ISSN 1392-6373
SVEIKATOS MOKSLAI
2011, Volume 21, Number 2, Supplement, p. 26-33

DAUGINIŲ ENDOKRININIŲ NAVIKŲ SINDROMO ANTRĄJĮ TIPĄ SUKELIANČIŲ *RET* PROTOONKOGENO MUTACIJŲ KOKYBINIS ĮVERTINIMAS ŠIO SINDROMO PROBANDAMS LIETUVOJE

LINAS JUODELĖ[1], DANIELIUS SERAPINAS[2,3], LAIMUTIS KUČINSKAS[4], DANUTĖ MAZGELIENĖ[5], ELONA JUOZAITYTĖ[1]

[1]Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos Akademija, Onkologijos klinika, [2]Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos Akademija, Pulmonologijos ir imunologijos klinika, [3]Mykolo Romerio universitetas, [4]Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos Akademija, Biologijos institutas, [5]VšĮ Karoliniškių poliklinika

Raktažodžiai: *dauginių endokrininių navikų sindromo antrasis tipas, MEN2 sindromas, RET protoonkogenas, genetiniai tyrimai.*

Santrauka

Dauginių endokrininių navikų sindromo antrasis tipas - retas autosominiu dominantiniu būdu paveldimas sindromas, kuriam būdingi skydliaukės medulinės karcinomos deriniai su feochromocitoma ir(ar) prieskydinių liaukų pažeidimais, taip pat kitiems sindromo potipiams būdingais navikais. Lietuvoje iki šiol nebuvo atlikta tyrimų, įvertinančių MEN2 sindromą sukeliančias RET protoonkogeno mutacijas.

Tikslas - nustatyti ir apibūdinti MEN2 sindromą sukeliančias RET protoonkogeno mutacijas, būdingas sergantiesiems MEN2 sindromu Lietuvoje. Nustatyti MEN2 sindromo probandų dažnį tarp sergančiųjų skydliaukės meduline karcinoma Lietuvoje.

Tirti 47 skydliaukės meduline karcinoma sergantys ir giminystės ryšiais nesusiję pacientai. Pacientams atlikti genetiniai tyrimai siekiant nustatyti MEN2 sindromui būdingas germinacines RET protoonkogeno mutacijas, kurios buvo nustatytos ir vertintos atliekant DNR sekoskaita.

MEN2 sindromui būdingas germinacines RET protoonkogeno mutacijas nustatėme 8 iš 47 skydliaukės meduline karcinoma sergančių pacientų - 17,02 proc. (PI 95 proc. 6,4-27,7 proc.). Dažniausiai (62,5 proc.) nustatytos MEN2A sindromą sukeliančios RET protoonkogeno mutacijos, esančios 611 (N2), 618 (N1) bei 634 (N2) kodonuose, kiek rečiau - MEN2B sindromą sukelianti mutacija, esanti 918 kodone (N2), rečiausiai - šeiminės skydliaukės medulinės karcinomos sindromą sukelianti mutacija, esanti 791 kodone (N1). Pacientams, kuriems nustatytos MEN2 sindromą sukeliančios RET protoonkogeno mutacijos, skydliaukės medulinė karcinoma atsirasdavo jaunesniame amžiuje - 29,8±16,1 metų, nei neturintiems mutacijų - 49,5±10,7 metų amžiaus.

Tirtoje giminystės ryšiais nesusijusių pacientų, sergančių skydliaukės meduline karcinoma, imtyje MEN 2 sindromą sukeliančių germinacinių RET protoonkogeno mutacijų ir šio sindromo probandų dažnis buvo 17,02 proc. (CI 6,4-27,7 proc.). Nustatyta RET protoonkogeno mutacijų reikšmė skydliaukės medulinės karcinomos klinikinėms ypatybėms.

