УДК 616.441-006.6-071:612.6.05
DOI: http://doi.org/10.30978/CEES-2021-2-9

Впровадження молекулярно-генетичного обстеження в діагностику тиреоїдного раку: власне дослідження

О. П. Нечай, О. А. Товкай, В. О. Паламарчук, Н. І. Белемець, С. І. Ніколаєнко, О. В. Мазур, Д. М. Квітка, П. О. Ліщинський

Український науково-практичний центр ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України, Київ

Визначення чинників, які впливають на перебіг і агресивність пухлинного процесу, має важливе значення в онкології. Протягом останніх десятиріч у світі спостерігається збільшення кількості нових випадків раку щитоподібної залози (РЩЗ) [1, 2], тому вивчення агресивності РЩЗ є актуальним напрямом досліджень. Отримані дані дадуть змогу розробити практичні рекомендації щодо вирішення таких питань, як невідкладність проведення оперативних втручань, оптимальна тривалість спостереження при відповідній можливості та обсяг оперативного втручання (виконання органощадних операцій та обсяг дисекції шиї), а в майбутньому, можливо, сприятимуть розробці альтернативних оперативному втручанню методів лікування.

Нині досліджено понад 100 генів, які детермінують розвиток тиреоїдного раку [3]. Їх роль оцінюють неоднозначно. Накопичений досвід і матеріали досліджень аналізують за допомогою статистичних комп'ютерних програм з метою оцінки їх впливу на розвиток РЩЗ [3, 4]. З 2020 р. деякі молекулярно-генетичні маркери (МГМ), а саме *BRAFV600E, NRAS, KRAS, HRAS, RET/PTC (RET/PTC1* і *RER/PTC3), PAX8/PPARg*, є доступними для дослідження в медичних закладах України, які проводять обстеження та лікування пацієнтів з РЩЗ.

Мета роботи — дослідити значення мутацій *BRAFV600E, NRAS, KRAS, HRAS, RET/PTC (RET/PTC1* і *RER/PTC3), PAX8/PPARg* для розвитку та перебігу тиреоїдного раку, визначити значущу мутацію-предиктор.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Проаналізовано дані 63 хворих, яким на доопераційному етапі було проведено молекулярно-генетичне тестування (МГТ) утворень щитоподібної залози (ЩЗ) та оперативне лікування в умовах хірургічного відділення Українського науково-практичного центру ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України. Вік хворих становив від 11 до 76 років (середній вік — (41,0 ± 1,8) року). Серед пацієнтів було 7 чоловіків та 56 жінок (1 : 8).

Усім хворим проводили тонкоголкову аспіраційну пункційну біопсію (ТАПБ) вузлів ЩЗ за стандартною методикою з цитологічним висновком відповідно до

©Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія
©Нечай Олександр Павлович, к. мед. н., зав. відділення ендокринної хірургії. 01021, м. Київ, вул. Кловський узвіз, 13-А. E-mail: Allanechay@ukr.net; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5978-4458; ©Товкай Олександр Андрійович, д. мед. н., ст. наук. співр. 01021, м. Київ, вул. Кловський узвіз, 13-А. E-mail: director.tovkai@gmail.com. ORCID: http://orcid.org/0000-0002-1329-279X; ©Паламарчук Володимир Олександрович, д. мед. н. 01021, м. Київ, вул. Кловський узвіз, 13-А. E-mail: paldoc@i.ua. ORCID: http://orcid.org/0000-0001-9554-4817; ©Белемець Наталія Іванівна, зав. відділенням цитології. 01021, м. Київ, вул. Кловський узвіз, 13-А. ORCID: http://orcid.org/0000-0002-1050-1277; ©Ніколаєнко Софія, мол. наук. співр., відділ патології. 01021, м. Київ, вул. Кловський узвіз, 13-А; ©Мазур Олег Васильович, лікар-хірург. 01021, м. Київ, вул. Кловський узвіз, 13-А. E-mail: mazov1991@gmail.com. ORCID: http://orcid.org/0000-0002-8540-9192. 01021; ©Квітка Дмитро Миколайович, лікар-хірург. 01021, м. Київ, вул. Кловський узвіз, 13-А. E-mail: dnkvitka@gmail.com. ORCID: http://orcid.org/0000-0002-7606-8365; ©Ліщинський Павло Олександрович, мол. наук. співр. відділу «Патологія». 01021, м. Київ, вул. Кловський узвіз, 13-А. E-mail: endosurg88@ukr.net. ORCID: http://orcid.org/0000-0003-3586-0468.

