

Оригинальные исследования

Молекулярно-генетическая структура фолликулярно-клеточного рака щитовидной железы

Якушина В.Д.¹, Лернер Л.В.², Казубская Т.П.³,
Кондратьева Т.Т.³, Субраманиан С.^{4,5}, Лавров А.В.^{1,6}

¹ ФГБНУ “Медико-генетический научный центр”, Москва, Россия

² ООО “ПреМед”, Москва, Российская Федерация

³ ФГБНУ “Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина”, Москва, Россия

⁴ Евразийская федерация онкологии, Москва, Россия

⁵ АНО “Научно-образовательный центр “Евразийская онкологическая программа «ЕАФО»”, Москва, Россия

⁶ ФГБОУ ВО “Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова”, Москва, Россия

Рак щитовидной железы лидирует по частоте среди злокачественных новообразований эндокринной системы. В большинстве случаев опухолевые клетки имеют фолликулярно-клеточное происхождение. Диагностика рака основана на проведении цитологического анализа биоптатов узлов щитовидной железы, точность которого не превышает 80%. Это ведет как к ложноположительным, так и ложноотрицательным диагнозам и выбору неправильной тактики лечения. Выявление в биоптатах генетических и эпигенетических маркеров рака щитовидной железы позволит повысить точность диагноза. В данной статье описаны мутации, aberrантное метилирование ДНК и aberrантная экспрессия микроРНК, составляющие основу молекулярно-генетической структуры фолликулярно-клеточного рака щитовидной железы. Мутации, характерные для данного типа рака щитовидной железы, включают точковые, хромосомные перестройки и изменение числа копий генов. Помимо распространенных и хорошо описанных драйверных мутаций генов сигнальных путей MAPK, PI3K/Akt и Wnt, а также генов *TP53* и *TERT*, в данной работе приведены более редкие мутации, выявленные за последние два года. В статье также представлены примеры использования диагностических панелей, основанных на анализе молекулярно-генетических маркеров.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, папиллярный РЩЖ, фолликулярный РЩЖ, мутации, перестройки, метилирование ДНК, микроРНК, KRAS, KRAF, BRAF.

Molecular genetics of follicular cell thyroid carcinoma

Yakushina V.D.¹, Lerner L.V.², Kazubskaya T.P.³,
Kondrat'ieva T.T.³, Subramanian S.^{4,5}, Lavrov A.V.^{1,6}

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

² PreMed-European Technologies, Moscow, Russian Federation

³ N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation

⁴ Eurasian Federation of Oncology, Moscow, Russian Federation

⁵ EAFO Educational & Research Center, Moscow, Russian Federation

⁶ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Thyroid cancer is the most frequent endocrine malignancy. In the most cases thyroid cancer arises from follicular cells. Diagnosis of the cancer is based on the cytological analysis of fine needle aspiration biopsy of thyroid nodes. But the accuracy of the cytological diagnosis is about 80% that leads to the false positive and false negative cases and wrong strategy of treatment. Identification of genetic and epigenetic markers in the biopsies will allow to improve diagnostic accuracy. This article describes mutations, aberrant DNA methylation and abnormal microRNA expression constituting the core of molecular genetics of follicular cell thyroid cancer. The mutations given in the article includes point mutations, fusions and copy number variation. Besides frequent and well described driver mutations in genes of MAPK, PI3K/Akt and Wnt signaling pathways, as well as *TP53* and *TERT* genes, we introduce here less frequent mutations appeared in the literature during the past two years. In addition the article contains examples of diagnostic panels applying these markers.

Key words: thyroid cancer, PTC, FTC, mutations, fusions, DNA methylation, microRNA, KRAS, KRAF, BRAF.

Актуальность

Рак щитовидной железы (РЩЖ) составляет основную долю злокачественных новообразований эндокринной системы, количество вновь выявленных случаев неуклонно растет и за последние четыре десятилетия увеличилось в несколько раз [1].

Большинство опухолей, возникающих в щитовидной железе, имеют фолликулярно-клеточное происхождение, и только от 5 до 10%, обозначаемые как медуллярный рак щитовидной железы, имеют парафолликулярное (С-клеточное) происхождение [1]. Фолликулярно-клеточный РЩЖ в зависимости от патоморфогенеза опухоли подразделяют на следующие основные формы: дифференцированный фолликулярно-клеточный РЩЖ (ДФКРЩЖ), низкодифференцированный РЩЖ и недифференцированный, или анапластический, РЩЖ. Основная доля РЩЖ (65–85%) приходится на ДФКРЩЖ. Среди ДФКРЩЖ различают папиллярный РЩЖ (ПРЩЖ), составляющий 80% от всех случаев ДФКРЩЖ, и фолликулярный РЩЖ (ФРЩЖ), который встречается в 10–15% случаев [1, 2].

ДФКРЩЖ в основном имеет благоприятный прогноз, 5-летняя выживаемость составляет 95%, но 15% этого рака рано метастазирует и сопровождается относительно высокой смертностью. Наиболее агрессивным является анапластический РЩЖ, представляющий собой последнюю стадию опухолевой прогрессии. У пациентов с ДФКРЩЖ на поздних стадиях болезни, а также у пациентов с низкодифференцированным и анапластическим РЩЖ высок риск летального исхода [1]. При этом необходимо учитывать, что только 5% выявляемых узлов щитовидной железы оказываются злокачественными [3].