ĮVADAS

Dauginių endokrininių navikų sindromo antrasis tipas (angl. multiple endocine neoplasia syndrome type 2, arba MEN2 sindromas) - retas autosominiu dominantiniu būdu paveldimas sindromas, kuriam būdinga skydliaukės medulinės karcinomos deriniai su kitais endokrininės organų sistemos navikais - feochromocitoma bei prieskydinių liaukų pažeidimais, taip pat skirtingiems sindromo potipiams būdingais ne endokrininiais pažeidimais [1,2]. MEN2 sindromas skirstomas į tris potipius: MEN2A sindromui būdingi skydliaukės medulinės karcinomos deriniai su feochromocitoma bei prieskydinių liaukų

Adresas susirašinėti: Linas Juodelė, el. p.: juodele@hotmail.com

pažeidimais, taip pat kai kuriems pacientams atsiranda odos lichen amiloidozė ir(ar) Hirschsprung liga; MEN2B sindromui būdinga skydliaukės medulinės karcinomos deriniai su feochromocitoma, taip pat daugeliui šių pacientų nustatoma ir gleivinių ganglioneuromatozė bei marfanoidiniai kūno bruožai; šeiminės skydliaukės medulinės karcinomos sindromui (ŠSMK) būdinga paveldima skydliaukės medulinė karcinoma, jiems nenustatomi kitiems sindromo potipiams būdingi pažeidimai [1,2]. MEN2 sindromui būdingų navikų atsiradimo dažnis skirtingais sindromo potipiais sergantiems pacientams pateiktas 1 lentelėje [1]. Skydliaukės medulinė karcinoma - pagrindinis MEN2 sindromo pažeidimas, atsirandanti beveik visiems sergantiesiems šiuo sindromu [1-3]. Tarp sergančiųjų skydliaukės meduline karcinoma net 15-30 proc. atvejų yra susiję su MEN2 sindromu [1-3].

MEN2 sindromą sukelia germinacinės *RET* protoonkogeno mutacijos, dėl kurių pakinta jo koduojamo ląstelės receptoriaus RET tirozino kinazės morfofunkcija, jis tampa nuolat aktyvuotu, net ir nesant ligandų [4-7]. *RET* protoonkogeną sudaro 21 egzonas [1,7]. RET tirozino kinazė embriogenezės metu reguliuoja ląstelių diferenciaciją, migraciją, proliferaciją, gyvybingumą, apoptozę [7,8]. *RET* protoonkogenas reikšmingas embriogenezės metu vystantis endokrininei organų sistemai - skydliaukės parafolikulinėms ląstelėms, antinksčių šerdinei daliai, taip pat virškinimo trakto autonominei nervų sistemai bei inkstams [1,7,8]. Išsivysčiusiame organizme šio protoonkogeno ekspresija vyksta tik nedaugelyje ląstelių, tarp jų skydliaukės parafolikulinėse ląstelėse, prieskydinių liaukų, antinksčių šerdinės dalies bei kai kuriose nervų sistemos ląstelėse, taip pat iš jų kilusiuose navikuose - skydliaukės medulinės karcinomos, feochromocitomos, neuroblastomos ląstelėse [1,6,7]. Įvykus mutacijai nepažeistame *RET* protoonkogeno alelyje sutrinka ląstelės augimas, diferenciacija, proliferacija, sutrinka apoptozės reguliacija, atsiranda navikinės ląstelės [4-8]. Pacientams, sergantiems MEN2 sindromu, yra nustatyta sąsaja tarp įvairių šį sindromą sukeliančių *RET* protoonkogeno mutacijų ir skirtingų sindromo potipių atsiradimo - genotipo sąsaja su fenotipu [9-13]. Šiuo metu literatūroje aprašytos ir eksperimentiniais tyrimais įrodytos aštuoniuose *RET* protoonkogeno egzonuose esančios mutacijos, kurios sukelia MEN2 sindromą [6,12,13]. MEN2 sindromą sukeliančių *RET* protoonkogeno mutacijų pasiskirstymas egzonuose ir kodonuose pateiktas 2 lentelėje [6,13]. Nustatytas didelis MEN2 sindromą sukeliančių *RET* protoonkogeno mutacijų penetrantiškumas, siekiantis 95-100 procentų [1,13,14].

1 lentelė. Dauginių endokrinių navikų sindromo antrojo tipo klinikos ypatumai (1).