системи Bethesda [5]. З невизначеною цитологією було 28 хворих: з категорією Bethesda III — 3 (4,8 %), Bethesda IV — 13 (20,6 %), Bethesda V — 12 (19,0 %). У 35 (55,6 %) хворих отримано цитологічний висновок — РЩЗ (Bethesda VI). Усім пацієнтам проводили МГТ з виявленням наявності певних генів, пов'язаних з розвитком РЩЗ (молекулярно-генетичний метод (полімеразна ланцюгова реакція у режимі реального часу)). Патогенні мутації зареєстровано у 47 (74,6 %) хворих (перша група), з них у двох — по дві мутації. В 16 (25,4 %) випадках патогенні мутації не виявлено (друга група).

За патогістологічним висновком (ПГВ) після оперативного втручання в 15 випадках діагностовано атипову аденому, у 48 — папілярний РЩЗ.

Агресивність пухлини оцінювали у ПГВ за наявністю таких параметрів: багатофокусний ріст (9 випадків) та метастази (9). Екстраорганної інвазії без урахування випадків проростання в жирову клітковину в обстежених хворих не спостерігали.

Накопичення та обробку даних здійснювали у програмі MS Excel 2013. При виконанні розрахунків використовували програму статистичного аналізу StatPlus 7 (AnalystSoft Inc.).

Застосовували методи статистичного аналізу: кутове перетворення Фішера, критерій χ^2 з поправкою Йєйса, метод Вілсона (при розрахунку довірчих інтервалів операційних характеристик тестів). Статистично значущими вважали результати при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У хворих, яким провели МГТ, було виявлено мутації (рисунок).

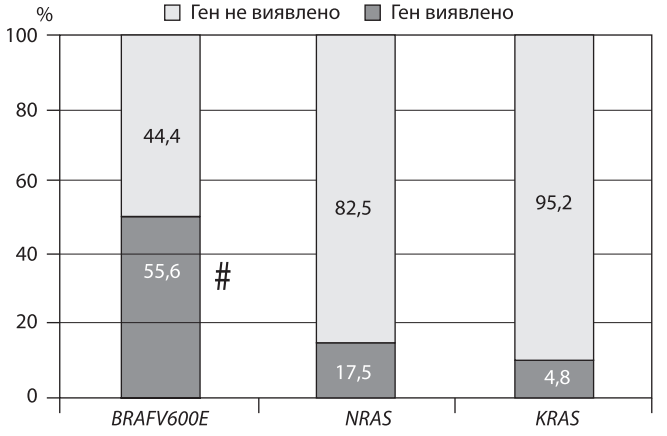

Рисунок. *Результати молекулярно-генетичного тестування.* # — відмінність від інших генів статистично значуща ($p < 0,01$)

Наявність патогенної мутації виявлено у 47 (74,6 %) хворих (перша група), серед них ген *BRAFV600E* був виявлений у 35 хворих (55,6 %), *NRAS* — у 11 хворих (17,5 %), *KRAS* — у 3 хворих (4,8 %), при цьому в 1 хворого були одночасно виявлені гени *BRAFV600E* та *NRAS*, і ще у 1 — *NRAS* та *KRAS*. Гени *HRAS, RET PTC1, RER/PTC3, PAX8/PPARg* у хворих цієї групи виявлені не були.

Проведено аналіз зв'язку між мутаціями, що спостерігались у хворих, з результатами цитологічних висновків, класифікованого за категорією Bethesda. Дані наведені в табл. 1.

Результат дослідження показує, що мутація гена *BRAFV600E* частіше виявляється серед всіх (n = 65) встановлених мутацій і дорівнює 53,8 %. Ця мутація зустрічається при встановленні цитологічного висновку, класифікованого як Bethesda VI у 77,1 % і спостерігається у 74,5 % серед усіх інших встановлених мутацій у хворих першої групи (n = 49).

Таблиця 1

Цитологічні висновки у пацієнтів з різним генетичним статусом (n = 65)

Генетичний статус		**Цитологічний висновок**			
		Bethesda III (n = 3)	**Bethesda IV (n = 13)**	**Bethesda V (n = 12)**	**Bethesda VI (n = 35)**
Перша група (n = 47)	*BRAFV600E* (n = 35)	1 (33,3 %)	5 (35,7 %)	2 (15,4 %)	27 (77,1 %)
	NRAS (n = 11)	—	6 (42,9 %)	4 (30,8 %)	1 (2,9 %)
	KRAS (n = 3)	—	2 (14,3 %)	1 (7,7 %)	—
Друга група (n = 16)	Не виявлено МГМ (n = 16)	2 (66,7 %)	1 (7,1 %)	6 (46,1 %)	7 (20,0 %)
Усього		3 (4,6 %)	14 (21,5 %)*	13 (20,0 %)*	35 (53,9 %)

Примітка. * — у двох пацієнтів виявлено по 2 гени (у одного — *BRAFV600E* та *NRAS*, у другого — *NRAS* і *KRAS*).