В настоящее время основным методом диагностики РЩЖ является цитологическое исследование материала, получаемого в результате тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) узла щитовидной железы. Однако, по данным Т.Т. Кондратьевой, точность цитологического диагноза значительно варьирует, составляя 86–92% [4, 5]. Метаанализ, проведенный М. Bongiovanni и соавт. (2012), показал, что частота “неопределенного” цитологического заключения может достигать 20–30% [6]. Согласно классификации Бетезда (Национальный институт рака, США) выделяют 3 типа цитологических “неопределенных” диагнозов: атипия неопределенного значения / фолликулярные изменения неопределенного значения (АНЗ/ФИНЗ) – Бетезда III; фолликулярная неоплазия / подозрение на фолликулярную неоплазию (ФН/ПФН) – Бетезда IV; подозрение на рак (ПР) – Бетезда V [6]. В случае АНЗ/ФИНЗ риск злокачественного характера узла оценивается от 5 до 15% и рекомендуется повторная ТАБ. Риск злока-

чественности при ФН/ПФН повышается до 15–30%, а при ПР – до 60–75%. В случае ФН/ПФН и ПР рекомендовано диагностическое удаление доли ЩЖ – гемитиреоидэктомия, а в случае ПР может быть выполнена тиреоидэктомия [6]. Согласно данным литературы, злокачественная форма узла подтверждается только для 10–40% случаев выполненной гемитиреоидэктомии [6]. В связи с этим для минимизации необоснованного применения гемитиреоидэктомии или тиреоидэктомии необходимо внедрение диагностических подходов, обладающих более высокой точностью дифференцирования злокачественных и доброкачественных изменений щитовидной железы. Данная задача может быть решена с помощью молекулярно-генетических маркеров.

Молекулярная генетика рака щитовидной железы

Молекулярно-генетические изменения при раке щитовидной железы преимущественно затрагивают MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) и PI3K/Akt/mTOR (phosphatidylinositol-3-kinase/Protein Kinase B/Mammalian target of rapamycin) – сигнальные пути, осуществляющие трансдукцию митогенных сигналов и регулирующие такие клеточные процессы как пролиферация, дифференцировка и жизнеспособность [2, 7].

Ключевыми и наиболее изученными событиями, приводящими к активации MAPK-сигнального пути, являются мутации в генах рецепторов (например, *RET* и *TRK*) и внутриклеточных сигнальных молекул (*BRAF* и *RAS*). Белок, кодируемый геном *RET*, является трансмембранной тирозинкиназой, функционирующей в качестве рецептора к семейству нейротрофических факторов роста. Связывание тирозинкиназных рецепторов с лигандами приводит к димеризации рецепторов, взаимному фосфорилированию по тирозину и запуску киназных каскадов [8]. Ген *BRAF* кодирует белок семейства серин-треониновых протеинкиназ RAF, являющихся центральными медиаторами, которые в димеризованном состоянии фосфорилируют и активируют MEK (Mitogen-activated protein kinase kinase) [8]. Гены семейства *RAS* (*HRAS*, *KRAS* и *NRAS*) кодируют высокомолекулярные G-белки (ГТФазы), расположенные на внутренней поверхности клеточной мембраны и участвующие в передаче сигнала от рецепторов факторов роста, активируя как MAPK-, так и PI3K/Akt/mTOR-сигнальные пути [7]. Таким образом, изменение активности генов *BRAF*, *RAS*, *RET* может приводить к конститутивной трансдукции сигналов, активирующих клеточную пролиферацию и ингибирующих гибель клеток. Мутации в перечисленных генах являются наиболее распространенным опу-

холь-инициирующим событием в ДФКРЩЖ, встречаются более чем в 70% случаев ПРЩЖ и связаны со специфическими клиническими, гистопатологическими и биологическими характеристиками опухолей [9].

В более редких случаях РЩЖ связан с дерегуляцией Р13К/Akt-сигнального пути в результате активирующих мутаций генов *PIK3CA* и *AKT1* или мутации негативного регулятора Р13К/Akt-сигнального пути *P TEN*, приводящей к потере его функции [7].

Патогенез рака щитовидной железы также может быть связан с другими сигнальными путями. Описаны мутации в гене *CTNNB1*, кодирующем β -катенин, который участвует в клеточной адгезии и регуляции Wnt-сигнального пути [10, 11]. Особенно важное значение в процессе злокачественной трансформации имеют мутации, ведущие к потере активности гена опухолевого супрессора *TP53*, который играет ключевую роль в регуляции клеточного цикла, или, напротив, повышению активности гена теломеразы *TERT*.

В молекулярно-генетической структуре причин рака щитовидной железы можно выделить следующие составляющие: мутации (точковые мутации, хромосомные перестройки и изменение числа повторов генов), паттерны aberrантного метилирования ДНК и aberrантную экспрессию микроРНК.

Точковые мутации

Точковые мутации в гене *BRAF* обнаруживаются, по данным разных авторов, в 40–60% ПРЩЖ (рис. 1) [12, 13, 14]. В исследовании, проведенном в рамках The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA), было показано, что мутации *BRAF* специфичны для классического и цилиндроклеточного вариантов ПРЩЖ [13]. Кроме того, мутации *BRAF* встречаются при анапластическом РЩЖ (частота встречаемости 30–45%) и низкодифференцированном РЩЖ (см. рис. 1) (20–40%) [1, 15]. Наиболее распространенной является миссенс-мутация киназного домена – V600E (замена валина в 600-м кодоне на глутамат – *BRAF*^{V600E}), составляющая 98% всех мутаций *BRAF* [12].

Второе место по частоте встречаемости в образцах ТАБ занимают мутации генов семейства *RAS*. Драйверные (вызывающие онкотрансформацию) точковые мутации в генах *RAS* обычно затрагивают кодоны 12, 10 и 61. Данная группа мутаций наблюдается в 10–20% ПРЩЖ, 40–50% ФРЩЖ и 20–40% низкодифференцированного и анапластического РЩЖ (см. рис. 1). При этом папиллярный рак щитовидной железы, несущий мутации *RAS*, как правило, относится к фолликулярному варианту (ФВПРЩЖ) [1, 9]. Наиболее распространенными при раке щитовидной железы являются мутации гена *NRAS*, реже

встречаются мутации *HRAS* и *KRAS*. Интересным является то, что при ПРЩЖ точковые мутации *RAS* являются взаимоисключающими с другими мутациями, такими как *BRAF*, *RET/PTC* и перестройками *TRK* [12], а при ФРЩЖ *RAS*-мутации взаимно исключают перестройки *PAX8-PPAR γ* [17]. Мутации *RAS* также часто обнаруживаются при фолликулярной аденоме [7].

Мутации генов Р13К/Akt-сигнального пути наиболее характерны для фолликулярных аденом, ФРЩЖ и анапластического РЩЖ. Активирующие мутации в гене *PIK3CA* обычно локализованы в экзонах 9 и 20 и наблюдаются в 6–13% ФРЩЖ и в 12–18% анапластического РЩЖ (см. рис. 1) [15, 17, 18]. Соматические мутации *P TEN* наблюдаются при ФРЩЖ (с частотой менее 10%) и анапластическом РЩЖ (с частотой 12–15%) (см. рис. 1) [7, 15, 17]. Кроме того, при метастатической форме рака щитовидной железы были описаны мутации *AKT1* [18].