Pažeidimai	Pažeidimų dažnis procentais		
	MEN2A	MEN2B	ŠSMK
Skydliaukės medulinė karcinoma	100	100	100
Feochromocitoma	50-60	50	-
Pirminis hiperparatiroidizmas	10-35	-	-
Hirschsprung liga	Retai	-	-
Odos lichen amiloidozė	9-24	-	-
Marfanoidiniai bruožai	-	92-100	-
Ganglioneuromatozė	-	96-100	-

ŠSMK - šeiminės skydliaukės medulinės karcinomos sindromas.

2 lentelė. MEN2 sindromą sukleiančių *RET* protoonkogeno mutacijų lokalizacija.

RET protoonkogeno egzonas	*RET* protoonkogeno kodonai, kuriuose įvykus mutacijoms atsiranda MEN2 sindromas
5	292
8	515, 532, 533
10	600, 603, 606, **609, 611, 618, 620, 630**
11	633 (dupl.), **634**, 635 (ins.), 649, 666
13	**768**, 777, **790, 791**
14	**804, 804 (+778; 805; 806; 904)**, 844
15	883, 891
16	912, **918**

MEN2 sindromą sukeliančių *RET* protoonkogeno mutacijų nustatymas ir molekulinės MEN2 sindromo patogenezės samprata svarbi klinikinėje praktikoje: atlikus genetinius tyrimus galima ne tik diagnozuoti MEN2 sindromą jam būdingais navikais jau sergantiems pacientams, bet ir nustatyti asimptominius sindromo paveldėtojus tarp MEN2 sindromu sergančiųjų pirmos eilės giminių. Genetinis MEN2 sindromo diagnozės pagrindimas įgalina MEN2 sindromu sergančius pacientus ir šio sindromo asimptominius paveldėtojus kryptingai tirti, stebėti, siekiant anksti diagnozuoti ikivėžinius susirgimus ir(ar) ankstyvas vėžio stadijas, laiku nustatyti grėsmingas endokrinopatijas, laiku pradėti gydymą, pritaikyti vėžio profilaktiką, pagerinti pacientų prognozę [1,2].

Darbo tikslas - nustatyti ir apibūdinti MEN2 sindromą sukeliančias *RET* protoonkogeno mutacijas, būdingas sergančiųjų MEN2 sindromu probandams Lietuvoje. Nustatyti MEN2 sindromo probandų dažnį tarp sergančiųjų skydliaukės meduline karcinoma Lietuvoje. Tai originalus mokslinis tyrimas.

TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Mokslinis tyrimas atliktas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Onkologijos klini-

koje. Darbui su tiriamaisiais pacientais ir genetiniams tyrimams atlikti gautas Lietuvos bioetikos komiteto Leidimas (2007-12-21 Nr. 57).

Kadangi iki atliekant šį tyrimą Lietuvoje dar nebuvo genetiškai diagnozuojamas MEN2 sindromas, MEN2 sindromo probandų buvo ieškoma tarp giminystės ryšiais nesusijusių pacientų, sergančiųjų skydliaukės meduline karcinoma, kuri yra pagrindinis, anksčiausiai ir beveik visiems sergantiesiems MEN2 sindromu atsirandantis navikas. Tyrime sutiko dalyvauti 47 giminystės ryšiais nesusiję skydliaukės meduline karcinoma sergantys pacientai: 34 moterys (72,3 proc.) ir 13 vyrų (27,7 proc.), pacientų amžiaus vidurkis - 46,1±13,8 metai (jauniausiam - 8 metai, vyriausiam - 76 metai). Pacientai tirti ir gydyti Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninėje Kauno klinikose bei Vilniaus universiteto Onkologijos institute ir Santariškių klinikose 2000-2010 metais. Visi pacientai buvo konsultuojami klinikinio genetiko prieš atliekant genetinius tyrimus ir juos atlikus klinikinio genetiko Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kauno klinikų Konsultacinėje poliklinikoje.

Pacientams buvo atlikti genetiniai *RET* protoonkogeno 8 padidintos rizikos egzonų tyrimai siekiant nustatyti germinacines MEN2 sindromą sukeliančias *RET* protoonkogeno mutacijas. Genetiškai diagnozavus MEN2 sindromą, pacientai tolimesniam ištyrimui ir gydymui buvo siunčiami endokrinologo konsultacijai.

