

*П.О. Румянцев¹, П.А. Никифорович¹, А.А. Полозников², А.Ю. Абросимов¹, В.А. Саенко³,
Т.И. Розунович³, А.А. Будзин^{4,5}, А.П. Поляков², А.Д. Каприн², И.И. Дедов^{1,5}*

Мутация $BRAF^{V600E}$ при папиллярном раке щитовидной железы. Клинические и методологические аспекты

¹ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, Москва,

²ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва,

³Университет Нагасаки, институт радиоиндуцированных заболеваний, Сакамото, Нагасаки, Япония

⁴ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН,
Москва,

⁵ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва

Мутация $BRAF^{V600E}$ специфична для папиллярного рака щитовидной железы (ПРЩЖ) и определяется в опухолевых клетках в 40-70% случаев. Патогномоничность мутации $BRAF^{V600E}$ ПРЩЖ позволяет определять случаи анапластической карциномы, трансформировавшейся из папиллярной карциномы, составляющие до половины случаев, и персонализировать отбор пациентов на таргетную терапию мультикиназными ингибиторами. Имеются данные о влиянии мутации $BRAF^{V600E}$ на клиническое течение и ответ на терапию радиоактивным йодом, требующие углубленных доказательных исследований. Существующие методики определения мутации $BRAF^{V600E}$ обладают различной точностью, доступностью и стоимостью. Накладываются и другие методические аспекты, связанные с пробоподготовкой биологическим материала, качеством реактивов, кросс-валидацией результатов исследования. В данном обзоре на основании собственного опыта и литературных данных уточнены показания к определению мутации гена $BRAF^{V600E}$ в клинической практике, проведен комплексный сравнительный анализ современных методик исследования. Обзор ориентирован на широкий круг разнопрофильных специалистов: онкологов, эндокринологов, радиологов, патологов, биологов.

Ключевые слова: мутация $BRAF^{V600E}$, рак щитовидной железы, молекулярная диагностика, персонализированная медицина

Введение

Мутация гена $BRAF^{V600E}$ строго специфична (патогномонична) для папиллярного рака щитовидной железы (ПРЩЖ) с частотой встречаемости 40% — 70% [22, 45, 46]. При недифференцированной (анапластической) карциноме

щитовидной железы данная мутация определяется в 25% — 48% случаев, подтверждая развитие последней из папиллярной карциномы [32, 38]. Это создает хорошие предпосылки для использования анализа мутации $BRAF^{V600E}$ в диагностических и этиологических целях.

Клиническая значимость $BRAF^{V600E}$ непосредственно связана с тем, что ее присутствие однозначно указывает на злокачественный характер новообразования щитовидной железы [1, 2]. Это предоставляет возможность, прежде всего, уточнить предоперационный диагноз в случаях неопределенного или промежуточного результата цитологического исследования материала тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) и принять решение о необходимости хирургического вмешательства.

Прогностическое значение мутации $BRAF^{V600E}$ спорно. Одни исследования подтверждают негативное влияние наличия мутации на клиническое течение и выживаемость пациентов [5, 47], другие — ее отрицают [35].

Причинами противоречивости результатов могли быть различные биологические образцы, а также методы определения $BRAF^{V600E}$. Для примера, биоматериал для исследования Fnais et al. (2015) — тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ); Xing et al. (2007) — парафиновые блоки [45]. Методы анализа (секвенирование по Сэнгеру, секвенирование нового поколения (NGS), ИГХ, rtPCR, ddPCR) — также чрезвычайно разнообразны.

По данным литературы, мутации $BRAF^{V600E}$ при ПРЩЖ коррелирует с более агрессивным фенотипом и более высокой клинической стадией опухоли [47]. В ряде исследований, включая наши собственные, $BRAF^{V600E}$ имела прогностическое значение, повышая вероятность рецидива ПРЩЖ [4, 6].

В 2015 году в клинических рекомендациях американской тиреодологической ассоциации (ATA) мутации $BRAF^{V600E}$ и TERT описаны как

неблагоприятные факторы клинического прогноза [36, 47]. В 2018 году принята новая (8-я) редакция классификации TNM, в которой мутация BRAF^{V600E} также отнесена к независимым факторам неблагоприятного прогноза ПРЦЖ [11].

Методы определения клинически значимых мутаций в онкологии непрерывно совершенствуются, уточняется их роль в патогенезе опухоли и влиянии на ее клинико-патологические характеристики. Современные принципы доказательной медицины требуют постоянного критического анализа и обобщения накопленного лабораторного и клинического опыта. В настоящей работе мы проводим обзор данных о мутации BRAF^{V600E} при раке щитовидной железы, уделяя особое внимание методологическим подходам к ее определению и прикладным клиническим аспектам.

Распространенность мутации BRAF^{V600E} при ПРЦЖ

Мутация BRAF^{V600E} — точковая активирующая онкомутация, патогномоничная для ПРЦЖ

[22,45,46]. Помимо мутации BRAF^{V600E}, в опухолях щитовидной железы в единичных случаях описаны другие мутации гена BRAF (V600K, V600R, V600D, K601E), но они либо не патогномоничны для ПРЦЖ, либо их этиопатологическая роль пока не выяснена [12].

Ген BRAF кодирует киназу семейства RAF тирозинкиназного сигнального пути RAS-RAF-MEK-ERK, так называемого митоген-активируемого протеинкиназой (MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase) каскадом. Точковая соматическая мутация T1799A локализуется в 15-м экзоне В-изоформы гена RAF-киназы (отсюда название гена «BRAF») и заключается в замене тимин-содержащего нуклеотида на аденин-содержащий, приводя к замене валина на глютаминовую кислоту в 600-м аминокислотном остатке молекулы белка [30].

Мутация BRAF^{V600E} встречается при меланоме (50–60%) [28], реже — при раке прямой кишки (10%) и еще реже (3%) — при раке легкого. Доказана эффективность селективных таргетных кинзанных ингибиторов для BRAF-положительных случаев меланомы (Вемурафениб, Дабрафениб) [15, 40, 41].