В более агрессивных и метастазирующих формах рака щитовидной железы встречаются мутации в генах *TP53*, *TERT* и *CTNNB1* [7]. Точковые мутации гена *TP53* обнаруживаются в 50–80% анапластического РЩЖ, практически не встречаются в низкодифференцированном РЩЖ (около 8%) и крайне редко – в ДФКРЩЖ (см. рис. 1) [15, 19]. В последнее время были выявлены мутации в промоторном регионе гена *TERT*, которые не обнаруживаются в доброкачественных узлах щитовидной железы и ассоциированы с более агрессивным течением и неблагоприятным прогнозом [15, 20]. В исследовании, выполненном I. Landa и соавт. (2016), мутации *TERT* были выявлены в 73% случаев анапластического и 40% случаев низкодифференцированного РЩЖ (см. рис. 1) [15]. По данным исследования, выполненного в рамках TCGA, мутации *TERT* наблюдаются в 12% случаев ПРЩЖ, но являются субклональными [13]. Другой ген, мутации которого характерны для анапластического РЩЖ, – *CTNNB1*. Точковые мутации в экзоне 3 гена *CTNNB1* могут встречаться более чем в 60% случаев анапластического РЩЖ, а также в низкодифференцированном РЩЖ (см. рис. 1) [10, 21].

Помимо приведенных выше хорошо охарактеризованных мутаций, накапливаются данные о других, более редких мутациях. Исследователями TCGA был дополнен список известных драйверных мутаций ПРЩЖ точковыми мутациями генов *EIF1AX*, *PPM1D*, *CHEK2* и др., а также предположительно драйверными мутациями генов *APC*, *ATM*, *NF1*, *SPOP*, *MLL* и др. [13]. Мутации гена *EIF1AX*, кодирующего фактор инициации трансляции eIF1A, были также выявлены при анапластическом РЩЖ и доброкачественных изменениях [22, 23]. Мутации гена опухолевого супрессора *CHEK2* при ПРЩЖ были

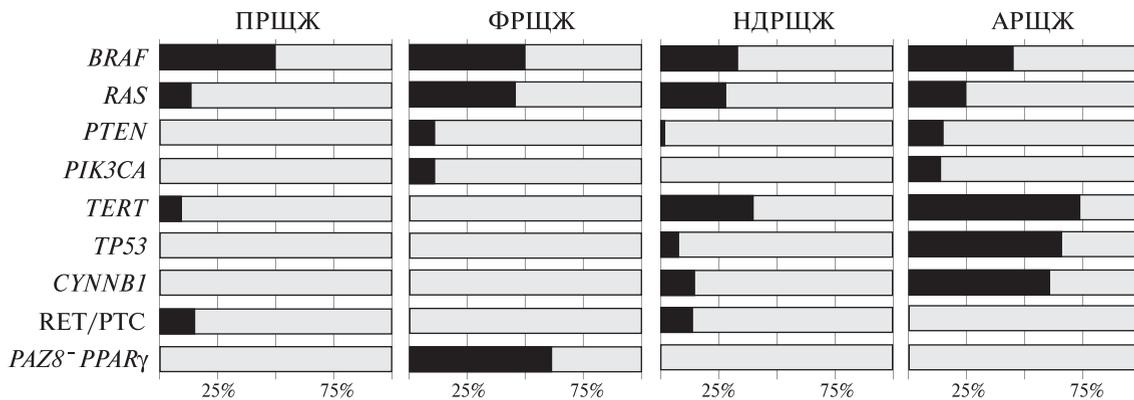


Рис. 1. Частота мутаций при различных типах рака щитовидной железы.

подтверждены другими авторами [23, 25]. Сотрудниками Питтсбургского университета были описаны мутации генов *TSHR* и *GNAS* [26]. На основании того, что изолированные мутации *GNAS* наблюдались только в доброкачественных узлах, авторами было сделано предположение, что такие мутации могут рассматриваться в качестве маркеров доброкачественного характера изменений в щитовидной железе [26].

Данная статья рассматривает соматические мутации, наблюдаемые при фолликулярно-клеточном РЩЖ, вместе с тем большое значение в молекулярно-генетической структуре рака щитовидной железы имеют мутации гена *RET*, характерные для медуллярного РЩЖ. Мутация *RET* С634 наблюдается в 90% случаев синдрома множественных эндокринных неоплазий типа 2А, мутация М918Т обнаруживается в 20–50% спорадического медуллярного РЩЖ и более чем в 90% случаев синдрома множественных эндокринных неоплазий типа 2В [27, 28].

Хромосомные перестройки

Наиболее распространенными хромосомными перестройками при раке щитовидной железы являются мутации гена *RET*. Такие перестройки сопровождаются образованием химерного гена, который содержит участок гена *RET*, кодирующий тирозинкиназный домен белка, соединенный с активным промотором другого гена (гена-партнера). В результате кодируется мутантный рецептор, что приводит к лиганд-независимой димеризации рецептора и хронической стимуляции MAPK-сигнального каскада [29].

Хромосомные перестройки *RET* (обозначаемые как RET/PTC) специфичны преимущественно для классического типа ПРЩЖ, однако могут быть обнаружены и при доброкачественной фолликулярной аденоме [30]. Перестройки RET/PTC встречаются в 10–20% случаев ПРЩЖ (см. рис. 1) и преобладают

в случаях радиационного облучения (50–80%), а также у детей и лиц молодого возраста (40–70%) [31].

Описано несколько типов перестроек с участием *RET*. Основную долю (60–70%) мутаций RET/PTC составляет RET/PTC1 (*CCDC6-RET*), при которой *RET* сливается с геном *CCDC6* [1]. От 20 до 30% мутаций RET/PTC приходится на RET/PTC3 (*NCOA4-RET*) [1, 32]. Указанные перестройки RET/PTC являются внутривхромосомными, то есть оба гена располагаются на 10-й хромосоме, парацентрическими инверсиями (разрывы находятся на одном, длинном плече хромосомы) [33]. Другие известные перестройки RET/PTC являются межхромосомными, к ним относятся мутации с генами *PRKARIA* (RET/PTC2), *NCOA4* (RET/PTC4), *GOLGA5* (RET/PTC5), *TRIM24* (RET/PTC6), *TRIM33* (RET/PTC7) и *KTN1* (RET/PTC8) [29].