Pacientų dezoksiribonukleininė rūgštis (DNR) išskirta iš 200 µl kraujo panaudojant DNR gryninimo rinkinį - SORPO®, pagal rinkinio apraše pateiktą standartinę DNR gryninimo iš kraujo metodiką. Siekiant nustatyti *RET* protoonkogeno mutacijas amplifikuoti 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15 ir 16 egzonai. Atliktos šių egzonų polimerazės grandininės reakcijos. Pradmenų poros panaudotos 8 *RET* protoonkogeno egzonams amplifikuoti pateiktos 3 lentelėje. Polimerazės grandininės reakcijos sąlygos: pradinė denatūracija - 94°C 3‘; amplifikacijos ciklas (ciklų skaičius 35) - denatūracija 94°C 30“, pradmenų hibridizacijos temperatūrų diapazonas priklausomai nuo amplifikuojamo egzono - 5, 8, 11, 14-15 egzonams - 54,0°C 30“, o 10, 13, 16 egzonams - 60,0°C 30“, DNR grandinės sintezė 72°C 45“; terminalinė sintezė 72°C 3‘; reakcijos pabaiga 4°C. Ciklinei sekoskaitos PGR reakcijai amplifikuojant 10, 13 ir 16 egzonus naudoti pirmojo PGR pradmenys (3 lentelė), o amplifikuojant 5, 8, 11, 14 bei 15 egzonus naudoti vidiniai pradmenys. Pradmenys panaudoti DNR sekoskaitai pateikti 4 lentelėje. PGR produktų sekoskaita atlikta naudojant kapiliarinį sekvenatorių - 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems),

3 lentelė. ***RET*** **protoonkogeno padidintos rizikos egzonų amplifikavimui naudoti pradmenys.**

Egzonas	Pradmens pavadinimas ir nukleotidų seka pradmenyje	PGR Produkto ilgis (bazių poros)
5	RET-5 F 5'-GCG CTC TGA TGT ACA CCT -3' RET-5 R 5'-TAC ACC AGC CTG TTT AGC AG -3'	1045
8	RET-8 F 5'-GCT GTT CCC TGT CCT TGG -3' RET-8 R 5'- CTA TGC TGG CAT CGA GAG C -3'	357
10	RET-10 F 5'-GGG CCT ATG CTT GCG ACA CCA -3' RET-10 R 5'-CCA GAG GGA GGG AGG GAA GTT T -3'	373
11	RET-11 F 5'-TGT AAG AGG GCA ATA GTG GTC -3' RET-11 R 5'-GAA CGG CAC CTC ATC ACA GTC -3'	667
13	RET-13 F 5'-AGA AGC CTC AAG CAG CAT CGT C -3' RET-13 R 5'-AGG AGC AGT AGG GAA AGG GAG AAA -3'	348
14-15	RET-14 F 5'-GTC CAC CCC CTT ACT CAT T -3' RET-15 R 5'-GGT TGA GCG GAG TTC TAA TTG -3'	977
16	RET-16 F 5'-GGC CTT CTC CTT TAC CCC TCC TT -3' RET-16 R 5'-CAG CCA TTT GCC TCA CGA ACA C -3'	337

4 lentelė. Vidiniai pradmenys, naudoti ciklinės sekoskaitos PGR reakcijai.

Egzonas	Vidinio pradmens pavadinimas	Nukleotidų seka pradmenyje	PGR produkto ilgis (bazės)
5	RET-5 F seq RET-5 R seq	5'-CTA TGG GCT GTG TGG GAC -3' 5'-CCC ATG AAG AGC GAG CAC -3'	714 694
8	RET-8 F seq	5'-CTT GGG CAC TAG CTG GAC GC-3'	344
11	RET-11 F seq RET-11 R seq	5'-CAT ACG CAG CCT GTA CCC A -3' 5'-AAA TGG GGG CAG AAC ACA G -3'	525 610
14	RET-14 R seq	5'-GGG CAT GGT GGG CTA GAG T -3'	460
15	RET-15 F seq	5'-ACA CAC CAC CCC TCT GCT -3'	399

5 lentelė. MEN2 sindromą sukeliančių ***RET*** **protoonkogeno mutacijos, jų dažnis, MEN2 sindromo potipis.**