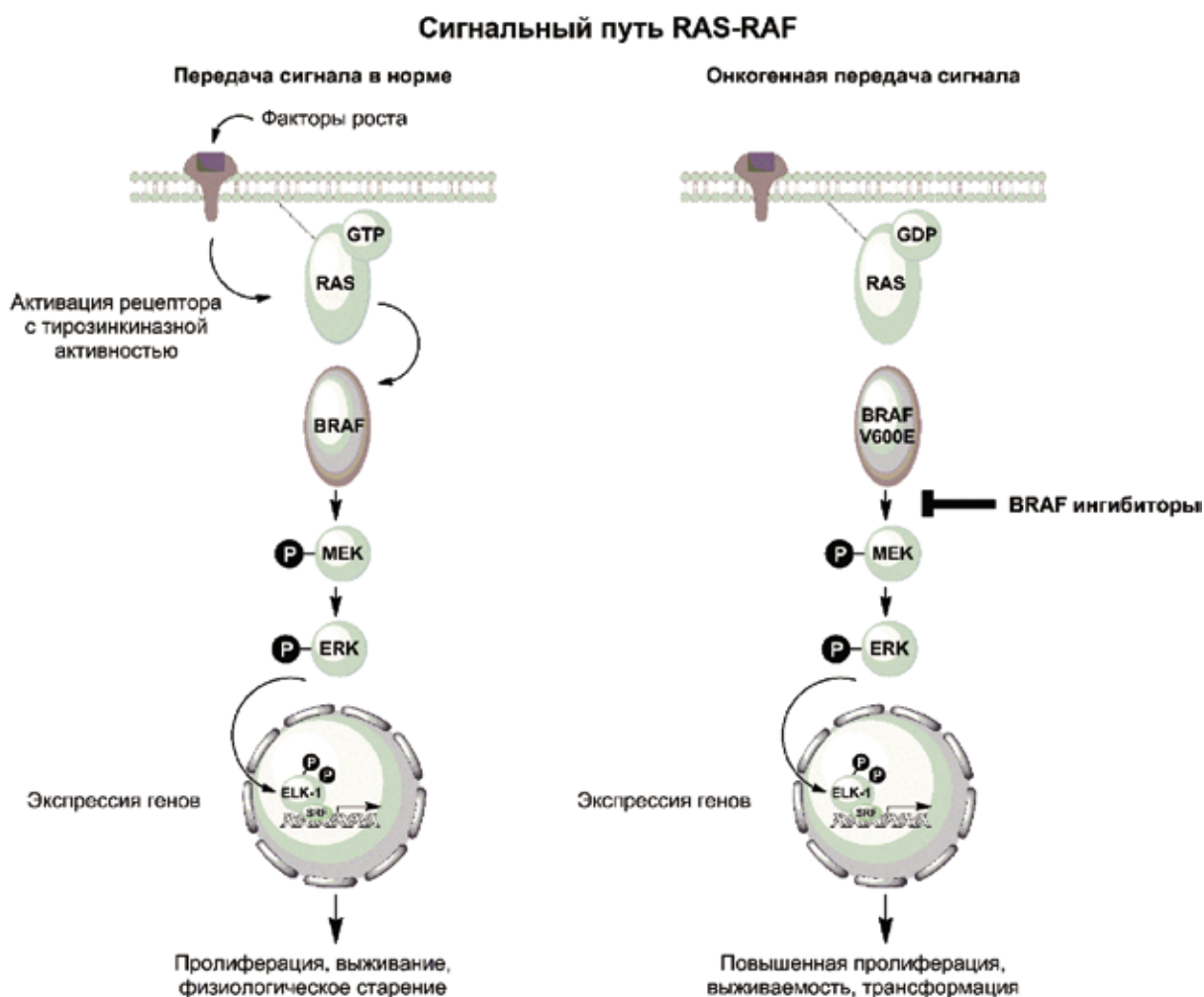


Рис. 1. MAP-киназный сигнальный каскад в норме и при наличии мутации BRAF^{V600E} [45]

Молекулярные механизмы канцерогенеза, опосредуемые мутацией

Как показано на рис. 1, мутация BRAFV600E активирует канцерогенез посредством гиперактивации MAPK сигнального пути, вызывающего изменения в экспрессии ряда генов, что в конечном итоге стимулирует пролиферацию опухолевых клеток, повышает их выживаемость и злокачественный потенциал [45].

По данным Li et al. (2016), пациенты с первичным ПРЦЖ и мутацией BRAF^{V600E} имели одинаковый ответ на терапию радиоактивным йодом ¹³¹I по сравнению с пациентами без мутации [34]. Однако пациенты с рецидивирующим ПРЦЖ и мутацией BRAF^{V600E} имели радиорезистентность в 79% случаев, что было в 4 раза чаще, чем у пациентов без мутации [15]. Таким образом, нарушение работы MAPK-киназного сигнального каскада вследствие мутации BRAF^{V600E} у пациентов с ПРЦЖ приводит к

повышению вероятности развития резистентности к препаратам радиоактивного йода. Данный процесс вероятно связан с подавлением функциональной активности натрий-йодидного симпортера (НЙС) [17]. Патогенетические механизмы ПРЦЖ, связанные с мутацией BRAF^{V600E}, представлены на рис. 2.

Принципы определения мутации

Исторически первыми были качественные молекулярные методы: прямое секвенирование по Сэнгеру и различные варианты конечно-точечной полимеразно-цепной реакции (ПЦР). В последнее время предпочтение отдается новым методам, которые позволяют выявить мутацию BRAF^{V600E} не только качественно (Да/Нет), но и количественно (количество клеток, содержащих мутацию). К таким методам относятся секвенирование нового поколения- NGS (Next Generation Sequencing), ПЦР в реальном времени (qPCR) и