Для ФРЩЖ характерна перестройка *PAX8-PPARγ*, частота встречаемости которой при данном типе рака щитовидной железы достигает 60% (см. рис. 1) [2]. Перестройка *PAX8-PPARγ* заключается в слиянии гена *PAX8*, кодирующего транскрипционный фактор, и гена *PPARγ*, кодирующего рецептор активаторов пролиферации пероксисом. Данная перестройка, помимо ФРЩЖ, может быть обнаружена в низком проценте случаев в клетках фолликулярной аденомы и ФВПРЩЖ [17, 34, 35].

Для РЩЖ также характерна перестройка *AKAP9-BRAF*, при которой первые 8 экзонов гена *AKAP9* (A-kinase anchor protein 9) сливаются с С-концом (экзоны 9–18) гена *BRAF*, что приводит к конститутивной активности киназы BRAF. Интересным является то, что указанная мутация наблюдается в 11% случаев РЩЖ, ассоциированных с воздействием ионизирующего излучения, и менее чем в 1% спорадических опухолей [36]. Описаны перестройки генов *NTRK1* и *NTRK3* (*ETV6-NTRK3* и *RBPMS-NTRK3*), которые редко встречаются при ПРЩЖ (1–5%)

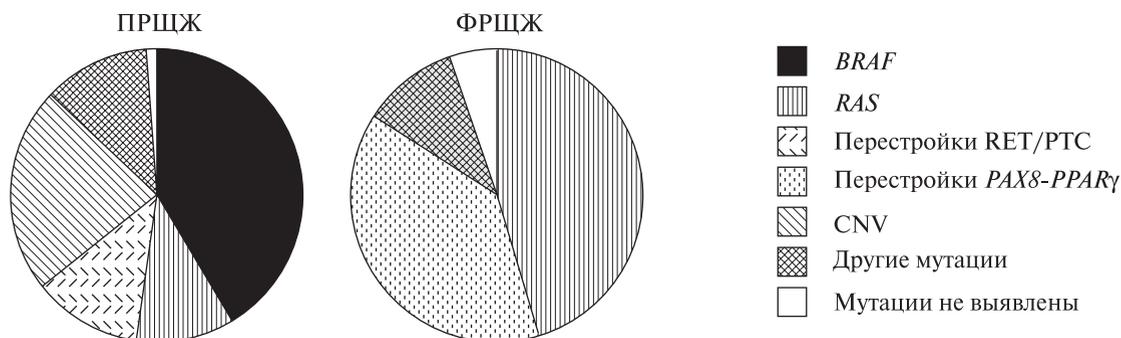


Рис. 2. Молекулярно-генетическая структура рака щитовидной железы.

и более часто встречаются среди опухолей, ассоциированных с радиационным воздействием. Так, перестройка *ETV6-NTRK3* была выявлена в 14,5% случаев РЩЖ, ассоциированных с воздействием радиации [37].

Различные хромосомные перестройки были обнаружены при низкодифференцированном РЩЖ (частота встречаемости 14%), но отсутствовали при анапластическом РЩЖ. Перестройки, обнаруженные при низкодифференцированном РЩЖ, включали RET/PTC (*RET-CCDC6* и *RET-NCOA4*), *PAX8-PPARG*, *NUT-BRD4* и перестройки гена *ALK* [15].

Кроме того, согласно базе данных COSMIC, можно выделить следующие перестройки: *STRN-ALK*, *EML4-ALK*, *CRTC1-MAML2*, *ERC1-RET* – как наиболее распространенные среди редких (встречались более чем в 1 образце опухоли щитовидной железы) [38].

Изменение числа копий (CNV)

По данным TCGA, CNV-мутации были обнаружены в 27,2% ПРЩЖ. Примечательно, что в данных образцах, помимо CNV, не было обнаружено других драйверных мутаций. На основании этого авторы предположили, что CNV также могут быть драйверными при ПРЩЖ. Необходимо заметить, что CNV-мутации характерны для фолликулярного подтипа ПРЩЖ, а не для классического [13].

Наиболее распространенным типом CNV-мутаций при ПРЩЖ является делеция короткого плеча хромосомы 22, несущего гены опухолевых супрессоров *NF2* и *CHEK2* (SCNA (somatic copy-number alteration) – 22q-del) [39, 13]. Кроме того, при ПРЩЖ описаны другие CNV-мутации: фокальная делеция 9q21.3-q32 и амплификация короткого плеча хромосомы 1 (1q-amp) – предположительно, являющиеся маркерами агрессивного течения ПРЩЖ [39]. Исследователями из TCGA была обнаружена мутация 1q-amp при цилиндроклеточном подтипе ПРЩЖ и была подтверждена ассоциация данной

мутации с агрессивностью течения. Помимо вышеперечисленных авторами были описаны другие CNV-мутации, в том числе 7q34 и 10q23.31 [13].

Сотрудники Университета Джона Хопкинса исследовали CNV-мутации в клетках фолликулярной аденомы, а также папиллярного рака, классического и фолликулярного подтипов, и выявили CNV, специфические для фолликулярной аденомы (амплификация 7p, 7q, 12p, 12q, 17q, 20q13.12). Анализ CNV 10 генов, расположенных на 12-й хромосоме, позволил авторам дифференцировать доброкачественные изменения от ПРЩЖ и ФВПРЩЖ в 90% случаев [40].

В литературе представлены данные об увеличении числа копий генов рецепторных тирозинкиназ (*EGFR*, *PDGFR2*, *VEGFR2* и *KIT*) и медиаторов PI3K/АКТ-сигнального пути (*PIK3CA*, *PIK3CB*, *PDPK1*, *AKT1* и *AKT2*). Данные изменения, хотя могут встречаться при дифференцированных формах рака щитовидной железы (ПРЩЖ и ФРЩЖ), преобладают при анапластическом РЩЖ, что может свидетельствовать об их связи с прогрессией и/или с агрессивной формой опухолевого заболевания [16, 17, 40].