Egzonas	Kodonas	Nukleotido substitucija		Baltymo pokyčiai	Atvejai (N)	Dažnis (%)	MEN2 sindromo potipis
10	611	TGC>TGG	c.1833C>G	p.C611W	2	25,0	MEN2A
10	618	TGC>CGC	c.1852T>C	p.C618R	1	12,5	MEN2A
11	634	TGC>CGC	c.1899T>C	p.C634R	2	25,0	MEN2A
13	791	TAT>TTT	c.2372A>T	p.Y791F	1	12,5	ŠSMK
16	918	ATG>ACG	c.2753T>C	p.M918T	2	25,0	MEN2B

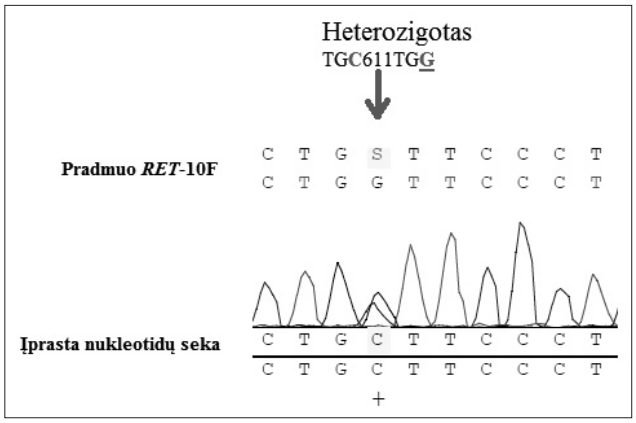
naudotas rinkinys - BigDye®Terminator v3.1, Cycle Sequencing Kit (BDT v3.1) (Applied Biosystems). Nustatytos DNR sekos analizuotos naudojant programinę įrangą - Vector NTI Advance™ 10 (Invitrogen).

Tyrimo duomenų statistinė analizė atlikta panaudojant SPSS Statistics 17.0 programą. Naudojant Shapiro-Wilk testą nustatyta, kad mūsų imtyje pacientų amžiui būdingas normalusis skirstinys (p>0,05), todėl vertindami pacientų, sergančių sporadine ir paveldima (dėl MEN2 sindromo atsiradusia) skydliaukės meduline karcinoma, naudojome Stjudento *t*-testą. Įvertinome MEN2 sindromui būdingų *RET* protoonkogeno mutacijų dažnį, santykinį dažnį, dažnio 95% pasikliautinius intervalus. Dažnių skirtumo palyginimui naudotas Pearson χ^2 kriterijus. Naudotas reikšmingumo lygmuo - p<0,05.

TYRIMO REZULTATAI

Išanalizavus 47 skydliaukės meduline karcinoma sergančių giminystės ryšiais nesusijusių pacientų *RET* protoonkogeno aštuonių egzonų [5, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16] sekoskaitos duomenis, 8 pacientams nustatėme MEN2 sindromą sukeliančias *RET* protoonkogeno mutacijas. MEN2 sindromą sukeliančios *RET* protoonkogeno mutacijos ir jų sukeliami MEN2 sindromo potipiai pateikti 5 lentelėje. MEN2 sindromą sukeliančios *RET* protooonkogeno mutacijos nustatytos 10, 11, 13 ir 16 egzonuose, o 5, 8, 14 ir 15 egzonuose MEN2 sindromą sukeliančių *RET* protoonkogeno mutacijų nenustatėme. MEN2 sindromo mutacijų dažnis tarp giminystės ryšiais nesusijusių pacientų, sergančių skydliaukės meduline karcinoma, mūsų tirtoje imtyje buvo 17,02 proc. (CI 95 proc. 6,4-27,7 proc.). Skydliaukės meduline karcinoma sergančių pacientų, kuriems diagnozuotos MEN2 sindromą sukeliančios *RET* protoonkogeno mutacijos, dažnis statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo sporadine skydliaukės meduline karcinoma sergančiųjų dažnio (p<0,001): jie buvo nustatomi rečiau nei sergantieji sporadine skydliaukės meduline karcinoma.