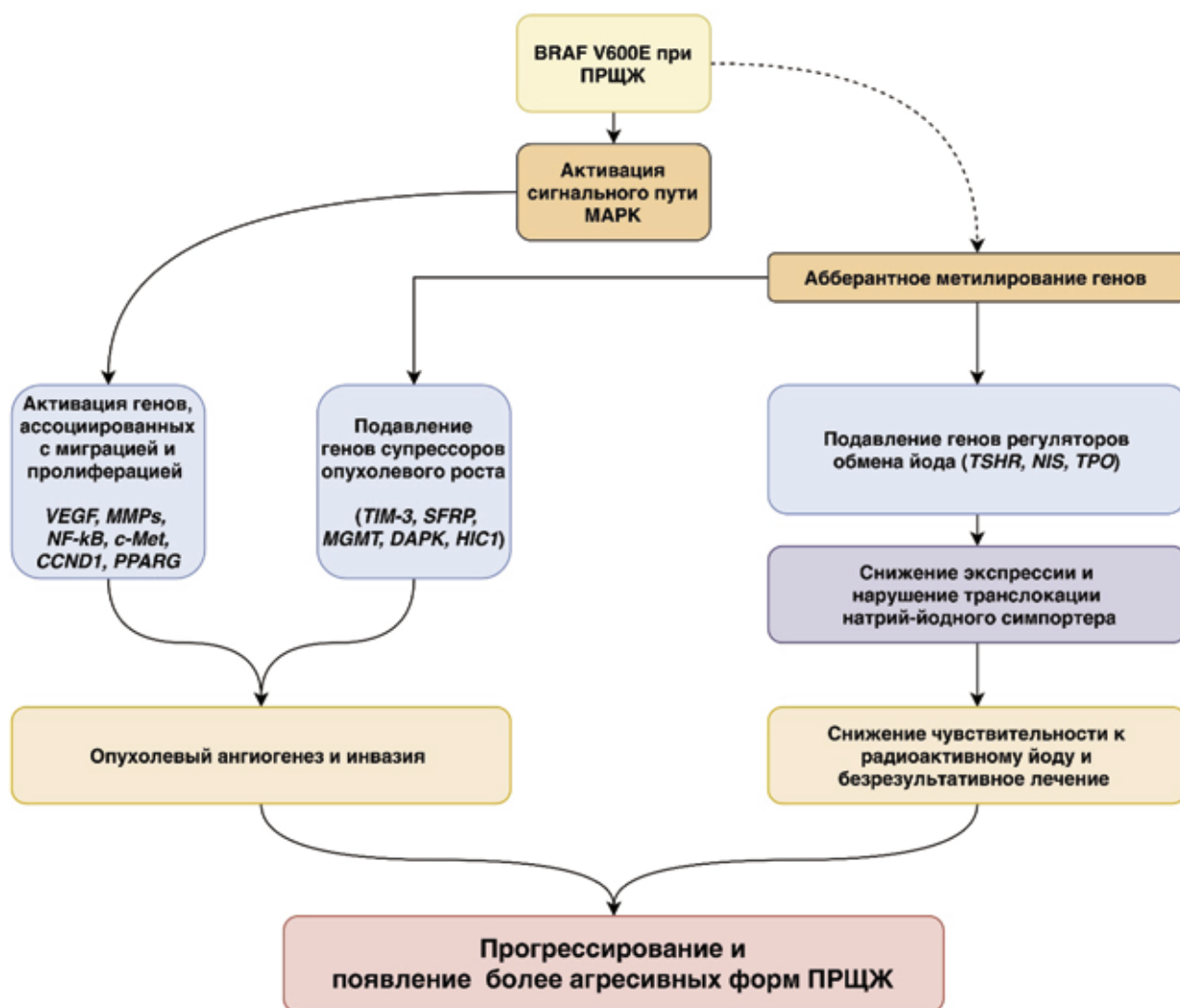


Рис. 2. Молекулярные изменения и патогенетические пути, связанные с BRAF мутацией при ПРЦЖ. Наблюдается гиперэкспрессия VEGF, MMPs, NF-kB и c-Met, способствующих пролиферации опухолевых клеток, повышению их устойчивости к неблагоприятным воздействиям и инвазии с одновременным снижением экспрессии опухоль-супрессорных генов и нарушением функции тиреоидных йод-метаболизирующих молекул [45]

капельная цифровая ПЦР (ddPCR). Относительно недавно стала доступной методика на основе иммуногистохимического окрашивания (ИГХ). Каждый из этих методов обладает определенными достоинствами и недостатками, зависит от качества реактивов и соблюдения стандартов, но нуждается в кросс-валидации, особенно при изначальной постановке [23].

При использовании молекулярных методов можно обходиться минимальным количеством биологического материала, однако все они чувствительны к его качеству, прежде всего к соотношению опухолевых и прочих клеток. Результаты молекулярного исследования фиксированной в формалине и свежемороженой ткани могут существенно отличаться, прежде всего из-за деградации ДНК [38]. ИГХ-метод также может давать переменные результаты в зависимости, например, от длительности фиксации ткани в формалине, способов демаскирования антигена и надежности используемого первичного антитела [4].

Рекомендации ATA, NCCN, ESMO не учитывают качество и тип методики используемой для определения статуса гена BRAF [26]. На наш взгляд, причиной вариативности результатов определения BRAF^{V600E} в различных лабораториях является отсутствие клинически-обоснованных алгоритмов и единых методологических стандартов, диапазона референсных значений, способов исключения ложно-отрицательных и ложно-положительных результатов. Использование методов с различной чувствительностью и специфичностью к определению мутации может быть причиной получения разных результатов исследования даже у одного и того же пациента [31].

Другим важным аспектом исследований является применение стандартизованных контрольных образцов. Для гистологических исследований коммерчески доступны как образцы, содержащие мутацию BRAF^{V600E}, так и ткани, содержащие BRAF дикого типа (например, «Horizon Discovery Group», Кембридж, Великобритания). Для проведения молекулярных исследований применяются образцы ДНК, выделенные из клеточных линий. В качестве отрицательного контроля может быть использована ДНК, выделенная из клеточной линии HEK293 [13], а в качестве положительного контроля — из клеточных линий A375 [25] или HT29 [16]. Применение такого типа контролей, полученных непосредственно в лабораториях, в рутинных исследованиях и, что особенно важно, при первичной постановке методик может быть причиной систематических ошибок. Поэтому необходимо проводить регулярную межлабораторную верификацию полученных результатов. В настоящее

время существует несколько некоммерческих организаций, целью которых является стандартизация молекулярных исследований, такие как Cancer ID (<https://www.cancer-id.eu/>) и Европейская сеть по качеству молекулярно-генетических исследований EMQN (<https://www.emqn.org>). Эти организации позволяют осуществлять обмен образцами между лабораториями-участниками, обладающими различной приборной базой, и, таким образом, по результатам слепого тестирования стандартизировать молекулярные исследования.

Для повышения надежности любой методики рекомендуется:

Сравнение с результатом альтернативного метода определения мутации. При противоречивых результатах целесообразен анализ “третейским” методом (который может быть дороже или более трудозатратным), но обладающим наибольшей точностью (оптимальный баланс чувствительности и специфичности).

Тщательная пробоподготовка с подтверждением качественного состава образца.

Выбор наименьших размеров ампликонов для ПЦР-зависимых методик для снижения частоты ошибки, связанной с деградацией ДНК.

Непрерывная валидация методики за счет участия в исследованиях “Лучшей практики” («Best Practice») и наличия выборочного внешнего контроля качества.

Способы получения образцов и методы определения мутации

Существуют следующие варианты получения клеточного материала для определения мутации BRAF^{V600E}.

Цитологический материал, полученный из опухоли путем тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ). Существуют два варианта пробоподготовки: исследование соскоба со стекла после цитологического исследования и анализ смыва пункционной иглы.

В первом случае материала для исследования больше, а также возможен селективный отбор участков, содержащих преимущественно или исключительно клетки опухолевого эпителия; при этом, однако, цитологический препарат становится непригодным для пересмотра (мазок соскабливается), в связи с чем желательнее предварительное архивирование изображения.

Анализ смыва пункционной иглы при морфологическом подтверждении диагноза по цитологическому препарату. При этом способе биоматериала меньше, но вполне достаточно для исследования и цитологический препарат сохраняется. При этом используется остаточный биоматериал в просвете пункционной иглы, ко-

торый обычно попадает в отходы. Для контроля качества биологического образца (наличие и количество клеток опухоли щитовидной железы) целесообразно определять в нем уровень цитокератина-19.