Суммируя вышесказанное, основной вклад в молекулярно-генетическую структуру ПРЩЖ вносят мутации генов MAPK-сигнального пути (рис. 2). Классический и цилиндроклеточный (tall cell variant) подтипы ПРЩЖ характеризуются мутацией *BRAF*^{V600E}, а фолликулярный – мутациями генов *RAS*. Кроме того, в значительной доле случаев ПРЩЖ выявляется перестройка RET/PTC и изменения числа копий генов, преимущественно 22q-del. Известные ранее драйверные мутации выявляются в 75% случаев ПРЩЖ. Исследование, выполненное в рамках TCGA, позволило расширить список драйверных мутаций и повысить количество случаев ПРЩЖ с выявленными мутациями до 98,8% (см. рис. 2). Для ФРЩЖ характерны мутации *RAS*, перестройки *PAX8-PPARγ*, а также мутации генов PI3K/Акт-сигнального пути, таких как *PTEN* и *PIK3CA* (см. рис. 2). При низкодифференцированном и анапластическом РЩЖ

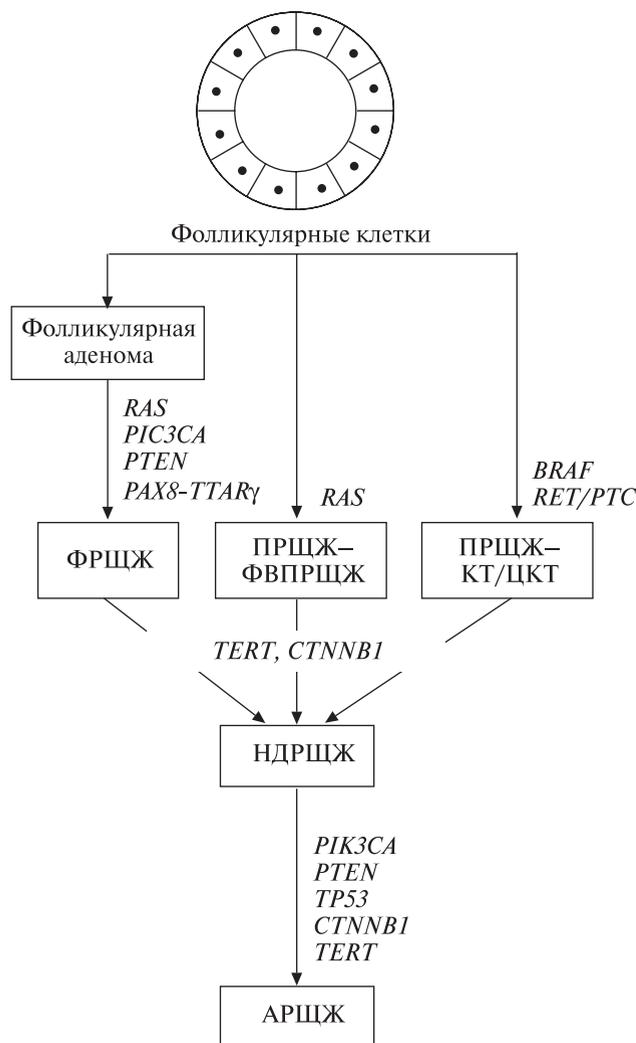


Рис. 3. Последовательная модель прогрессии рака щитовидной железы. ПРЩЖ – папиллярный рак щитовидной железы; ФРЩЖ – фолликулярный рак щитовидной железы; ФВПРЩЖ – фолликулярный вариант папиллярного рака щитовидной железы; КТ – классический тип; ЦКТ – цилиндроклеточный тип; НДРЩЖ – низкодифференцированный рак щитовидной железы; АРЩЖ – анапластический рак щитовидной железы.

могут быть выявлены мутации генов *BRAF* и *RAS*, как и при дифференцированных формах, а также мутации *TERT*, связанные с агрессивностью течения и прогрессированием рака (рис. 3). В отличие от анапластического РЩЖ при низкодифференцированном РЩЖ распространены хромосомные перестройки. Анапластический РЩЖ считается наиболее агрессивной формой РЩЖ, происходящей из фолликулярных клеток, что согласуется с высокой частотой мутаций генов *TP53* и *CTNNB1*, кроме того, при анапластическом РЩЖ часто выявляются мутации *PIK3CA* и *PTEN* (см. рис. 3).

Аберрантное метилирование ДНК

Помимо генетических факторов в молекулярно-генетической структуре РЩЖ все больше внимания уделяется факторам эпигенетической регуляции, включающим метилирование ДНК, экспрессионный профиль микроРНК и ковалентную модификацию гистонов [40–42].

Метилирование ДНК заключается в модификации, как правило, цитозина в составе CpG динуклеотидов. Метилирование/деметилирование CpG островков (участки ДНК, богатые CpG динуклеотидами) в промоторных регионах приводит к ингибированию или усилению экспрессии генов соответственно [43].

К настоящему времени при ПРЩЖ описано гиперметилирование ряда генов, в том числе опухолевых супрессоров (*RARB*, *RASSF1A*, *TIMP3*, *SLC5A8*, *DAPK*), а также генов *CDH1*, *ATM* и др. В ряде случаев гиперметилирование было ассоциировано с наличием драйверных мутаций в генах *BRAF*, *RAS*, а также перестроек *RET/PTC* [41, 44]. Полногеномное исследование паттернов метилирования при папиллярном раке щитовидной железы, выполненное R.J. Ellis и соавт. (2014), позволило установить, что данный тип РЩЖ сопровождается изменением метилирования в 2837 сайтах, с преобладанием процессов гипометилирования (2585 сайтов против 252 сайтов гиперметилирования). При этом результаты различались в зависимости от гистологического подтипа: фолликулярный вариант ПРЩЖ характеризовался слабым изменением паттернов метилирования, в то время как для классического типа ПРЩЖ было характерно изменение в большом числе сайтов (2837 сайтов – при первичной форме, 3819 – при рецидивирующих формах) [45].