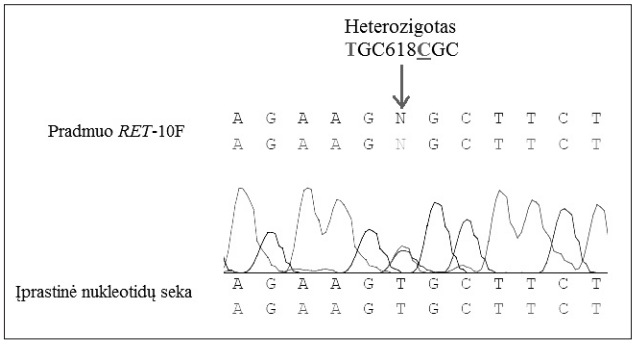
MEN2 sindromą sukeliančių *RET* protoonkogeno mutacijų kokybinis įvertinimas. *RET* protoonkogeno 10 egzono 611 kodono mutacijos įvertinimas. *RET* protoonkogeno dešimtame egzone dviem giminystės ryšiais nesusijusiems pacientams nustatėme 611 kodono mutaciją - c.1833C>G. *RET* protoonkogeno 10 egzono 611 kodono mutacija (chromatogama) pavaizduota 1 paveiksle. Abiem pacientams nustatyta analogiška mutacija. Analizuojant chromatogramą pastebime, kad pacientai yra heterozigotai šios mutacijos atžvilgiu: viename iš alelių įvykusi citozino substitucija guaninu, dėl kurios RET tirozino kinazėje pakeičiama amino rūgštis - cisteinas pakeičiamas triptofanu - p.C611W. Amino rūgšties pakeitimas įvyksta ekstraceliuliniame RET tirozino kinazės domene.



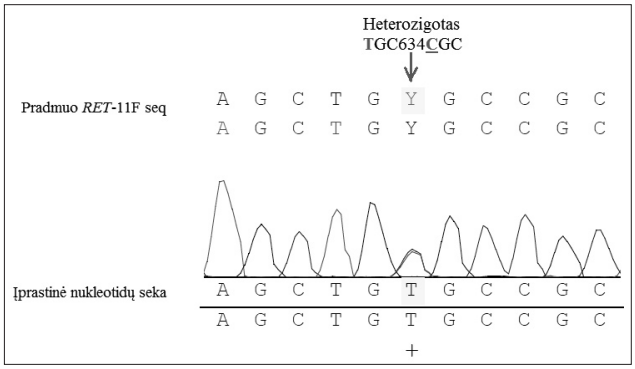
1 paveikslas. ***RET*** **protoonkogeno 10 egzono 611 kodono mutacijos chromatograma.**

***RET* protoonkogeno 10 egzono 618 kodono mutacijos įvertinimas.** *RET* protoonkogeno 10 egzono 618 kodono mutaciją - c.1852T>C nustatėme vienam skydliaukės meduline karcinoma sergančiam pacientui. *RET* protoonkogeno 10 egzono 618 kodono mutacija pavaizduota 2 paveiksle. Analizuojant chromatogramą pastebime, kad pacientas yra heterozigotas šios mutacijos atžvilgiu: viename iš alelių įvykusi timino substitucija citozinu, dėl kurios RET tirozino kinazėje pakeičiama amino rūgštis - cisteinas pakeičiamas argininu. Amino rūgšties pakeitimas įvyksta ekstraceliuliniame RET tirozino kinazės domene.

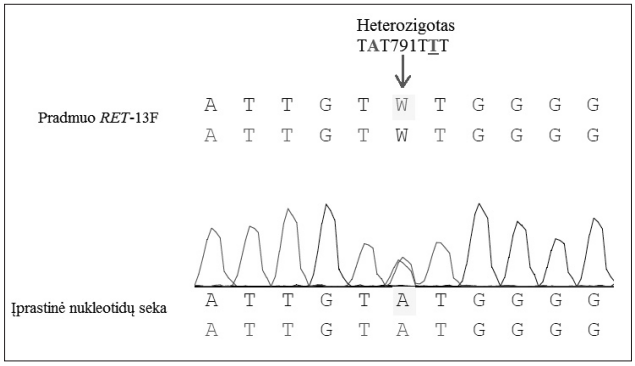
***RET* protoonkogeno 11 egzono 634 kodono mutacijos įvertinimas.** Dviem giminystės ryšiais nesusijusiems pacientams nustatėme *RET* protoonkogeno 11 egzono 634 kodono mutaciją - c.1899T>C, sukeliančią MEN2A sindromą. *RET* protoonkogeno 11 egzono 634 kodono mutacija pavaizduota 3 paveiksle. Abiem pacientams nustatyta identiška mutacija. Analizuojant chromatog-