Таблиця 2

Патогістологічний висновок залежно від наявності молекулярно-генетичних маркерів у хворих першої групи (n = 47)

МГМ	Діагноз	
	РЩЗ	Атипова аденома
BRAFV600E (n = 35)	31 (88,6 %)##	4 (11,4 %)
NRAS (n = 11)	8 (72,7 %)#	3 (17,3 %)
KRAS (n = 3)	1	2
Усього	38 (80,9 %)*#	9 (19,1 %)

Примітка. * – у двох пацієнтів виявлено по 2 мутації генів (у одного — *BRAFV600E* та *NRAS*, у другого — *NRAS* і *KRAS*); # — відмінність між підгрупами РЩЗ і атипової аденоми статистично значуща (p < 0,05); ## — відмінність між підгрупами РЩЗ і атипової аденоми статистично значуща (p < 0,01).

Проведено аналіз зв'язку між мутаціями генів у хворих першої групи та наявністю у них РЩЗ і атипової аденоми (табл. 2).

Частота виявлення мутації гена *BRAFV600E* у підгрупі РЩЗ була статистично значущо (p < 0,01) вища, ніж у підгрупі атипової аденоми. Частота виявлення мутації гена *NRAS* у цих підгрупах також статистично значущо відрізнялася (p < 0,05). Через малу кількість спостережень (3 випадки) мутації гена *KRAS* порівняння між підгрупами не проводили.

Вивчено зв'язок між наявністю гена *BRAFV600E* та встановленням діагнозу РЩЗ за допомогою таблиць перехресної класифікації 2 × 2 з визначенням критерію χ^2 з поправкою Йєйса (табл. 3).

Значення критерію χ^2 з поправкою Йєйса — 5,207 (p = 0,023), тобто зв'язок між наявністю гена *BRAFV600E* і діагнозом РЩЗ є статистично значущим. Натомість використання тесту на наявність гена *NRAS* для виявлення РЩЗ було неефективним (χ^2 = 0,009, p = 0,927, тобто статистично значущий зв'язок між наявністю гена *NRAS* і діагнозом РЩЗ не виявлено).

Чутливість тесту на наявність мутації гена *BRAFV600E* для диференційної діагностики є відносно невисокою — 0,646 (95 % довірчий інтервал (ДІ) — 0,522—0,752), специфічність дещо вища — 0,733 (95 % ДІ — 0,613—0,827), натомість звертає увагу велике значення прогностичної значущості позитивного результату — 0,886 (95 % ДІ — 0,784— 0,943), тобто позитивний результат тесту свідчить про високу ймовірність виявлення у такого пацієнта РЩЗ. Прогностична значущість негативного результату становила 0,393 (95 % ДІ — 0,282—0,516), а діагностична ефективність — 66,7 % (95 % ДІ — 54,4—77,1 %).

Таблиця 3

Таблиця перехресної класифікації 2 × 2 для тесту на виявлення раку щитоподібної залози за наявності мутації гена *BRAFV600E*

Чинник ризику — наявність мутації гена *BRAFV600E*		РЩЗ		Усього
		Є	Немає	
Результат тесту	Позитивний	31	4	35
	Негативний	17	11	28
Разом		48	15	63

Таблиця 4

Результати гістологічного діагнозу у пацієнтів з різним генетичним статусом

Група	РЩЗ	Атипова аденома
Перша (n = 47)	38 (80,9 %) #	9 (19,1 %)
Друга (n = 16)	10 (62,5 %)	6 (37,5 %)
Усього (n = 63)	48 (76,2 %) #	15 (23,8 %)

— відмінність між підгрупами РЩЗ і атипової аденоми статистично значуща (p < 0,01).

Таблиця 5

Результати порівняння цитологічних висновків (відповідно до розподілу за Bethesda) і частоти виявлення раку щитоподібної залози у групах

Група хворих	Цитологічний діагноз	
	Bethesda III—V (n = 28)	Bethesda VI (n = 35)
Перша група (n = 47)	19 (67,9 %)	28 (80,0 %)
Друга група (n = 16)	9 (32,1 %)	7 (20,0 %)
РЩЗ у першій групі	10 (52,6 %)	28 (100,0 %)
РЩЗ у другій групі	3 (33,33 %)	7 (100,0 %)
Усього	13 (46,4 %)	35 (100,0 %)

За ПГВ хворим першої та другої групи було встановлено діагнози (табл. 4).

Частота виявлення РЩЗ у першій групі була вищою, ніж у другій, але різниця не досягала рівня статистичної значущості, тоді як РЩЗ в обох групах траплявся значно частіше, ніж атипова аденома (p < 0,01).

З огляду на малу кількість хворих у підгрупах з категоріями Bethesda III, IV та V («сіра зона»), ми їх об'єднали в одну групу (n = 28). Порівняли цитологічні висновки з ПГВ у першій та другій групах (табл. 5).