Парафиновый блок для гистологического исследования.

Стандартный способ сохранения гистологического материала. В основе метода лежит фиксация ткани в формалине с последующим обезвоживанием и заливкой в парафин. Образец необходимо помещать в фиксирующий раствор немедленно после взятия, поскольку важно, чтобы кусочки оставались нефиксированными возможно более короткое время. Флаконы с материалом следует содержать при температуре не менее 4°C. При отложенной фиксации аутолитические изменения ткани начинаются сразу после того, как ткань лишается кровоснабжения. Преимуществом является то, что биологический образец может храниться длительно при комнатной температуре [3, 25]. Участок опухоли для исследования маркируется под микроскопическим контролем по соответствующему срезу на стекле.

Криоконсервированный образец опухоли (биобанк).

Самым надежным и изученным методом длительного сохранения нативных биологических образцов является глубокая заморозка [27]. Сохранение структуры ткани происходит с помощью криогенной консервации при температуре от -80 до -196 С. Данная технология применяется при создании биобанка/криобанка [7]. В дальнейшем материал можно использовать по требованию вне зависимости от временного интервала.

Жидкостная биопсия крови (Liquid Biopsy) — фракционирование мононуклеаров крови, в том числе циркулирующих опухолевых клеток (при их наличии в крови), циркулирующих в крови фрагментов ДНК и РНК. Метод может быть дополнением или альтернативой биопсии опухоли. Забор крови является рутинной малоинвазивной процедурой с хорошим качеством биологического материала, что позволяет применять его для выявления генетических «следов» опухоли в крови в процессе первичной диагностики, лечения и последующего наблюдения [33]. Появление фрагментов опухолевой ДНК в крови связано, вероятно, с гибелью опухолевых клеток в первичном и/или метастатических очагах с попаданием их генетического материала в кровь. Циркулирующая опухолевая ДНК представляет собой очень малую часть фракции ДНК крови, как правило, менее 0,01% и может значительно изменять свой титр в зависимости от течения процесса

и ответа опухоли на лечение [19]. Для жидкостной биопсии рекомендуется использовать плазму крови.

Методы определения мутации BRAF^{V600E}.

Секвенирование по Сэнгеру является последовательным молекулярным анализом — один анализ, один ген. Время выполнения анализа, включающего несколько генов, может составлять несколько дней. Точность исследования может варьировать в пределах +/- 15%. Применяется при определении точковых мутаций при отсутствии других инструментов определения. Существенным недостатком, помимо длительности, является низкая чувствительность метода. Надежное выявление мутации возможно в образцах, содержащих не менее 5–10% опухолевой ДНК.

Секвенирование нового поколения (NGS). Позволяет «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования. Основной метод, применяемый в современных исследованиях и создании баз данных. Обладает большей чувствительностью по сравнению с секвенированием по Сэнгеру. Минимально необходимое количество ДНК в препарате составляет 10–40 нг. Кратчайший срок выполнения исследования — 3 часа, но, как правило, занимает несколько дней. Точность определения варьирует в пределах +/- 2–5%. Может применяться для выполнения жидкостной биопсии крови. Преимуществом является возможность поиска неизвестных мутаций, в то время как прочие методы определяют уже известную искомую мутацию. Однако метод является более затратным по сравнению с другими. В силу дороговизны его использование оправдано в случаях параллельного определения набора мутаций, что реализовано, например, в коммерческих молекулярных канцер-панелях, или при наличии большого количества образцов (мультиплексирование).

Количественная ПЦР (qPCR) или ПЦР в реальном времени (Real time PCR, rtPCR). Включает в себя одновременно детекцию и количественное определение (измерение абсолютного количества копий, либо измерение количества копий относительно внесённой ДНК или дополнительных калибровочных генов) целевой последовательности ДНК в образце. Выявление наличия искомой мутации происходит с использованием флуоресцентных зондов специфичных к измененной последовательности и последовательности дикого типа. Основным преимуществом метода является высокая чувствительность. Контаминация проб может повышать частоту ложноположительных и ложноотрицательных ответов.

Цифровая капельная ПЦР (ddPCR). Усовершенствованный метод полимеразной цепной реакции. Позволяет провести точную (вплоть до 1 копии на 100 000) количественную оценку представленности определенного участка ДНК в образце. Отсутствует необходимость в использовании калибровочных кривых, хотя это и может быть реализовано в случае необходимости. Чувствительность системы и ее высокая точность дает возможность определения даже редких мутаций, что особенно важно при анализе биопсии крови. Для получения результата достаточно нескольких десятков пикограмм ДНК, что в тысячи раз меньше, чем нужно для NGS.

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) с антителами к BRAF. Моноклональное антитело (VE1) связывается с белком, образующимся в результате мутации BRAF^{V600E}. Относительно быстрая и относительно недорогая “ручная” методика; существуют также коммерческие наборы реактивов для автоматического окрашивания. Возможен анализ цитологического материала.

Основные методы определения мутации BRAF^{V600E} в биологических образцах различного типа приведены в табл. 1. В табл. 2 приводятся характеристики методов.

Клиническое значение мутации BRAF^{V600E} при подозрении на установленном РЩЖ

Как показано на рис. 3, определение мутации BRAF^{V600E} может быть рекомендовано в следующих целях:

Дифференциальная диагностика опухолей щитовидной железы неизвестного потенциала злокачественности [37].

- С учетом патогномоничности для ПРЩЖ определение мутации BRAF^{V600E} улучшает точность цитологической диагностики опухолей ЩЖ, особенно при неопределенном цитологическом заключении “фолликулярной опухоли” и клеточной атипии (Bethesda IV и III, соотв.); часто-

Таблица 1. Сравнительная оценка методик определения мутации BRAF^{V600E} и исследуемого материала

Методика	Цитология/ Смыв пункционной иглы	Гистологический материал	Жидкостная биопсия (кровь)	Преимущества	Недостатки
Количественная (в реальном времени) ПЦР / (qPCR, rtPCR)	+	+	-	Низкая стоимость и высокая доступность Приемлемая чувствительность и специфичность для одиночного сиквенса	Снижение точности при деградации материала из-за низкого по сравнению с другими методами предела обнаружения
Цифровая капельная ПЦР / (ddPCR)	+	+	+	Более высокая чувствительность и специфичность по сравнению с qПЦР Деградация материала не снижает точность исследования Высокая точность при жидкостной биопсии Относительно дешевый метод	Выявление мутаций ограничено набором типовых реагентов
Секвенирование нового поколения (NGS)	+	+	+	Одновременное определение множественного количества генов	Дорогостоящее, длительное и трудоемкое исследование
Секвенирование по Сэнгеру (Сэнгер)	+	+	-	Наиболее доступный и изученный метод	Один цикл/одна мутация Длительность Качественный тест
ИГХ	-	+	-	Высокоспецифичный метод определения единичной мутации	Высокое требование к качеству реагентов и исполнения

Таблица 2. Сравнение основных характеристик методов выявления BRAF^{V600E}

Параметр теста	Сенгер	NGS	ИГХ	q(rt)PCR	ddPCR
Что исследуется	15 экзон	15 экзон	белок (продукт V600E)	мутация V600E	мутация V600E
Время исследования	1-3 дня	3-5 дней	2-3 часа	8 часов	8 часов
Минимальное количество материала, нг	100-250	≥ 10	3-4	20	≥ 2
Частота ошибок, в среднем	4%	5%	3%	3%	3%
Себестоимость, доллары США/рубли	175/11 375	275/17 875	125/8 125	30/1 950	45/2 925

та мутации в клинической практике достигает 40% [10].