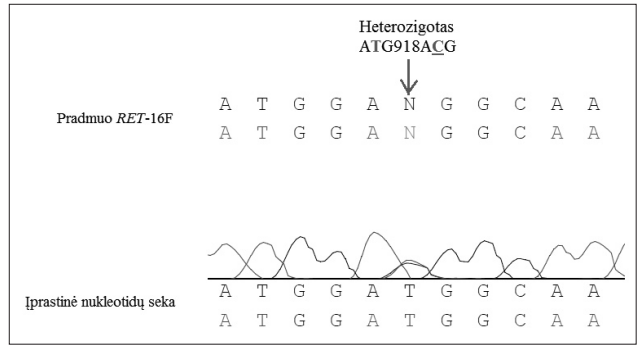
2 paveikslas. ***RET*** **protoonkogeno 10 egzono 618 kodono mutacijos chromatograma.**



3 paveikslas. ***RET*** **protoonkogeno 11 egzono 634 kodono mutacijos chromatograma.**



4 paveikslas. ***RET*** **protoonkogeno 13 egzono 791 kodono mutacijos chromatograma.**



5 paveikslas. ***RET*** **protoonkogeno 16 egzono 918 kodono mutacijos chromatograma.**

ramą pastebime, kad pacientai yra heterozigotai šios mutacijos atžvilgiu: viename iš alelių įvykusi timino substitucija citozinu, dėl kurios RET tirozino kinazėje pakeičiama amino rūgštis - cisteinas pakeičiamas argininu. Amino rūgšties pakeitimas įvyksta ekstraceliuliniame RET tirozino kinazės domene.

RET **protoonkogeno 13 egzono 791 kodono mutacijos įvertinimas.** *RET* protoonkogeno 13 egzono 791 kodono mutaciją - c.2372A>T, sukeliančią šeiminės skydliaukės medulinės karcinomos sindromą, nustatėme vienam pacientui, sergančiam skydliaukės meduline karcinoma. *RET* protoonkogeno 13 egzono 791 kodono mutacija pavaizduota 4 paveiksle. Analizuojant chromatogramą pastebime, kad pacientai yra heterozigotai šios mutacijos atžvilgiu: viename iš alelių įvykusi adenino substitucija timinu, dėl kurios RET tirozino kinazėje pakeičiama amino rūgštis - tirozinas pakeičiamas fenilalaninu. Amino rūgšties pakeitimas įvyksta intraceliuliniame RET tirozino kinazės domene.

RET **protoonkogeno 16 egzono 918 kodono mutacijos įvertinimas.** *RET* protoonkogeno 16 egzono 918 kodono mutaciją - c.2753T>C, sukeliančią MEN2B sindromą, nustatėme dviem giminystės ryšiais nesusijusiems skydliaukės meduline karcinoma sergantiems pacientams. *RET* protoonkogeno 16 egzono 918 kodono mutacija pavaizduota 5 paveiksle. Abiem pacientams nustatyta analogiška šio kodono mutacija. Analizuojant chromatogramą pastebime, kad pacientai yra heterozigotai šios mutacijos atžvilgiu: viename iš alelių įvykusi timino substitucija citozinu, dėl kurios RET tirozino kinazėje pakeičiama amino rūgštis - metioninas pakeičiamas treoninu. Amino rūgšties pakeitimas įvyksta intraceliuliniame RET tirozino kinazės domene. Ištyrus abiejų pacientų tėvus nustatėme, kad abiejose šeimose yra *de novo RET* protoonkogeno 16 egzono 918 kodono mutacija.