Таблиця 6

Результати гістологічного діагнозу раку щитоподібної залози та наявність його агресивності у пацієнтів з різним генетичним статусом (n=63)

Група хворих	Гістологічний діагноз			
	РЩЗ		Агресивність РЩЗ	
	Абс.	%	Абс.	%
Перша (n = 47)	38	80,8	15	39,5
Друга (n = 16)	10	62,5	3	33,3
Усього	48	76,2	18	37,5

Примітка. Статистично значущих відмінностей між групами не виявлено (p > 0,05).

Частота виявлення РЩЗ у першій групі з цитологічним класом Bethesda III—V була вищою, ніж у другій групі, але статистично значуще вони не відрізнялись, тоді як частота виявлення мутації у групі з цитологічним класом Bethesda VI та подальшого встановлення РЩЗ за результатом ПГЗ у обох групах була однаковою і становила 100 %.

Вивчено агресивність пухлини за гістологічним діагнозом РЩЗ у пацієнтів з різним генетичним статусом (табл. 6).

Хворі першої групи з установленим за ПГВ діагнозом РЩЗ не мали статистично значущих відмінностей за частотою агресивності пухлинного процесу від хворих з РЩЗ другої групи (39,5 та 33,3 % відповідно).

Проведене дослідження виявило наявність патогенної мутації у 47 (74,6 %) пацієнтів. Генами, які траплялися найчастіше, були *BRAFV600E* — 35 (55,6 %) випадків, *NRAS* — 11 (17,5 %), *KRAS* — 3 (4,8 %). При встановленні діагнозу РЩЗ патогенні мутації зареєстровано у 38 (79,1 %) хворих. Частота мутацій у нашому дослідженні узгоджується з літературними даними [6]: більшість мутацій відбувається у драйверних генах *BRAF, NRAS, KRAS* і *RET*, на які припадає понад 80 % генетичних подій розвитку РЩЗ. Решта генетичних подій асоціюються з більше ніж 30 генами. В нашому дослідженні гени *HRAS, RET PTC1, RER/PTC3, PAX8/PPARg* у хворих не виявлено.

Згідно з отриманими нами результатами, мутацію гена *BRAFV600E* виявлено у разі цитологічного висновку Bethesda III—V у 28,9 % випадків, а у разі Bethesda VI — у 77,1 %. Цю мутацію спостерігали найчастіше за інші, виявлені в дослідженні (n = 47) у хворих першої групи (74,5 %). Серед 48 випадків РЩЗ частота виявлення гена *BRAFV600E* становила 64,6 %. Такий результат відповідає літературним даним [7, 8], згідно з якими частота мутацій *BRAF* варіює залежно від гістологічного підтипу та географічного регіону від 28 до 83 %. Частота виявлення мутації гена *BRAFV600E* у підгрупі РЩЗ становила 88,6 % і була вищою, ніж у підгрупі атипової аденоми ($p < 0,01$). Частота виявлення мутації гена *NRAS* у підгрупі РЩЗ становила 72,76 % ($p < 0,05$). Через малу кількість спостережень (3 випадки) порівняння частоти мутацій гена *KRAS* між підгрупами не виконували.

Шляхом розрахунку критерію χ^2 з поправкою Йєйтса (5,207) виявлено зв'язок між наявністю гена *BRAFV600E* та діагнозом РЩЗ, який є статистично значущим ($p = 0,023$). Використання цього тесту для встановлення значущості гена *NRAS* для виявлення РЩЗ було неефективним ($\chi^2 = 0,009$, $p = 0,927$), тобто статистично значущого зв'язку між наявністю гена *NRAS* і діагнозом РЩЗ не встановлено. Таким чином, можна стверджувати, що мутація *BRAFV600E* є предиктором тиреоїдного раку. Про це свідчить велике значення прогностичної значущості позитивного результату. У разі отримання позитивного результату тесту на наявність мутацій у гені *BRAFV600E* можна стверджувати про високу (0,784—0,943) імовірність виявлення РЩЗ у такого пацієнта. Отримані нами результати узгоджуються з висновками інших авторів, згідно з якими мутації в гені *BRAF* є цінними молекулярними маркерами для діагностики РЩЗ [9].

При порівнянні цитологічних висновків (Bethesda III, IV та V) з частотою встановлення РЩЗ за результатом ПГВ у першій і другій групах не виявлено статистично значущого результату (52,6 та 33,33 % відповідно). Таким чином, наявність або відсутність МГМ не підвищує ймовірності виявлення РЩЗ у хворих із сумнівним результатом цитології. Отриманий нами результат суттєво відрізняється від літературних повідомлень. Це може бути пов'язане з малою кількістю спостережень (28 випадків), а також з регіональним поширенням раку для кожної цитологічної категорії. В цілому наші результати відображають тенденцію, про яку раніше повідомили L. Yip та R. L. Ferris: мутація гена *BRAFV600E* трапляється рідше, ніж інші генні зміни у цитологічно невизначених зразках ТАПБ незалежно від категорії цитології [10].

