	Тип изменений	Заболевание
RET	Chr 10	RET/PTC-перестройка	ПРЩЖ
		Точечные мутации	Спорадический МРЩЖ
			Семейные формы МРЩЖ
BRAF	Chr 7	V600E-мутация (p.Val600Glu)	ПРЩЖ
		Точечные мутации	АРЩЖ
RAS	NRAS Chr 1	Точечные мутации	Фолликулярная аденома, ФРЩЖ, ПРЩЖ, фолликулярный вариант ПРЩЖ, НРЩЖ и АРЩЖ
	KRAS Chr 12		
	HRAS Chr 11		
TERT	Chr 5	Точечные мутации, в том числе в сочетании с мутациями BRAF и RAS	АРЩЖ и тяжелые формы семейного немедуллярного РЩЖ
TP53	Chr 17	Точечные мутации	АРЩЖ и НРЩЖ
MET	Chr 7	Точечные мутации	МРЩЖ
ALK	Chr 2	Генные перестройки	ПРЩЖ, АРЩЖ и НРЩЖ
CTNNB1	Chr 3	Точечные мутации	ПРЩЖ
JAK3	Chr 19	Точечные мутации	ФРЩЖ
TSHR	Chr 14	Точечные мутации	Фолликулярная аденома

Примечание. Chr – хромосома; АРЩЖ – анапластический рак щитовидной железы; МРЩЖ – медуллярный рак щитовидной железы; НРЩЖ – низкодифференцированный рак щитовидной железы; ПРЩЖ – папиллярный рак щитовидной железы; РЩЖ – рак щитовидной железы; ФРЩЖ – фолликулярный рак щитовидной железы.

Например, мутация гена BRAF V600E обладает высокой специфичностью для ПРЩЖ. Однако и другие опухоли могут содержать в своем генетическом материале мутацию V600E. Распространенность этой мутации различна: от 29 до 83% при ПРЩЖ, 70% – при меланомах, 5–9% – при аденокарциномах толстой кишки, 5–7% – при холангиокарциномах. Помимо вышеописанной аберрации существуют и другие редкие изменения гена BRAF, такие как мутация K601E, перестройка AKAP9/BRAF, а также вставки или делеции около кодона 600 [4, 8].

В отличие от аберраций BRAF мутации генов семейства RAS более распространены среди фолликулярных неоплазий ЩЖ и неинвазивных новообразований с фолликулярным типом роста (NIFTP – noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features).

	PTEN	CTNNB1	EIF1AX	ALK	Хромосомная ДНК
	5–20%	0–5%	5–15%	0–10%	Нестабильная, сложные кариотипические изменения
	10–15%	0–5%	5–15%	0–10%	Нестабильная, выраженная анеуплоидия, сложные кариотипические изменения
	0–10%	0%	0%	0%	Нестабильная, около 65% наблюдений имеют кариотипические изменения
	0–5%	0%	0–5%	0–5%	Стабильная

Прогностическая и диагностическая значимость данных мутаций в настоящее время является актуальным вопросом для обсуждения. Согласно некоторым зарубежным и отечественным исследованиям, существуют теории о злокачественном потенциале мутаций генов семейства RAS. Публикуются данные о том, что обнаружение мутаций в генах семейства RAS при Bethesda IV может быть предиктором злокачественного процесса. Однако ряд исследователей полагает, что злокачественные новообразования, положительные на мутации в генах RAS, имеют более благоприятный прогноз, чем опухоли с мутациями в генах BRAF и особенно TERT [8]. В то же время существуют данные о том, что некоторые новообразования, где мутации в генах RAS являются драйверными, имеют тенденцию к малигнизации. Так, например, NIFTP является предшествующей стадией инкапсулированного фолликулярного варианта ПРЩЖ, а мутации генов RAS при данном типе встречаются в половине случаев. Определение мутаций генов RAS может быть полезно для дифференциального диагноза между NIFTP и инвазивной формой фолликулярного варианта ПРЩЖ.