При ФРЩЖ и анапластическом РЩЖ достаточно распространено метилирование промотора *PTEN*, достигающее наибольшего значения при анапластическом РЩЖ [46]. Метилирование *PTEN* согласуется с потерей экспрессии белка *PTEN* при данных типах рака щитовидной железы и ассоциировано с мутациями генов *PI3K/Akt*-сигнального пути [46].

Было показано, что наиболее значимые изменения паттернов метилирования характерны для низкодифференцированной формы рака щитовидной железы [47].

Аберрантная экспрессия микроРНК

Нарушение регуляции экспрессии генов в процессе злокачественной трансформации фолликулярных клеток щитовидной железы, как и при других онкологических заболеваниях, может быть связано с изменением набора микроРНК (miRNA). МикроРНК представляют собой короткие (~22 п.н.) неко-

дирующие РНК, способные осуществлять посттранскрипционную репрессию генов за счет интерференции с целевыми РНК [48].

К настоящему времени выявлен ряд микроРНК, дифференциально экспрессирующихся при РЩЖ. При этом экспрессионные профили микроРНК в клетках доброкачественных изменений, папиллярного, фолликулярного рака и других гистологических типов различны, что имеет важное значение для диагностики [1, 49]. Для ПРЩЖ установлено значительное повышение экспрессии следующих микроРНК: miR-146b, miR-221, miR-222, miR-181b, miR-155 и miR-224 [49, 50]. Предполагаемыми мишенями данных микроРНК являются ген ингибитора циклин-зависимой киназы 1В (*CDKN1B*) и ген рецептора тиреоидного гормона (*THRβ*) [51, 52]. Примечательно, что степень увеличения экспрессии некоторых из перечисленных микроРНК в трансформированных клетках зависела от типа драйверных мутаций [49].

При ФРЩЖ было выявлено изменение экспрессии miR-197, miR-346, miR-155 и miR-224 [49], а при анапластическом раке — miR-30d, miR-125b, miR-26a и miR-30a-5p [40].

Использование генетических маркеров в диагностике рака щитовидной железы

Перечисленные выше молекулярно-генетические маркеры лежат в основе разработки диагностических панелей. Целью разработки таких панелей является достижение максимальных значений чувствительности, специфичности, отрицательного предсказательного значения (negative predictive value, ОПЗ) и положительного предсказательного значения (positive predictive value, ППЗ). ППЗ показывает, сколько пациентов действительно имеет рак, если тест определил его наличие, а ОПЗ показывает, сколько пациентов имеет истинно доброкачественные изменения среди тех, у кого тест не обнаружил рака.

Панель, включающая мутации 7 (или 8) генов (*BRAF*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *RET/PTC1*, *RET/PTC3*, *PAX8/PPARγ*, (*TRK*)), в проспективных исследованиях показала высокие значения специфичности и ППЗ. ОПЗ такой панели для АНЗ/ФИНЗ (атипия неопределенного значения / фолликулярные изменения неопределенного значения — Бетезда III) составило 94%, в результате чего может быть исключена необходимость хирургического вмешательства, так как риск злокачественности для АНЗ/ФИНЗ (Бетезда III) не превышает 15% [53]. Отрицательный результат при использовании панели из 7 генов соответствует снижению риска злокачественности с 27 до

14% для ФН/ПФН (Бетезда IV) и с 54 до 28% для ПР (Бетезда V) [53], что позволяет рекомендовать в таком случае диагностическую гемитиреоидэктомию вместо тиреоидэктомии. L. Yip и соавт. (2014) показали, что использование такой панели в дополнение к цитологическому анализу позволяет снизить частоту двухэтапного хирургического вмешательства (первоначальная гемитиреоидэктомию с последующей тиреоидэктомией) [54]. В педиатрической практике, где результаты ТАБ оказываются “неопределенными” у 38% пациентов [55], использование такой панели позволило исключить повторное хирургическое вмешательство у 60% детей [56]. Выявление мутаций *RAS* имеет более низкое ППЗ (74–87%) по сравнению с мутациями *BRAF* или перестройками *RET/PTC* и *PAX8/PPARγ* [53]. Однако было показано, что доброкачественные *RAS*-позитивные узлы относятся к фолликулярным аденомам — опухолям, которые, как предполагается, представляют собой предраковые изменения, способные переходить в злокачественную форму [57, 58].

Высокопроизводительные методы секвенирования позволяют расширить панель оцениваемых генетических маркеров. Панель ThyroSeq, предложенная сотрудниками Питтсбургского университета, включает оценку точковых мутаций 14 генов и 38 fusion-мутаций. Использование данной панели в случае “неопределенного” цитологического диагноза (ФН/ПФН) позволяет повысить ППЗ до 83%, а ОПЗ до 96% [53].

Значимые результаты достигнуты с использованием панелей, основанных на дифференциальной экспрессии микроРНК. Панель из 4 микроРНК (miR-222, miR-328, miR-197, miR-21) позволила дифференцировать доброкачественные и злокачественные изменения с предсказательной точностью 90% [59]. В качестве примеров коммерческих панелей, представленных на рынке, можно привести RosettaGX Reveal™ (Rosetta Genomics) и ThyraMIR™ (Interpace Diagnostics). Заявленные ОПЗ и чувствительность панели RosettaGX Reveal™ составляют 99 и 98% соответственно [60].

Заключение

Таким образом, к настоящему времени хорошо изучена молекулярно-генетическая структура рака щитовидной железы и выявлены основные драйверные мутации. Однако разнообразие их типов, большое число и отсутствие мутаций с доминирующей частотой долгое время не позволяли проводить диагностику РЩЖ с помощью молекулярно-генетических методов. Внедрение высокопроизводительных методов секвенирования в клиническую практику позволило разработать диагностические системы,