При вивченні агресивності пухлин у разі РЩЗ у пацієнтів з різним генетичним статусом статистично значущих відмінностей між хворими першої та другої групи не виявлено (39,5 і 33,3 % відповідно), тобто, наявність мутацій генів *BRAFV600E*, *NRAS* та *KRAS* не була свідченням агресивнішого перебігу РЩЗ. Про схожі результати повідомили C. G. Nair та

співавт., які дослідили 59 пацієнтів, прооперованих з приводу РЩЗ: 51 % з них мали мутацію гена *BRAFV600E*, але статус мутації не був чинником агресивності пухлини та не асоціювався з несприятливим прогнозом [11].

У міру накопичення знань щодо генів, які можуть бути пов'язані з розвитком РЩЗ, змінюються генетичні мутаційні панелі в бік збільшення кількості генів [12]. Так, повідомлено, що найефективнішими є Thyroseq і класифікатор експресії генів AFIRMA (GEC) з прогностичною значущістю негативного результату 56—100 % і прогностичною значущістю позитивного результату 19—100 %. Перша версія ThyroSeq (використана в нашому дослідженні) містила панель 7 генів (*BRAF, H-K-N-RAS, RET/PTC1-3, PAX8/PPARγ*) з чутливістю близько 65 % [13, 14], прогностичною значущістю негативного та позитивного результату — 56—100 і 19—100 % відповідно. Наступні покоління платформ містили 13-генну (ThyroSeq v1) [15] та 56-генну (ThyroSeq v2) панель. Остання версія (ThyroSeq v3) дає змогу оцінити точкові мутації, злиття генів, зміни кількості копій та аномальну експресію генів у 112 генах. Відмічено значно більшу чутливість та специфічність [4, 16], що доводить функціональну здатність панелі щодо тестування тиреоїдних пухлин. У нашому дослідженні використано першу панель МГТ з малою кількістю генів і низькою чутливістю, що зумовило відповідний результат роботи.

Застосування в клінічній практиці високопродуктивних методів секвенування дасть змогу розробити діагностичні системи, котрі врахують більшу кількість відомих мутацій, пов'язаних з розвитком РЩЗ, що поліпшить точність діагностики і дасть змогу знизити кількість як хибнопозитивних, так і хибнонегативних висновків за підсумками біопсії вузлів ЩЗ.

ВИСНОВКИ

Застосування набору для визначення молекулярно-генетичних маркерів (*BRAFV600E, NRAS, KRAS, HRAS, RET/PTC* (*RET/PTC1* и *RER/PTC3*), *PAX8/PPARg*) дало змогу виявити патогенні мутації лише в генах *BRAFV600E, NRAS, KRAS* у 79,1% випадках раку щитоподібної залози, що узгоджується з літературними даними.

Наявність молекулярно-генетичних змін (*BRAFV600E, NRAS, KRAS*), які відбуваються в тиреоїдній пухлині, в поєднанні з цитоморфологічним висновком за системою Bethesda III, IV та V у досліджуваних хворих не корелювала з установленням раку щитоподібної залози.

Значущим предиктором серед досліджених генів-кандидатів для встановлення діагнозу раку щитоподібної залози є *BRAFV600E*, який був виявлений у 64,6 % випадків з прогностичною значущістю позитивного результату 0,784—0,943.

Виявлення молекулярно-генетичних маркерів (*BRAFV600E, NRAS, KRAS*) у хворих з установленим гістологічним діагнозом раку щитоподібної залози не було пов'язане з агресивністю перебігу пухлинного процесу.

Упровадження нових ширших наборів молекулярно-генетичних тестів дасть змогу з високою ймовірністю запідозрити або встановити діагноз раку щитоподібної залози, прогнозувати ступінь агресивності перебігу захворювання.

Етичне схвалення. *Усі процедури проведеного дослідження із залученням пацієнтів, відповідали етичним стандартам керівництв з клінічної практики та вимогам Гельсінської декларації (1964) з поправками. Пацієнти/батьки або юридичні опікуни пацієнтів підписали форми інформованої згоди на лікування та проведення всіх необхідних діагностичних процедур.*

Гонорар: *не задекларовано.*

Конфлікт інтересів: *Автори заперечують конфлікт інтересів при підготовці статті.*

Участь авторів: *концепція та дизайн дослідження — О. П. Нечай, О. А. Товкай, В. О. Паламарчук; обстеження/підбір хворих — О. П. Нечай, Д. М. Квітка, П. О. Ліщинський, Н. І. Белемець; збір та обробка матеріалу — О. П. Нечай, Д. М. Квітка, П. О. Ліщинський; написання тексту — О. П. Нечай, Д. М. Квітка, П. О. Ліщинський; редагування — О. П. Нечай, О. А. Товкай, В. О. Паламарчук.*

ЛІТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Database Report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985–1995. Cancer. 1998;83(12):2638-4.
2. Yu GP, Li JC, Branovan D. et al. Thyroid cancer incidence and survival in the National Cancer Institute Surveillance, Epidemiology, and End Results race/ ethnicity groups. Thyroid. 2010;20(5):465-73.
3. Ohori NP. Molecular testing and thyroid nodule management in North America. Gland Surg. 2020 Oct;9(5):1628-38. doi: 10.21037/gs-2019-catp-26. PMID: 33224840; PMCID: PMC7667110.
4. Nikiforov YE, Baloch ZW. Clinical validation of the ThyroSeq v3 genomic classifier in thyroid nodules with

indeterminate FNA cytology. Cancer Cytopathol. 2019;127:225-30. doi: 10.1002/cncy.22112.
5. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA. 2002 Apr 24;287(16):2114-9. doi: 10.1001/jama.287.16.2114. PMID: 11966386.
6. Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P. ENDOCRINE TUMOURS: Advances in the molecular pathogenesis of thyroid cancer: lessons from the cancer genome. European Journal of Endocrinology. 2016;175(5):R203-R217. Retrieved Feb 16, 2020, from https://eje.bioscientifica.com/view/journals/eje/175/5/R203.xml.
7. Kim MH, Bae JS, Lim DJ. et al. Quantification of BRAF V600E alleles predicts papillary thyroid cancer progression. Endocr Relat Cancer. 2014;21(6):891-902. doi: 10.1530/ERC-14-0147.
8. Vuong HG, Altibi AM, Abdelhamid AH. et al. The changing characteristics and molecular profiles of papillary thyroid carcinoma over time: a systematic review. Oncotarget. 2017 Feb 7; 8(6):10637-49. doi: 10.18632/oncotarget.12885.
9. Song J, Sun S, Dong F. et al. Predictive value of BRAFV600E mutation for lymph node metastasis in papillary thyroid cancer: A meta-analysis. Curr Med Sci. 2018;38:785-97. doi.org/10.1007/s11596-018-1945-7.
10. Yip L, Ferris RL. Clinical application of molecular testing of fine-needle aspiration specimens in thyroid nodules. Otolaryngol Clin North Am. 2014;47(4):557-71. doi:10.1016/j.otc.2014.04.003
11. Nair CG, Babu M, Biswas L. et al. Lack of association of B-type raf kinase V600E mutation with high-risk tumor features and adverse outcome in conventional and follicular variants of papillary thyroid carcinoma. Indian J Endocrinol Metab. 2017;21(2):329-33. doi:10.4103/ijem.IJEM_353_16
12. Paschke R, Cantara S, Crescenzi A. et al. European thyroid association guidelines regarding thyroid nodule molecular fine-needle aspiration cytology diagnostics. Eur Thyroid J. 2017;6:115-29. doi: 10.1159/000468519.
13. Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP. et al. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96:3390-7. doi: 10.1210/jc.2011-1469.
14. Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW. et al. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. N Engl J Med. 2012;367:705-15. doi: 10.1056/NEJMoa1203208.
15. Nikiforova MN, Wald AI, Roy S, Durso MB, Nikiforov YE. Targeted nextgeneration sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2013;98:E1852-60. doi: 10.1210/jc.2013-2292
16. Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI. et al. Highly accurate diagnosis of cancer in thyroid nodules with follicular neoplasm/suspicious for a follicular neoplasm cytology by ThyroSeq v2 next-generation sequencing assay. Cancer. 2014;120:3627-34. doi: 10.1002/cncr.29038

РЕЗЮМЕ

Впровадження молекулярно-генетичного обстеження в діагностиці тиреоїдного раку: власне дослідження

О. П. Нечай, О. А. Товкай, В. О. Паламарчук, Н. І. Белемець, С. І. Ніколаєнко, О. В. Мазур, Д. М. Квітка, П. О. Ліщинський

Український науково-практичний центр ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України, Київ

Мета — дослідити значення мутацій *BRAFV600E, NRAS, KRAS, HRAS, RET/PTC (RET/PTC1* і *RER/PTC3*), *PAX8/PPARg* для розвитку та перебігу тиреоїдного раку, визначити значущу мутацію-предиктор.

Матеріали та методи. Відібрано та проаналізовано 63 історії хвороби пацієнтів, яким на доопераційному етапі проведено молекулярно-генетичне тестування (МГТ) утворень щитоподібної залози, а в подальшому — оперативне лікування в умовах хірургічного відділення Українського науково-практичного центру ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України. Середній вік хворих становив (41,0 ± 1,8) року. Чоловіків було 7, жінок — 56. Усім хворим проводили тонкоголкову аспіраційну пункційну біопсію вузлів щитоподібної залози за стандартною методикою з цитологічним висновком відповідно до системи Bethesda. Категорію Bethesda III виявлено у 3 (4,8 %) хворих, Bethesda IV — у 13 (20,6 %), Bethesda V — у 12 (19,0 %), Bethesda VI — у 35 (55,6 %). Патогенну мутацію визначили у 47 (74,6 %) хворих (перша група), з них у двох — по дві мутації. В 16 (25,4 %) випадках не виявлено патогенної мутації (друга група).