Мутации в генах BRAF и KRAS часто обнаруживают как при высокодифференцированном РЩЖ, так и при НРЩЖ и АРЩЖ, это, вероятнее всего, говорит о том, что данные аберрации возникают на ранних этапах канцерогенеза. Часто при АРЩЖ и НРЩЖ обнаруживаются дополнительные мутации, которые не встречаются в случае дифференцированных форм РЩЖ. Появление новых аберраций на поздних этапах канцерогенеза может быть причиной начала дедифференцировки опухоли. Мутации в генах TP53, CTNNB1, а также мутации в генах, кодирующих белки PI3K/AKT-сигнального пути, чаще всего обнаруживаются на поздних этапах эволюции опухоли. Мутации TP53 являются одним из наиболее типичных «поздних» генетических событий, обнаруживаемых в небольшой части высокодифференцированных видов рака, но более чем в половине случаев АРЩЖ.

Мутации промотора TERT характерны скорее для низкодифференцированных форм РЩЖ. Аберрации TERT присутствуют только в 11,3% случаев высокодифференцированного ПРЩЖ и в 17,1% случаев ФРЩЖ. Однако распространенность среди широко инвазивных гюртле-клеточных карцином составляет 32%, для АРЩЖ – 40,1% случаев. Кроме того, мутации промотора гена TERT обнаруживаются почти во всех клеточных линиях рака ЩЖ, даже в тех, которые получены из подтипов высокодифференцированного РЩЖ, либо в гетерозиготном, либо в гомозиготном мутантном состоянии, что указывает на их важную роль в клеточной пролиферации [7].

Существует строгая корреляция между хромосомными соматическими аномалиями, характерными для ПРЩЖ, и случаями облучения ионизирующим излучением. Перестройка RET/PTC обнаруживается у 80% пациентов с ПРЩЖ, которые ранее подверглись воздействию радиации в терапевтических целях или случайно. Чернобыльская авария значительно увеличила распространенность перестроек RET/PTC3 и новых RET/PTC-ассоциированных видов РЩЖ. Перестройка BRAF/AKAP9 также чаще всего встречается у пациентов с ПРЩЖ, подвергнувшихся радиационному облучению. Нужно отметить, что точечные мутации в генах BRAF и KRAS редко встречаются в случаях РЩЖ, индуцированных излучением.

Сводная информация о распространенности различных мутаций при РЩЖ, а также спектр и характеристики наиболее часто встречающихся мутаций представлены в табл. 1 и 2 соответственно.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

В соответствии с зарубежными рекомендациями NCCN (National Comprehensive Cancer Network (Национальная всеобщая онкологическая сеть), США) и АТА (Американская тиреоидная ассоциация), а также отечественными рекомендациями АОР (Ассоциация онкологов России) для узлов ЩЖ с цитологическим заключением Bethesda III–V показано молекулярно-генетическое исследование цитологического материала ЩЖ. По данным различных исследований, большая часть случаев РЩЖ имеет только одну мутацию из наиболее распространенных. Подобные данные позволяют сделать вывод о взаимоисключающей природе мутаций для подавляющего большинства случаев. Поэтому для диагностических целей можно использовать панель для одномоментной детекции нескольких мутаций. Это позволяет достичь оптимальных значений чувствительности и специфичности.

На основании данных анализа мутаций в генах BRAF, RAS и транслокаций RET/PTC и PAX8/PPARG была создана панель из 7 генов, включающая мутации в генах BRAF, KRAS, HRAS, NRAS и хромосомные транслокации RET/PTC1, RET/PTC3 и PAX8/PPARG. Эта панель в настоящее время широко применяется в клинической практике, в том числе на территории Российской Федерации. Молекулярно-генетическое исследование этих аберраций предлагается использовать в качестве подтверждающего теста из-за их высокой специфичности (86–100%) и положительной прогностической ценности (84–100%). В табл. 3 представлены операционные характеристики панели из 7 генов для каждой категории промежуточного значения согласно рекомендациям АТА.

Никифоров Ю. Е. с коллегами в 2009 году первыми опубликовали данные об увеличении чувствительности и точности диагностики РЩЖ с помощью анализа панели мутаций в генах BRAF, RAS и транслокаций RET/PTC и PAX8/PPARG. На основании этих данных в 2009 году был создан первый коммерчески доступный тест под названием miRInform (Asuragen, Inc., Остин, США). Мутации в генах BRAF, KRAS, HRAS, NRAS и хромосомные транслокации RET/PTC1, RET/PTC3 и PAX8/PPARG также были использованы в тест-системе 7-Gene Panel (панель из 7 генов). Этот тест был позже модифицирован с добавлением мутаций в гене PIK3CA, а впоследствии еще и TERT; в настоящее время предлагается Interpace Diagnostics (Парсиппани, США) в качестве теста ThyGenX.