учитывающие большинство известных мутаций при РЩЖ, что существенно улучшает точность диагностики и позволяет снизить количество как ложноположительных, так и ложноотрицательных заключений по итогам биопсии узлов щитовидной железы.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, грант № 442ГС2/9119.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(3):184-199. doi: 10.1038/nrc3431.
- Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(5):569-577. doi: 10.1043/2010-0664-RAIR.1.
- Brito JP, Gionfriddo M, Morris JC, Montori VM. Overdiagnosis of thyroid cancer and Graves' disease. *Thyroid*. 2014;24(2):402-403. doi: 10.1089/thy.2013.0425.
- Кондратьева Т.Т., Павловская А.И., Врублевская Е.А. Морфологическая диагностика узловых образований щитовидной железы // Практическая онкология. – 2007. – Т. 8. – №1. – С. 9–17. [Kondrat'eva T.T., Pavlovskaya A.I., Vrublevskaya E.A. Morfologicheskaya diagnostika uzlovykh obrazovaniy shchitovidnoy zhelezy // *Prakticheskaya onkologiya*. 2007;8(1):9-17. (in Russ.)]
- Кондратьева Т.Т. Цитологические аспекты дифференциальной диагностики в области головы и шеи: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – Москва; 1993. – 48 с. [Kondrat'eva T.T. *Tsitologicheskie aspekty differentsial'noy diagnostiki v oblasti golovy i shei*. [Dissertation]. Moscow; 1993. 48 p. (in Russ.)]
- Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC, et al. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis. *Acta Cytol*. 2012;56(4):333-339. doi: 10.1159/000339959.
- Hsiao SJ, Nikiforov YE. Molecular approaches to thyroid cancer diagnosis. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(5):T301-313. doi: 10.1530/ERC-14-0166.
- Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*. 2013;513(1):1-13. doi: 10.1016/j.gene.2012.10.033.
- Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(2):216-222.
- Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, et al. β -Catenin dysregulation in thyroid neoplasms. *Am J Pathol*. 2001;158(3):987-996. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64045-x.
- Sastre-Perona A, Santisteban P. Role of the Wnt pathway in thyroid cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3. doi: 10.3389/fendo.2012.00031.
- Bounacer A, Wicker R, Caillou B, et al. High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene*. 1997;15(11):1263-1273. doi: 10.1038/sj.onc.1200206.
- Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell*. 2014;159(3):676-690. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.050.
- Li F, Chen G, Sheng C, et al. BRAFV600E mutation in papillary thyroid microcarcinoma: a meta-analysis. *Endocrine Related Cancer*. 2015;22(2):159-168. doi: 10.1530/erc-14-0531.
- Landa I, Ibrahimipasic T, Boucai L, et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J Clin Invest*. 2016;126(3):1052-1066. doi: 10.1172/JCI85271.
- Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(5):2318-2326. doi: 10.1210/jc.2002-021907.
- Liu Z, Hou P, Ji M, et al. Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(8):3106-3116. doi: 10.1210/jc.2008-0273.
- Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, et al. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res*. 2009;69(11):4885-4893. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0727.
- Dobashi Y, Sugimura H, Sakamoto A, et al. Stepwise participation of p53 gene mutation during dedifferentiation of human thyroid carcinomas. *Diagn Mol Pathol*. 1994;3(1):9-14.
- Melo M, Da Rocha AG, Vinagre J, et al. TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(5):E754-E765. doi: 10.1210/jc.2013-3734.
- Kurihara T, Ikeda S, Ishizaki Y, et al. Immunohistochemical and sequencing analyses of the Wnt signaling components in Japanese anaplastic thyroid cancers. *Thyroid*. 2004;14(12):1020-1029. doi: 10.1089/thy.2004.14.1020.
- Kunstman JW, Juhlin CC, Goh G, et al. Characterization of the mutational landscape of anaplastic thyroid cancer via whole-exome sequencing. *Hum Mol Genet*. 2015;24(8):2318-2329. doi: 10.1093/hmg/ddu749.
- Karunamurthy A, Panebianco F, J Hsiao S, et al. Prevalence and phenotypic correlations of EIF1AX mutations in thyroid nodules. *Endocr Relat Cancer*. 2016;23(4):295-301. doi: 10.1530/erc-16-0043.
- Kaczmarek-Ryś M, Ziemnicka K, Hryhorowicz ST, et al. The c.470 T>C CHEK2 missense variant increases the risk of differentiated thyroid carcinoma in the Great Poland population. *Hered Cancer Clin Pract*. 2015;13(1). doi: 10.1186/s13053-015-0030-5.
- Siołek M, Cybulski C, Gašior-Perczak D, et al. CHEK2 mutations and the risk of papillary thyroid cancer. *Int J Cancer*. 2015;137(3):548-552. doi: 10.1002/ijc.29426.
- Nikiforova MN, Wald AI, Roy S, et al. Targeted Next-Generation Sequencing Panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *J Clin Endocr Metab*. 2013;98(11):E1852-E1860. doi: 10.1210/jc.2013-2292.
- Espinosa A, Gilbert J, Fagin J. RET C634 mutations in thyroid cancer [Internet]. My cancer genome. Available on URL: <https://www.mycancergenome.org/content/disease/thyroid-cancer/ret/126/> (Updated October 20, 2014).