Результати. Генами, які траплялися найчастіше, були *BRAFV600E* — 35 (55,6 %), *NRAS* — 11 (17,5 %), *KRAS* — 3 (4,8 %). У разі встановлення діагнозу раку щитоподібної залози (РЩЗ) патогенні мутації виявлено у 38 (79,1 %) випадках. Мутацію гена *BRAFV600E* зареєстрували у разі цитологічного висновку Bethesda III—V у 28,9 % пацієнтів, у разі Bethesda VI —

у 77,1 %. Відповідно чутливість тесту була невисокою — 0,646, специфічність — 0,733. Велике значення прогностичної значущості позитивного результату (0,784—0,943) свідчило про ймовірність виявлення РЩЗ. Це припущення підтверджує величина критерію χ^2 з поправкою Йєтса (5,207, p = 0,023). Використання тесту на наявність гена *NRAS* для виявлення РЩЗ було неефективним (χ^2 = 0,009, p = 0,927). Частота виявлення РЩЗ у першій групі у разі Bethesda III—V була вищою, ніж у другій групі, але різниця не була статистично значущою. Агресивність РЩЗ у хворих першої групи з позитивним результатом МГТ не мала статистично значущих відмінностей від результатів, отриманих у другій групі (39,5 та 33,3 % відповідно).

Висновки. Застосування МГТ у 79,1 % випадках дало змогу виявити патогенні мутації генів *BRAFV600E, NRAS, KRAS*. Наявність цих генів у поєднанні з цитоморфологічним висновком Bethesda III—V не підвищила виявлення РЩЗ у досліджуваних хворих. Значущим предиктором серед досліджених генів-кандидатів для встановлення діагнозу РЩЗ був *BRAFV600E*, який спостерігався у 64,6 % випадках (прогностична значущість позитивного результату — 0,784—0,943). Виявлення патогенної мутації у хворих на РЩЗ не було пов'язане з агресивністю його перебігу.

Ключові слова: рак щитоподібної залози, молекулярно-генетичне тестування, ген.

РЕЗЮМЕ

Внедрение молекулярно-генетического обследования в диагностике тиреоидного рака: собственное исследование

А. П. Нечай, А. А. Товкай, В. А. Паламарчук, Н. И. Белемец, С. И. Николаенко, О. В. Мазур, Д. Н. Квитка, П. А. Лищинский

Украинский научно-практический центр эндокринной хирургии, трансплантации эндокринных органов и тканей МЗ Украины, Киев

Цель — исследовать значение мутаций *BRAFV600E, NRAS, KRAS, HRAS, RET / PTC (RET / PTC1* и *RER / PTC3), PAX8 / PPARg* для развития и течения тиреоидного рака, определить значимую мутацию-предиктор.

Материалы и методы. Отобрано и проанализировано 63 истории болезни пациентов, которым на дооперационном этапе проведено молекулярно-генетическое тестирование (МГТ) образований щитовидной железы, а в дальнейшем — оперативное лечение в условиях хирургического отделения Украинского научно-практического центра эндокринной хирургии, трансплантации эндокринных органов и тканей МЗ Украины. Средний возраст больных составил (41,0 ± 1,8) года. Мужчин было 7, женщин — 56. Всем больным проводили тонкоиголковую аспирационную пункционную биопсию узлов щитовидной железы по стандартной методике с цитологическим заключением в соответствии с системой Bethesda. Категорию Bethesda III выявлено у 3 (4,8%) больных, Bethesda IV — у 13 (20,6 %), Bethesda V — у 12 (19,0 %), Bethesda VI — у 35 (55,6 %). Патогенную мутацию определили в 47 (74,6 %) больных (первая группа), из них в двух — по две мутации. В 16 (25,4 %) случаях не обнаружено патогенной мутации (вторая группа).

Результаты. Генами, которые случались чаще, были *BRAFV600E* — 35 (55,6 %), *NRAS* — 11 (17,5 %), *KRAS* — 3 (4,8 %). В случае установления диагноза рака щитовидной железы (РЩЖ) патогенные мутации обнаружены у 38 (79,1 %) случаях. Мутацию гена *BRAFV600E* зарегистрировали в случае цитологического заключения Bethesda III—V в 28,9 % пациентов, в случае Bethesda VI — в 77,1 %. Соответственно чувствительность теста была невысокой — 0,646, специфичность — 0,733. Большое значение прогностической значимости положительного результата (0,784—0,943) свидетельствовало о вероятности обнаружения РЩЖ. Это предположение подтверждает величина критерия χ^2 с поправкой Йейтса (5,207, p = 0,023). Использование теста на наличие гена *NRAS* для выявления РЩЖ было неэффективным (χ^2 = 0,009, p = 0,927). Частота выявления РЩЖ в первой группе в случае Bethesda III—V была выше, чем во второй группе, но разница не была статистически значимой. Агрессивность РЩЖ у больных первой группы с положительным результатом МГТ не имела статистически значимых отличий от результатов, полученных во второй группе (39,5 и 33,3 % соответственно).