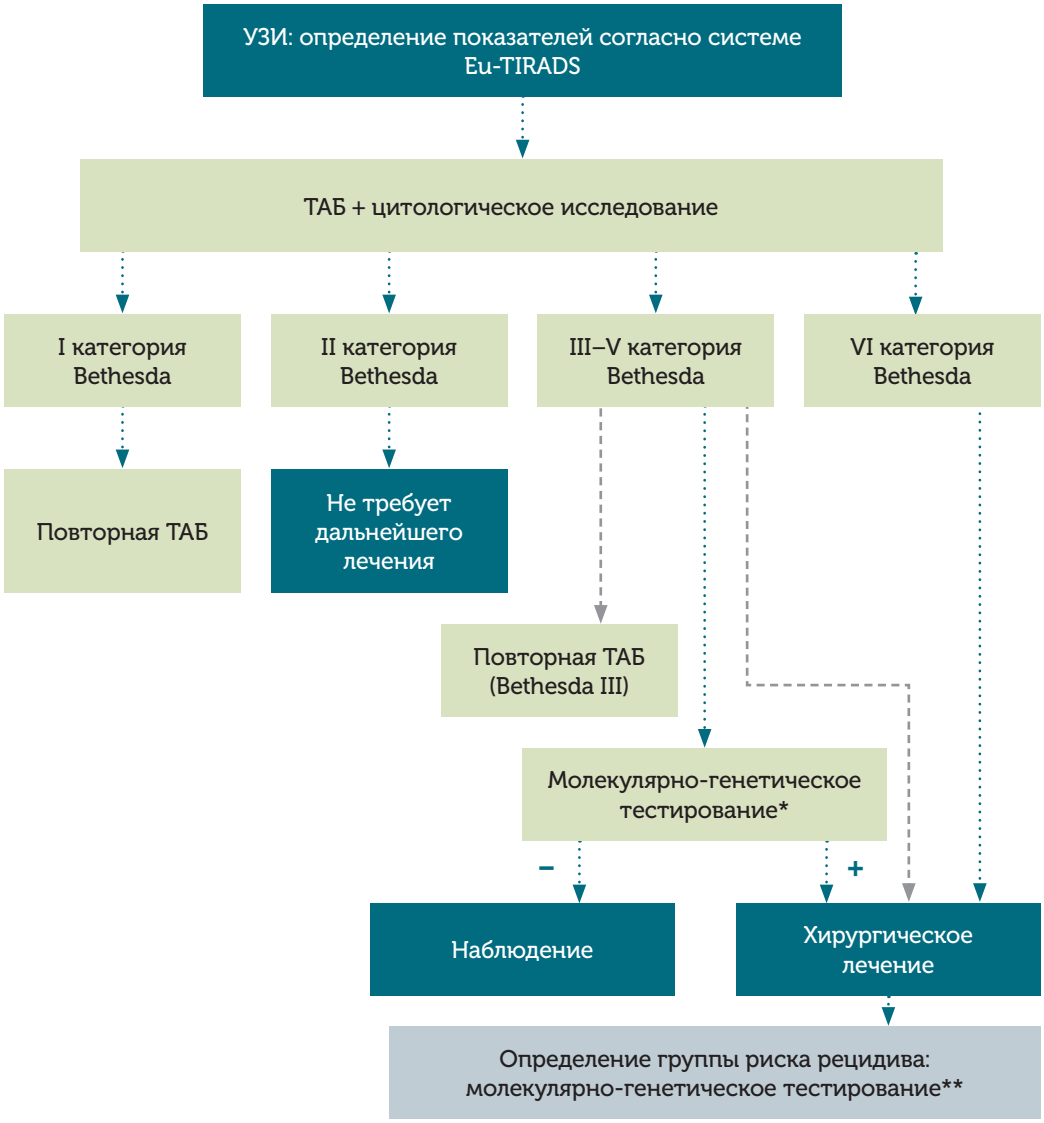
Технология массового параллельного секвенирования произвела революцию в геномных исследованиях – большой шаг вперед по сравнению с методом секвенирования по Сэнгеру. Секвенирование нового поколения позволяет определять нуклеотидные последовательности целых геномов или отдельных их частей, включая все кодирующие последовательности (экзом) или небольшое количество отдельных генов. Первым молекулярным тестом, основанным на массовом параллельном секвенировании, адаптированным для РЩЖ, был ThyroSeq, который предлагается CBLPath. В дополнение к мутациям, присутствующим в панели из 7 генов, были добавлены другие недавно идентифицированные мутации в генах PIK3CA, TP53, TSHR, PTEN, RET, AKT1, CTNNB1 и TERT, а также транслокации генов BRAF, RET, NTRK1, NTRK3, AKT1, PPARG и THADA. На данный момент разработана уже третья версия этого теста ThyroSeq v3, основанная на выявлении более 12 000 мутаций в 112 генах и более 150 транслокаций.