- При неинформативности цитологического заключения при наличии данных (пальпация, УЗИ-TIRADS, ассиметрично увеличенные лимфоузлы на стороне опухоли).
- Подозрение на метастазирование в щитовидную железу другой карциномы или подозрение на лимфому щитовидной железы.

Послеоперационное определение в гистологических блоках (а лучше в нативном материале опухоли/метастазов):

- Определение группы клинического риска рецидива дифференцированного рака щитовидной железы (по критериям ATA 2015).
- Прогноз развития радиорезистентности
- Оценка ответа на лечение
- Ответ опухоли на проводимое лечение после операции, терапии радиоактивным йодом с помощью жидкостной биопсии.
- При прогрессировании опухолевого процесса — пунктирование всех очагов поражения с описанием экспрессии мутации гена в каждом из них.

Определение мутации в urgentных клинических ситуациях (при анапластическом раке щитовидной железы) для начала системной таргетной терапии [8]. В клинической практике значение имеет не только точность метода, но иногда и возможность срочного выполнения анализа по жизненным показаниям. Так, при анапластическом раке щитовидной железы скорость прогрессирования опухоли и угроза жизни пациенту настолько высоки, что дорог буквально каждый день. В такой ситуации предпочтение отдается наиболее доступному и быстрому тесту на наличие мутации BRAF^{V600E}, поэтому предпочтительны ИГХ с жидкостной цитологией пунктата [44]. При положительном результате теста пациенту можно предложить лечение комбинацией селективного ингибитора BRAF^{V600E} дабрафениба и траметиниба, доказавших свою эффективность и одобренных FDA (оба препарата зарегистрированы в РФ) [44]. В отсутствие лечения АРЩЖ прогноз краткосрочной фатальности чрезвычайно высок.

Доказательств необходимости учета BRAF^{V600E} статуса при выборе объема хирургического лечения ПРЩЖ пока недостаточно. В настоящий момент не выявлено корреляции наличия му-

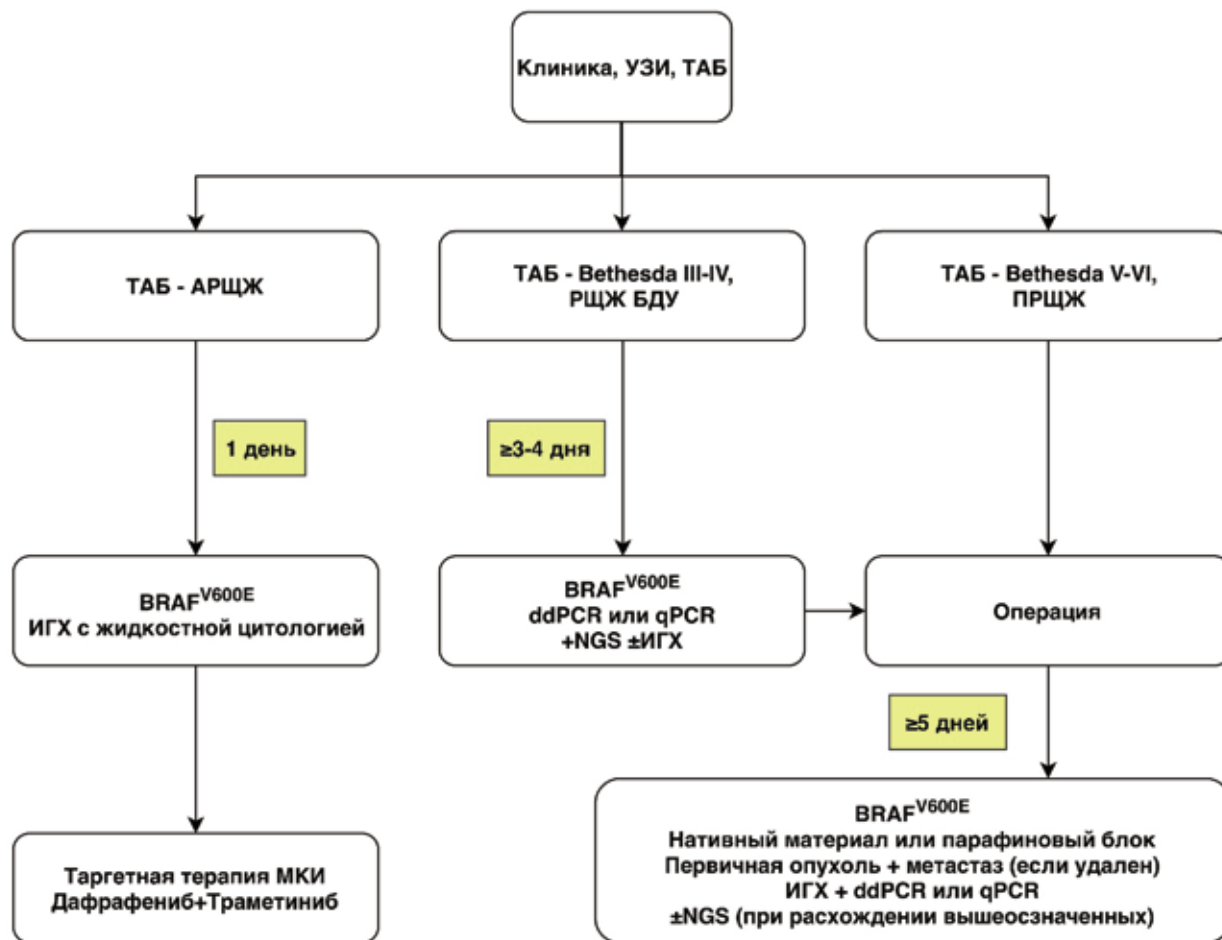


Рис. 3. Алгоритм обследования на наличие мутации BRAF^{V600E} на различных этапах и в различных клинических ситуациях