Выводы. Применение МГТ в 79,1 % случаях позволило выявить патогенные мутации генов *BRAFV600E, NRAS, KRAS*. Наличие этих генов в сочетании с цитоморфологическим выводом Bethesda III—V не повысило выявления РЩЖ в исследуемых больных. Значимым предиктором среди исследованных генов-кандидатов для установления диагноза РЩЖ был *BRAFV600E*, который наблюдался в 64,6 % случаях (прогностическая значимость положительного результата — 0,784—0,943). Выявление

патогенной мутации у больных РЩЖ не было связано с агрессивностью его течения.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, молекулярно-генетическое тестирование, ген.

ABSTRACT

Implementation of molecular genetic tests in the diagnostics of thyroid cancer: own research

O. P. Nechay, O. A. Tovkai, V. O. Palamarchuk, N. I. Belemets, S. I. Nikolayenko, O. V. Mazur, D. M. Kvitka, P. O. Lishchynsky

Ukrainian Scientific and Practical Center for Endocrine Surgery, Transplantation of Endocrine Organs and Tissues of the Ministry of Health of Ukraine, Kyiv

Aim — to investigate the significance of *BRAFV600E, NRAS, KRAS, HRAS, RET/PTC* (*RET/PTC1* and *RER/PTC3*), *PAX8/PPARg* mutations for the development and course of thyroid cancer with the determination of a significant predictor mutation.

Materials and methods. The analysis included 63 selected case histories of patients who, at the preoperative stage, underwent molecular genetic testing (MHT) of the thyroid gland (TG) masses and subsequently underwent surgical treatment in the surgical department of the Ukrainian Scientific and Practical Center for Endocrine Surgery, Transplantation of Endocrine Organs and Tissues. The average age of the patients was 41.0 ± 1.8 years; from them 7men and56women. All patients underwent fine-needle aspiration puncture biopsy(FNAB) of thyroid nodules according to the standard method followed by a cytological conclusion in accordance with the Bethesda system.The Bethesda III category was revealed in 3 patients (4.8 %), Bethesda IV — 13 patients (20.6 %), Bethesda V — 12 patients (19.0 %), Bethesda VI in 35 (55.6 %) patients. The pathogenic mutations were detected in 47 (74.6 %) patients (group 1), among them two mutations were simultaneously found in two subjects. In 16 cases (25.4 %), no pathogenic mutation was found at all (group 2).

Results. The genes that occurred most often were BRAFV600E — in 35 patients (55.6 %), *NRAS* — in 11 patients (17.5 %), *KRAS* — in 3 patients (4.8 %). In case of thyroid cancerdiagnosis, pathogenic mutations were found in 38 (79.1 %) subjects. The *BRAFV600E* gene mutation was observed when establishing a cytological conclusion classified as Bethesda III—V in 28.9 %, and in Bethesda V and in 77.1 %. Accordingly, the sensitivity of the test was low — 0.646, specificity — 0.733. The high prognostic significance of a positive result(PPV) value (from 0.784 to 0.943) indicated the likelihood of detecting thyroid cancer. This assumption confirms the calculation of the c-square criterion with the Yates correction, which is 5.207 (p = 0.023). The use of this test for the presence of the *NRAS* gene to detect thyroid cancer was ineffective, the value of the c -square criterion with Yates correction = 0.009 (p = 0.927). The incidence of thyroid cancer in group 1 in the cytological class Bethesda III—V was higher than in group 2, but it did not differ significantly between the groups. The aggressiveness of thyroid cancer in patients of group 1 with a positive MHT result did not have significant differences compared with the results obtained in group 2 (39.5 % and 33.3 %, respectively).

Conclusions. The use of the kit for the determination of MHTmade it possible to identify pathogenic mutations in the genes *BRAFV600E, NRAS, KRAS* in 79.1 % of cases. The presence of these genes in combination with the analysis of cytomorphological findings classified according to the Bethesda III—V system did not increase the detection of thyroid cancer in the studied patients. The *BRAFV600E* gene, which was observed in 64.6 % of cases (PPV from 0.784 to 0.943), was a significant predictor among the studied candidate genes for establishing the diagnosis of thyroid cancer. Detection of a pathogenic mutation in patients with thyroid cancer did not indicate in favour of its aggressive course.

Keywords: thyroid cancer, molecular genetic testing, gene.

Дата надходження до редакції 05.04.2021 р.
Дата рецензування 30.04.2021 р.
Дата підпису статті до друку 14.05.2021 р.