На рис. 5 представлен алгоритм ведения пациентов с узлами ЩЖ с использованием молекулярно-генетической панели для поиска мутаций в генах BRAF, RAS, а также в про-

Таблица 3. Диагностическая характеристика панели BRAF, RAS, RET/PTC, PAX8/PPARG согласно рекомендациям Американской тиреоидной ассоциации

Цитологическая категория	Чувствительность	Специфичность	Положительная прогностическая ценность	Отрицательная прогностическая ценность
Bethesda III	63–80%	99%	88%	94%
Bethesda IV	57–75%	97–100%	87–100%	79–86%
Bethesda V	50–68%	86–96%	80–95%	72–75%

Рис. 5. Алгоритм ведения пациентов при узловом образовании железы согласно рекомендациям ATA, NCCN



Примечание. * – материал: предметные стекла с цитологическим материалом и клеточная взвесь жидкостной биопсии; ** – материал: операционный материал (блоки тканей, фиксированные формалином и залитые парафином). ATA – Американская тиреоидная ассоциация; Eu-TIRADS – шкала European Thyroid Imaging And Reporting Data System (Европейская система описания и оценки образований щитовидной железы); NCCN – Национальная всеобщая онкологическая сеть (США); ТАБ – тонкоигольная аспирационная биопсия; УЗИ – ультразвуковое исследование.

моторной зоне гена TERT и транслокаций RET/PTC и PAX8/PPARG.

На базе Научно-методического центра (НМЦ) Минздрава России по молекулярной медицине ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова было проведено исследование по изучению распространенности мутаций в структуре РЩЖ, а также работа по созданию панели для выявления мутаций при РЩЖ методом мультитаргетной однонуклеотидной элонгации (МОЭ) [9]. Данные опубликованы в журнале «Молекулярная медицина».

В ходе одного из исследований были отобраны 52 пациента с новообразованием ЩЖ. Для

Таблица 4. Генетические панели для детекции точечных мутаций с помощью метода мультитаргетной однонуклеотидной элонгации

Панель	Ген	Экзон	Определяемая мутация	Нуклеотидная замена
Панель 1	KRAS	2	c.38G>A	G13D
			c.35G>C	G12A
			c.34G>T	G12C
			c.37G>C	G13R
Панель 2	KRAS	3	c.183A>C	Q61H
			c.181C>A	Q61K
			c.182A>T	Q61L
	HRAS	3	c.181C>A	Q61K
Панель 3	NRAS	3	c.181C>A	Q61K
			c.182A>G	Q61R
			c.183A>C	Q61H
	HRAS	3	c.182A>G	Q61R
	BRAF	15	c.1799T>A	V600E

Таблица 5. Распространенность мутаций среди пациентов (n=52) с цитологическим заключением Bethesda IV–VI

Группа пациентов	Обнаруженные мутации	Распространенность
I группа (Bethesda IV)	NRAS Q61R	10%
	Мутаций не обнаружено	36%
II группа (Bethesda V)	BRAF V600E	6%
	Мутаций не обнаружено	8%
III группа (Bethesda VI)	BRAF V600E	23%
	Мутаций не обнаружено	17%

каждого пациента собраны образцы ТАБ. Пациентов распределили на три группы в зависимости от категории по классификации Bethesda (IV, V, VI). Для сравнения данных у части пациентов были получены результаты постоперационного гистологического исследования опухолевого образца. По гистологическим типам РЩЖ пациентов разделили на три группы: ПРЩЖ, фолликулярный вариант ПРЩЖ и фолликулярная аденома. В качестве цитологического материала опухолевой ткани был представлен смыв с иглы ТАБ.