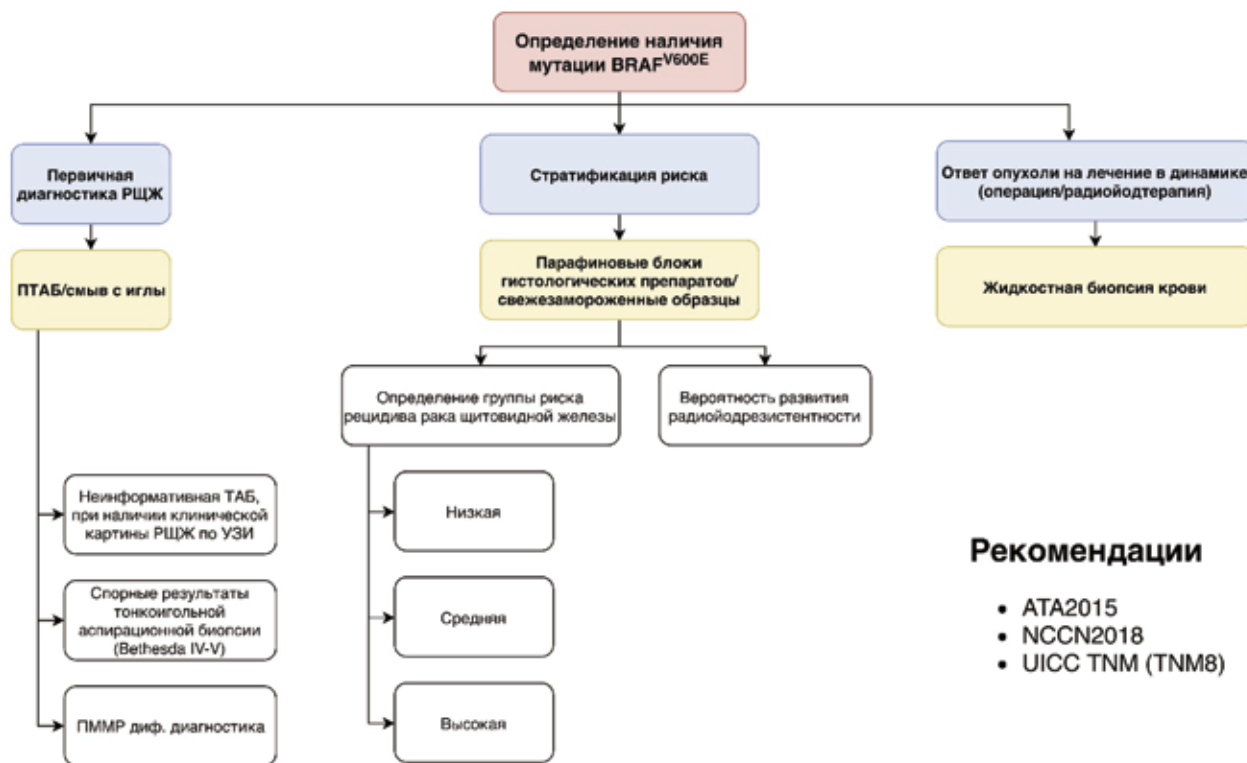


Рис. 4. Главные аспекты клинической релевантности мутации BRAF^{V600E}

тации BRAF^{V600E} с увеличением объема операции на щитовидной железе до тиреоидэктомии у пациентов с низким риском рецидива. Также не выявлено корреляции наличия мутации и выполнении центральной лимфодиссекции [14].

В других работах, напротив, выявлена прямая зависимость наличия мутации BRAF^{V600E} при ПРЩЖ с более агрессивным типом опухоли: метастазирование (регионарное/отдаленное), выход опухоли за капсулу щитовидной железы и повышение частоты регионарных рецидивов [48].

В группе пациентов с низким риском рецидива и интратиреоидной опухолью (<4 см, N0, M0; 33% пациентов имели мутацию BRAF^{V600E}), общий риск рецидива опухоли в течение 5 лет составил 3% [21]. При этом в подгруппе пациентов с наличием мутации BRAF^{V600E} частота рецидива составила 8% (8 из 106) по сравнению с 1% (2 из 213) в группе BRAF^{V600E}-негативных опухолей [21]. При многофакторном анализе мутация BRAF^{V600E} оказалась единственным независимым предиктором рецидива опухоли после 5 лет наблюдения [21].

В результате мета-анализа выявлено неблагоприятное влияние мутации BRAF^{V600E} при ПРЩЖ на частоту положительного результата ПЭТ/КТ с ФДГ (OR 2,12, 95%ДИ 1,53-3,0) в сравнении с отсутствием мутации [42].

По данным Dunn et al. (2018), применение селективного BRAF-ингибитора Вемурафениба привело в ряде случаев к восстановлению спо-

собности к накоплению йода ранее радиоiodрезистентных очагов опухоли щитовидной железы и положительным ответом на проведение повторной терапии ¹³¹I при наличии исходной мутации BRAF^{V600E} в клетках опухоли. Важное значение в выборе пациентов для данной терапии имел уровень тиреоглобулина: при уровне ТГ <7 нг/мл вероятность ответа на таргетную терапию была низкой [20].

При обнаружении мутации BRAF^{V600E} необходимо на предоперационном этапе (УЗИ, ТАБ со смывом из иглы на тиреоглобулин) более внимательно оценивать распространенность опухоли и планировать адекватный объем операции на щитовидной железе и регионарном лимфатическом коллекторе, тактику дальнейшего ведения.

Мутации BRAF^{V600E}, особенно в сочетании с мутациями TERTC228T,C250T при дифференцированном раке щитовидной железы, имеют не только диагностическое, но и прогностическое значение, что необходимо учитывать при выборе тактики ведения пациентов [18, 24, 29, 36, 34-39, 43, 47].

При наличии достаточно противоречивых данных необходимо уделять больше внимания оценке распространенности опухоли на предоперационном этапе (УЗИ, ТАБ со смывом из иглы на тиреоглобулин), особенно при положительном статусе BRAF^{V600E}, что способствует выбору адекватного объема операции на щитовидной железе и регионарном лимфатическом коллекторе в каждом конкретном случае.

Заключение

Мутация BRAF^{V600E} является патогномичной для ПРЩЖ. Учитывая накопленный в мире опыт клинических исследований, а также рекомендации международных онкологических сообществ (ATA, NCCN, UICC), определение данной мутации целесообразно при дополнительном диагностическом тестировании на предоперационном (цитология: Bethesda III–IV) и послеоперационном (гистология) этапах при опухолях неизвестного потенциала злокачественности.

Накоплена доказательная база того, что наличие мутации BRAF^{V600E} является прогностически неблагоприятным фактором, повышающим вероятность резистентности очагов опухоли к терапии радиоактивным йодом, что необходимо учитывать при выборе тактики ведения пациентов.