28. Espinosa A, Gilbert J, Fagin J. RET M918T mutations in thyroid cancer [Internet]. My cancer genome. Available on URL: <https://www.mycancergenome.org/content/disease/thyroid-cancer/ret/128/> (Updated October 20, 2014).
29. Menicali E, Moretti S, Voce P, et al. Intracellular signal transduction and modification of the tumor microenvironment induced by RET/PTCs in papillary thyroid carcinoma. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3. doi: 10.3389/fendo.2012.00067.
30. Marotta V, Guerra A, Sapio MR, Vitale M. RET/PTC rearrangement in benign and malignant thyroid diseases: a clinical standpoint. *Eur J Endocrinol*. 2011;165(4):499-507. doi: 10.1530/eje-11-0499.
31. Ciampi R, Nikiforov YE. Minireview: RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology*. 2007;148(3):936-941. doi: 10.1210/en.2006-0921.
32. Mochizuki K, Kondo T, Nakazawa T, et al. RET rearrangements and BRAF mutation in undifferentiated thyroid carcinomas having papillary carcinoma components. *Histopathology*. 2010;57(3):444-450. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03646.x.
33. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell*. 1985;42(2):581-588. doi: 10.1016/0092-8674(85)90115-1.
34. Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, et al. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor γ rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocr Metab*. 2003;88(9):4440-4445. doi: 10.1210/jc.2002-021690.
35. Marques AR, Espadinha C, Frias MJ, et al. Underexpression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ in PAX8/PPAR γ -negative thyroid tumours. *Br J Cancer*. 2004. doi: 10.1038/sj.bjc.6601989.
36. Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, et al. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest*. 2005;115(1):94-101. doi: 10.1172/jci23237.
37. Leeman-Neill RJ, Kelly LM, Liu P, et al. ETV6-NTRK3 is a common chromosomal rearrangement in radiation-associated thyroid cancer. *Cancer*. 2014;120(6):799-807. doi: 10.1002/cncr.28484.
38. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res*. 2014;43(D1):D805-D811. doi: 10.1093/nar/gku1075.
39. Kjellman P, Lagercrantz S, Höög A, et al. Gain of 1q and loss of 9q21.3-q32 are associated with a less favorable prognosis in papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001;32(1):43-49. doi: 10.1002/gcc.1165.
40. Liu Y, Cope L, Sun W, et al. DNA copy number variations characterize benign and malignant thyroid tumors. *J Clin Endocr Metab*. 2013;98(3):E558-E566. doi: 10.1210/jc.2012-3113.
41. Brehar AC, Brehar FM, Bulgar AC, Dumitrache C. Genetic and epigenetic alterations in differentiated thyroid carcinoma. *J Med Life*. 2013;6(4):403-408. PMC4034295.
42. Faam B, Ghaffari MA, Ghadiri A, Azizi F. Epigenetic modifications in human thyroid cancer. *Biomed Rep*. 2015;3(1):3-8. doi: 10.3892/br.2014.375.
43. Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H. DNA methylation in cancer and aging. *Cancer Res*. 2016;76(12):3446-3450. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3278.
44. Hou P, Liu D, Xing M. Genome-wide alterations in gene methylation by the BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18(6):687-697. doi: 10.1530/ERC-11-0212.
45. Ellis RJ, Wang Y, Stevenson HS, et al. Genome-wide methylation patterns in papillary thyroid cancer are distinct based on histological subtype and tumor genotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(2):E329-337. doi: 10.1210/jc.2013-2749.
46. Hou P, Ji M, Xing M. Association of PTEN gene methylation with genetic alterations in the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in thyroid tumors. *Cancer*. 2008;113(9):2440-2447. doi: 10.1002/cncr.23869.
47. Schagdarsurengin U, Gimm O, Dralle H, et al. CpG island methylation of tumor-related promoters occurs preferentially in undifferentiated carcinoma. *Thyroid*. 2006;16(7):633-642. doi: 10.1089/thy.2006.16.633.
48. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015;4. doi: 10.7554/eLife.05005.
49. Nikiforova MN, Chiosea SI, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiles in thyroid tumors. *Endocr Pathol*. 2009;20(2):85-91. doi: 10.1007/s12022-009-9069-z.
50. Pallante P, Visone R, Ferracin M, et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(2):497-508. doi: 10.1677/erc.1.01209.
51. Visone R, Russo L, Pallante P, et al. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(3):791-798. doi: 10.1677/ERC-07-0129.
52. Jazdzewski K, Boguslawska J, Jendrzewski J, et al. Thyroid hormone receptor beta (THRB) is a major target gene for microRNAs deregulated in papillary thyroid carcinoma (PTC). *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(3):E546-553. doi: 10.1210/jc.2010-1594.
53. 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(23):3627-3634. doi: 10.1002/cncr.29038.
54. Yip L, Wharry LI, Armstrong MJ, et al. A clinical algorithm for fine-needle aspiration molecular testing effectively guides the appropriate extent of initial thyroidectomy. *Ann Surg*. 2014;260(1):163-168. doi: 10.1097/SLA.0000000000000215.
55. Monaco SE, Pantanowitz L, Khalbuss WE, et al. Cytomorphological and molecular genetic findings in pediatric thyroid fine-needle aspiration. *Cancer Cytopathol*. 2012;120(5):342-350. doi: 10.1002/cncy.21199.
56. Buryk MA, Monaco SE, Witchel SF, et al. Preoperative cytology with molecular analysis to help guide surgery for pediatric thyroid nodules. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2013;77(10):1697-1700. doi: 10.1016/j.ijporl.2013.07.029.
57. Gupta N, Dasyam AK, Carty SE, et al. RAS mutations in thyroid FNA specimens are highly predictive of predominantly low-risk follicular-pattern cancers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(5):E914-922. doi: 10.1210/jc.2012-3396.
58. Puziello A, Guerra A, Murino A, et al. Benign thyroid nodules with RAS mutation grow faster. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016;84(5):736-740. doi: 10.1111/cen.12875.

59. Keutgen XM, Filicori F, Crowley MJ, et al. A panel of four miRNAs accurately differentiates malignant from benign indeterminate thyroid lesions on fine needle aspiration. *Clin Cancer Res.* 2012;18(7):2032-2038. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2487.
60. Benjamin H, Schnitzer-Perlman T, Shtabsky A, et al. Analytical validity of a microRNA-based assay for diagnosing indeterminate thyroid FNA smears from routinely prepared cytology slides. *Cancer Cytopathol.* 2016. doi: 10.1002/cncy.21731.

Якушина Валентина Дмитриевна – к.м.н., научный сотрудник ФГБНУ “Медико-генетический научный центр”, Москва, Россия. **Лернер Лариса Владимировна** – врач-эндокринолог, ООО “ПреМед” (Научно-клинический центр “ПреМед – европейские технологии”), Москва, Россия. **Казубская Татьяна Павловна** – д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клинической онкогенетики, НИИ клинической онкологии, ФГБУ “Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина”, Москва, Россия. **Кондратьева Татьяна Тихоновна** – д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клинической цитологии, НИИ клинической онкологии, ФГБУ “Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина”, Москва, Россия. **Субраманиан Сомасундарам** – хирург-онколог, основатель и директор, Евразийская федерация онкологии и Автономная некоммерческая организация “Научно-образовательный центр “Евразийская онкологическая программа «ЕАФО»”, Москва, Россия. **Лавров Александр Вячеславович** – к.м.н., заведующий лабораторией мутагенеза ФГБНУ “Медико-генетический научный центр”, Москва, Россия.

Для корреспонденции: Якушина Валентина Дмитриевна – vdyakushina@gmail.com. Тел.: 8-968-953-06-04.