Панель молекулярно-генетического тестирования включала наиболее распространенную мутацию V600E в гене BRAF, а также точечные мутации в 12, 13 и 61-м кодонах гена KRAS и 61-м кодоне генов NRAS и HRAS. В табл. 4 приведено содержание описанных панелей.

Исследование цитологического материала позволило выявить ряд аберраций. В табл. 5 представлена информация о детектированных мутациях, их распределении по клиническим группам и распространенности. Наибольшей распространенностью обладала мутация в гене BRAF V600E. При этом детектировать данную мутацию удалось только в образцах с цитологическим заключением Bethesda V–VI. У большинства пациентов результаты тестирования на мутации в генах RAS оказались отрицательными, однако в некоторых образцах была обнаружена аберрация Q61R в гене NRAS. Стоит отметить, что данная мутация встретилась исключитель-

но в группе пациентов с IV категорией по классификации Bethesda.

В 100% случаев детекция мутации в гене BRAF V600E была ассоциирована с диагнозом РЩЖ по результатам постоперационного гистологического исследования. Полученные результаты соответствуют данным ATA и подтверждают возможность использования мутации BRAF V600E в качестве маркера для диагностики ПРЩЖ. Среди мутаций генов RAS удалось обнаружить мутацию гена NRAS Q61R только в первой группе пациентов с цитологическим заключением Bethesda IV. Нахождение мутаций RAS в конкретной группе подтверждается данными о высокой распространенности мутаций RAS в образцах фолликулярной неоплазии. По результатам данного исследования мутация Q61R NRAS была детектирована исключительно в образцах фолликулярной аденомы.

Еще одно исследование, выполненное также на базе НМЦ Минздрава России по молекулярной медицине ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, было посвящено изучению диагностической и прогностической значимости молекулярно-генетического тестирования у 143 пациентов с цитологическим заключением Bethesda IV, результаты опубликованы в журнале «Опухоли головы и шеи» [10]. В данной работе в качестве исследуемого материала был представлен как гистологический постоперационный материал, так и цитологический (смыв с иглы ТАБ); молекулярно-генетическая панель включала точечные мутации в генах BRAF, KRAS, NRAS, HRAS, промоторной зоне гена TERT и перестройки RET/PTC1, RET/PTC3, PAX8/PPARG.

По результатам молекулярно-генетического тестирования гистологического материала мутации в генах BRAF, TERT, KRAS, NRAS, HRAS были обнаружены в 35,1% (20/57) случаев карцином ЩЖ. Распространенность аберраций в исследуемых генах при доброкачественных новообразованиях составила 4,7%: 2 случая при фолликулярной аденоме и 2 – при гюртле-клеточной. У всех пациентов с наличием мутаций в исследуемых генах аналогичная аберрация была выявлена и в архивном цитологическом материале, что обусловливает стопроцентную сопоставимость операционного и цитологического образцов, полученных от одного пациента.

Мутация V600E в гене BRAF была обнаружена исключительно при РЩЖ (8,8% случаев): 3 случая при ПРЩЖ, 1 – при фолликулярном варианте ПРЩЖ, 1 – при НРЩЖ. Эти данные также позволяют говорить о возможности использования мутации V600E в гене BRAF в качестве диагностического маркера РЩЖ. Распространенность мутаций в генах семейства RAS при карциномах ЩЖ составила 24,6% (14/57). При фолликулярном варианте папиллярной карциномы мутации в этих генах наблюдались в 37,5% (9/24) случаев, при фолликулярной карциноме – в 25% (4/16), при гюртле-клеточной карциноме – в 16,7% (1/6). Также мутации в генах данного семейства были выявлены и при доброкачественных опухолях ЩЖ (4,7% (4/86) случаев). В 2 случаях фолликулярной аденомы обнаружена синонимичная мутация Q61R в гене HRAS, в 2 случаях гюртле-клеточной аденомы – мутация Q61R в гене NRAS и мутация G12C в гене KRAS. Распространенность мутаций в промоторном регионе гена TERT при раке ЩЖ составила 1,8% (1/57), при гюртле-клеточной карциноме – 16,7% (1/6). В ходе секвенирования на момент постановки диагноза была обнаружена мутация C228T в промоторном регионе гена TERT.