Определение мутации BRAF^{V600E} в опухоли целесообразно для:

Дифференциальной диагностики опухолей ЩЖ на предоперационном (в дополнение к цитологическому заключению Bethesda III и IV) и послеоперационном этапе гистологической диагностики (опухоль неопределенного потенциала злокачественности).

Уточнения группы клинического риска рецидива ПРЩЖ;

Оценки вероятности резистентности к терапии радиоактивным йодом;

Отбора пациентов с ПРЩЖ и АРЩЖ на таргетную терапию BRAF-ингибиторами (Дабрафениб, Вемурафениб).

В различных клинических ситуациях имеет значение срочность выполнения анализа. Так, при анапластическом раке щитовидной железы, ввиду высокой агрессивности карциномы требуется срочный (1–2 дня) анализ мутации BRAF^{V600E} с целью определения показаний к таргетной терапии. В других клинических ситуациях время на ожидание результата анализа, как правило, имеется.

На данный момент в России для определения мутации BRAF^{V600E} применяется метод гtPCR и секвенирование по Сэнгеру или NGS. В мире преобладают более точные методы, такие как ddPCR и ИГХ, а для повышения точности — комбинации различных методов. Методом, гармонично сочетающим в себе точность, удобство и относительную дешевизну является ddPCR, однако сегодня он малодоступен в РФ. Проведенный в статье анализ информативности методик определения мутации BRAF^{V600E} позволяет полагать, что оптимальным выбором являются ddPCR и ИГХ при обеспечении должного контроля качества.

Внедрение в клиническую практику надежных методов определения мутации BRAF^{V600E}

позволит улучшить диагностику и оценку клинического прогноза пациентов с ПРЩЖ, подбирать кандидатов на таргетную терапию МКИ при радиоiod-резистентном ПРЩЖ или АРЩЖ по срочным жизненным показаниям. Необходимо внедрять в клиническую практику наиболее точные методы определения онкомутаций, создавать референсные центры для кросс-валидации результатов с целью совершенствования персонализированной медицины. Востребованы мультицентровые ретроспективные и проспективные исследования, позволяющие повысить прикладное значение онкогенетики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев Е.В., Румянцев П.О., Саенко В.А. и др. Молекулярный анализ структурных нарушений генома папиллярных карцином щитовидной железы // Молекулярная биология. — 2004. — Т. 38. — № 4. — С. 642–653.
2. Васильев Е.В., Румянцев П.О., Саенко В.А. и др. Радиационно-индуцированные опухоли: диагностика молекулярной патологии в различных формах рака щитовидной железы // Вестник научно-исследовательского института молекулярной медицины. Молекулярная медицина и безопасность. — Выпуск 4. — С. 55–73.
3. Мальков П.Г., Франк Г.А. Основы обеспечения качества в гистологической лабораторной технике. — Москва, 2011.
4. Сидорин АВ, Абросимов А.Ю. и др. Клинические, морфологические и прогностические особенности папиллярного рака щитовидной железы с различным статусом BRAF, установленным иммуногистохимическим методом // Архив патологии. — 2018. — С. 19–25.
5. Поляков А.П., Волченко Н.Н., Славнова Е.Н. и др. Влияние статуса гена BRAF на выбор тактики хирургического лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы // Опухоли головы и шеи. — 2016. — Т. 6. — № 4. — С. 45–48.
6. Румянцев П.О., Залетаев Д.В., Васильев Е.В. и др. Анализ частоты соматических мутаций генов BRAF и RET в папиллярном раке щитовидной железы // Вопросы онкологии. — 2006. — Т. 52. — № 2. — С. 145–149.
7. Румянцев П.О., Мудунов А.М. Биобанкинг в онкологии и радиологии // Эндокринная хирургия. — 2017. — Т. 11. — № 4.
8. Agarwal R, Wang J, Wilson K et al. Response to Targeted Therapy in BRAF Mutant Anaplastic Thyroid Cancer // J. Natl. Compr. Canc. Netw. — 2016. — Vol. 14(10). — P. 1203–1207.
9. Barollo S., Pennelli G., Vianello F. et al. BRAF in primary and recurrent papillary thyroid cancers: the relationship with (131)I and 2-[(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake ability // Eur. J. Endocrinol. — 2010. — Vol. 163(4). — P. 659–663. — doi: 10.1530/EJE-10-0290.
10. Baier N.D., Hahn P.F., Gervais D.A. et al. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: experience in a cohort of 944 patients // AJR Am. J. Roentgenol. — 2009. — Vol. 193(4). — P. 1175–1179. — doi: 10.2214/AJR.08.1840.
11. James D. Brierley, Mary K. Gospodarowicz, Christian Wittekind. TNM Classification of Malignant Tumours, 2017. — 272 p.