Было показано, что мутации в гене BRAF ассоциированы с более агрессивными клинико-патоморфологическими характеристиками: экстратиреоидной инвазией (p=0,024), сосудистой инвазией (p=0,018) и метастазами в лимфатических узлах (p=0,018). При этом не обнаружено взаимосвязи мутаций в генах RAS и данных морфологических особенностей (p>0,05).

РЕЗЮМЕ

Таким образом, молекулярно-генетическое тестирование цитологического материала ЩЖ в настоящее время является стандартом диагностики РЩЖ и включено в международные (NCCN, ATA) и отечественные (АОР) рекомендации. Актуальные молекулярно-генетические панели для РЩЖ направлены на детекцию точечных мутаций в генах BRAF, KRAS, NRAS, HRAS, промоторном регионе гена TERT, а также перестроек RET/PTC и PAX8/PPARG. Данный вид диагностики является особенно актуальным для новообразований с неопределенной цитологической значимостью по классификации Bethesda (III–V категории). Мутации в гене BRAF и промоторном регионе гена TERT обладают высокой специфичностью по отношению к РЩЖ. В то время как мутации в генах семейства RAS обладают прогностической значимостью для определения РЩЖ и могут быть использованы в качестве предиктивного маркера развития злокачественного процесса.

УЗЛОВОЙ МОМЕНТ

1. Hay ID, Thompson GB, Grant CS, Bergstralh EJ, Dvorak CE, Gorman CA, et al. Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940–1999): Temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. World J Surg. 2002;26(8):879–885. doi: 10.1007/s00268–002–6612–1.
2. Saiselet M, Floor S, Tarabichi M, Dom G, Hébrant A, van Staveren WCG, et al. Thyroid cancer cell lines: An overview. Front Endocrinol

(Lausanne). 2012;3(NOV):1–9. doi: 10.3389/fendo.2012.00133.
3. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. Thyroid [Internet]. 2016;26(1):1–133. doi: 10.1089/thy.2015.0020.
4. Kim WW, Ha TK, Bae SK. Clinical implications of the BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma and chronic lymphocytic thyroiditis. J Otolaryngol Head Neck Surg. 2018;47(1):1–6. doi: 10.1186/s40463–017–0247–6.
5. Marotta V, Bifulco M, Vitale M. Significance of RAS Mutations in Thyroid Benign Nodules and Non-Medullary Thyroid Cancer. Cancers (Basel). 2021 Jul 27;13(15):3785. doi: 10.3390/cancers13153785.
6. Nikiforov YE. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. Endocr Pathol. 2002 Spring;13(1):3–16. doi: 10.1385/ep:13:1:03.
7. McKelvey BA, Umbricht CB, Zeiger MA. Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Regulation in Thyroid Cancer: A Review. Front Endocrinol (Lausanne). 2020 Jul 31;11:485. doi: 10.3389/fendo.2020.00485.
8. Xie H, Wei B, Shen H, Gao Y, Wang L, Liu H. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma (PTC) and its association with clinicopathological features and systemic inflammation response index (SIRI). Am J Transl Res. 2018 Aug 15;10(8):2726–2736.
9. Федорова П. А., Назаров В. Д., Мусаелян А. А., Лапин С. В., Борискова М. Е., Фарафонова У. В., Эмануэль В. Л. Стандартизация метода мультитаргетной однонуклеотидной элонгации для молекулярно-генетического исследования цитологического материала при новообразованиях щитовидной железы. Молекулярная медицина, 2020;18(6):31–37. doi: 10.29296/24999490–2020–06–05.
10. Мусаелян А. А., Лапин С. В., Назаров В. Д. и др. Диагностическая и прогностическая значимость выявления мутаций BRAF, TERT, RAS, RET/PTC и PAX8/PPARG в материале тонкоигольной аспирационной биопсии узлов щитовидной железы IV цитологической категории (Bethesda, 2017). Опухоли головы и шеи. 2022;12(2):71–8. doi: 10.17650/2222–1468–2022–12–2–71–78.