12. COSMIC; Lovly et al. 2012; Rubinstein et al. 2010.
13. Chat-Uthai N., Vejvisithsakul P., Udommethaporn S. et al. Development of ultra-short PCR assay to reveal BRAF V600 mutation status in Thai colorectal cancer tissues // *PLoS One*. — 2018. — Vol. 13(6). — P. e0198795. — doi: 10.1371/journal.pone.0198795.
14. Carrie C. Lubitz, Sareh Parangi, Tammy M. Holm et al. Detection of Circulating BRAFV600E in Patients with Papillary Thyroid Carcinoma // *J. Mol. Diagn.* — 2016. — Vol. 18(1). — P. 100–108.
15. Dabrafenib. Summary of Product Characteristics, 2015.
16. Dahse R., Kromeyer-Hauschild K., Berndt A. et al. No incidence of BRAF mutations in salivary gland carcinomas—implications for anti-EGFR therapies // *J. Biomed. Biotechnol.* — 2009. — Vol. 2009. — P. 501736. — doi: 10.1155/2009/501736.
17. Dong H. et al. Effects of BRAF(V600E) mutation on Na(+)/I(-) symporter expression in papillary thyroid carcinoma // *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog Med. Sci.* — 2016. — Vol. 36(1). — P. 77-81. —doi: 10.1007/s11596-016-1545-3.
18. Dobashi Y., Sugimura H., Sakamoto A. et al. Stepwise participation of p53 gene mutation during dedifferentiation of human thyroid carcinomas // *Diagn. Mol. Pathol.* — 1994. — Vol. 3. — P. 9-14.
19. Diehl F., Li M., Dressman D. et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* — 2005. — Vol. 102(45). — P. 16368-16373.
20. Dunn L.A., Sherman E.J., Baxi S.S. et al. Vemurafenib redifferentiation of BRAF mutant, RAI-refractory thyroid cancers // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2018. — doi: 10.1210/jc.2018-01478.
21. Elisei R., Viola D., Torregrossa L. et al. The BRAF(V600E) mutation is an independent, poor prognostic factor for the outcome of patients with low-risk intrathyroid papillary thyroid carcinoma: single-institution results from a large cohort study // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2012. — Vol. 97. — P. 4390-4398.
22. Forbes S.A., Beare D., Gunasekaran P. et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer // *Nucleic. Acids. Res.* — 2015. — Vol. 43. — P. D805-D811.
23. Gonzalez D. et al. BRAF mutation testing algorithm for vemurafenib treatment in melanoma: recommendations from an expert panel // *British Journal of Dermatology*. — 2013. — Vol. 168(4). — P. 700-707. — doi: 10.1111/bjd.12248.
24. Garcia-Rostan G., Costa A.M., Pereira-Castro I. et al. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer // *Cancer Res.* — 2005. — Vol. 65. — P. 10199-10207.
25. Guibert N., Pradines A., Casanova A. et al. Detection and Monitoring of the BRAF Mutation in Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in BRAF-Mutated Lung Adenocarcinoma // *J. Thorac. Oncol.* — 2016. — Vol. 11(9). — P. e109-12. — doi: 10.1016/j.jtho.2016.05.001
26. Haugen B.R., Alexander E.K., Bible K.C. 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: official journal of the American Thyroid Association* // *Thyroid*. — 2016. — Vol. 26(1). — P. 1133. — <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>.
27. Hainaut P., Vaught J., Zatloukal K., Pasterk M. *Banking of Human Biospecimens*. Switzerland: Springer, 2017. — 239 p.
28. Holderfield M., Deuker M.M., McCormick F. et al. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond // *Nature Reviews Cancer*. — 2014. — Vol. 14. — P. 455-467.
29. Hou P., Liu D., Shan Y. et al. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer // *Clin. Cancer Res.* — 2007. — Vol. 13. — P. 1161-1170.
30. Knauf J.A., Ma X., Smith E.P. et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation // *Cancer Res.* — 2005. — Vol. 65. — P. 4238.
31. Kowalik A., Kowalska A., Walczyk A. et al. Evaluation of molecular diagnostic approaches for the detection of BRAF p.V600E mutations in papillary thyroid cancer: Clinical implications // *PLOS ONE*. — 2017. — <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179691>.
32. Landa I., Ibrahimasic T., Boucai L. et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers // *J. Clin. Invest.* — 2016. — Vol. 126. — P. 1052-1066.
33. Lim J. S. J., Janku F., Yap T.A. Circulating tumor DNA—From bench to bedside // *Current Problems in Cancer*. — 2017. — Vol. 41 (3). — P. 212–221.
34. Li J., Liang J. Noninferior response in BRAFV600E mutant nonmetastatic papillary thyroid carcinoma to radioiodine therapy // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. — 2016. — Vol. 43(6). — P. 1034-9. — doi: 10.1007/s00259-015-3305-1.
35. Liu R.T., Chen Y.J., Chou F.F. et al. No correlation between BRAFV600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan // *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. — 2005. — Vol. 63(4). — P. 461-466.
36. Liu X., Qu S., Liu R. et al. TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2014. — Vol. 99. — P. E1130-E1136.
37. NCCN 2018 Thyroid cancer.
38. Rao S.N., Zafereo M., Dadu R. et al. Patterns of treatment failure in anaplastic thyroid carcinoma // *Thyroid*. — 2017. — Vol. 27. — P. 672-681.
39. Ripoli F., Mohr A., Hammer S. et al. A Comparison of Fresh Frozen vs. Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Specimens of Canine Mammary Tumors via Branched-DNA Assay // *Int. J. Mol. Sci.* — 2016. — Vol. 17(5). — P. E724.
40. Trametinib. Summary of Product Characteristics, 2015.
41. Vemurafenib. Summary of Product Characteristics, 2014.
42. Santhanam P., Khthir R., Solnes L.B. et al. The relationship of BRAFV600E mutation status to FDG PET/CT avidity in thyroid cancer: a review and meta-analysis // *Endocr. Pract.* — 2018. — Vol. 24(1). — P. 21-26. — doi: 10.4158/EP-2017-0080.
43. Scott E., Learoyd D., Clifton-Bligh R.J. Therapeutic options in papillary thyroid carcinoma: current guidelines and future perspectives // *Future Oncol.* — 2016. — Vol. 12. — P. 2603-2613.
44. Subbiah V., Kreitman R.J., Wainberg Z.A. et al. Dabrafenib and Trametinib Treatment in Patients With Locally Advanced or Metastatic BRAF V600-Mutant Anaplastic Thy-

- roid Cancer // J. Clin. Oncol. — 2018. — Vol. 36(1). — P. 7-13. — doi: 10.1200/JCO.2017.73.6785.
45. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications // Endocrine Rev. — 2007. — Vol. 28. — P. 742-762.
46. Xing M., Alzahrani A.S., Carson K.A. et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer // JAMA. — 2013. — Vol. 309. — P. 1493-1501.
47. Xing M., Liu R., Liu X. et al. BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence // J. Clin. Oncol. — 2014. — Vol. 32. — P.2718-2726.

Поступила в редакцию 18.12.2018 г.

*P.O. Rumyantsev¹, P.A. Nikiforovich¹, A.A. Poloznikov²,
A.U. Abrosimov¹, V.A. Saenko³, T.I. Rogunovich³,
A.A. Budzin^{4,5}, A.P. Polyakov², A.D. Kaprin²,
I.I. Dedov^{1,5}*

BRAF^{V600E} mutation in papillary thyroid carcinoma. Clinical and methodological aspects

¹FGBU «National Medical Research Center of Endocrinology» of the Health Ministry of Russia, Moscow,

²FGBU «National Medical Research Center of Radiology» of the Health Ministry of Russia, Moscow,

³Department of Radiation Molecular Epidemiology, Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki, Japan

⁴The M.M. Shemyakin-Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow,

⁵I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

Abstract

Mutation BRAF^{V600E} is highly specific for papillary thyroid carcinoma. It's detected in 40-70% of all papillary thyroid carcinoma cases. Moreover this mutation is noticed in anaplastic carcinoma in 40-50%. This fact gives a chance to select patients and provide targeted therapy with multi-kinase inhibitors in cases of unresectable anaplastic carcinoma. The influence of BRAF V600E mutation for response to radioactive iodine therapy requires more evidence-based research. Existing methods for determining the BRAF^{V600E} mutation have different accuracy, availability and cost. Other methodological aspects are also associated with the sample preparation of biological material, the quality of reagents, and the cross-validation of research results. In this review, on the basis of our own experience and literature data, the indications for determining the mutation of the BRAF^{V600E} gene in clinical practice are refined, and a comprehensive comparative analysis of modern research methods has been conducted. This review is focused on a wide range of specialists of different types: oncologists, endocrinologists, radiologists, pathologists, and biologists.

Key words: BRAF^{V600E} mutation, thyroid cancer, molecular diagnostics, personalized medicine