MEN2 sindromą sukeliančių *RET* protoonkogeno mutacijų įtaka skydliaukės medulinės karcinomos atsiradimo laikui nustatymas. Skydliaukės meduline karcinoma sergančių ir giminystės ryšiais nesusijusių pacientų, kuriems nustatyta MEN2 sindromą sukelianti *RET* protoonkogeno mutacija ir kuriems ši mutacija nenustatyta, amžiaus vidurkių palyginimas pateiktas 5 lentelėje. MEN2 sindromu sergantiems pacientams statistiškai reikšmingai anksčiau atsirasdavo skydliaukės medulinė karcinoma lyginant su sporadinės skydliaukės medulinės karcinomos atvejais - 29,8 vs. 49,5 metai (p=0,01), taip pat šiems pacientams skydliaukės medulinė karcinoma atsirasdavo anksčiau ir už bendrą sergančių skydliaukės meduline karcinoma ir giminystės ryšiais nesusijusių pacientų amžiaus vidurkį - 29,8 vs. 46,1 metai (p=0,025). Tarp bendros sergančiųjų skydliaukės meduline karcinoma grupės ir sporadine skydliaukės meduline karcinoma sergančių pacientų statistiškai reikšmingo amžiaus vidurkio skirtumo nenustatėme (p=0,211). (6 lentelė).

6 lentelė. ***RET*** **protoonkogeno įtaka skydliaukės meduline karcinoma sergančių pacientų amžiui.**

Požymis	SMK (ne giminės) bendras	Sporadinė SMK	SMK MEN2	p
Amžius (metai)	46,1±13,8	49,5±10,7	29,8±16,1	0,01

SMK - skydliaukės medulinė karcinoma
SMK MEN2 - skydliaukės medulinė karcinoma, sukelta MEN2 sindromo

Bendroje sergančiųjų skydliaukės meduline karcinoma grupėje ši liga statistiškai reikšmingai dažniau diagnozuota moterims (N34) nei vyrams (N13) - 72,3 proc. (PI 95 proc. 61,5-87,2 proc.) vs. 27,7 proc. (PI 95 proc. 12,8-38,5 proc.) (p=0,002), reikšmingas skirtumas išliko ir pacientų, kuriems nenustatyta mutacija grupėje, - moterys (N29) vs. vyrai (N10) – 74,4 proc. (PI 61,5-87,2 proc.) vs. 25,6 proc. (PI 95 proc. 12,8-38,5 proc.) (p=0,002). Tačiau skydliaukės meduline karcinoma sergančių ir MEN2 sindromą sukeliančias *RET* protoonkogeno mutacijas paveldėjusių pacientų grupėje

skirtumas tarp moterų (N5) ir vyrų (3) buvo statistiškai nereikšmingas - 62,4 proc. (PI 95 proc. 25,0-87,0 proc.) vs. 37,5 proc. (PI 95 proc. 12,5-75,0 proc.) (p=0,48).

REZULTATŲ APTARIMAS

Dauginių endokrininių navikų sindromo antrasis tipas - retas autosominiu dominantiniu būdu paveldimas endokrininės organų sistemos dauginius navikus sukeliantis sindromas. Šio sindromo atsiradimo dažnis bendroje populiacijose yra 2,5-3 atvejai 100 000 žmonių [3,12]. Tarp sergančiųjų skydliaukės meduline karcinoma MEN2 sindromas nustatomas 15-30 proc. atvejų [3,12]. Tai labai retas sindromas, kurį galima nustatyti tarp taip pat reto skydliaukės naviko: skydliaukės medulinė karcinoma sudaro apie 4 proc. visų skydliaukės navikų. Lietuvoje kasmet vidutiniškai diagnozuojama apie 11 skydliaukės medulinės karcinomos atvejų. Tai pagrindžia mūsų imties tūrį - 47 giminystės ryšiais nesusiję skydliaukės meduline karcinoma sergantys pacientai. Mūsų tyrimo duomenys atitinka literatūros duomenis: nustatytas MEN2 sindromo probandų, sergančių skydliaukės meduline karcinoma, dažnis tarp visų tirtų skydliaukės meduline karcinoma sergančių pacientų buvo 17,02 proc. (PI 6,4-27,7 proc.). Reikėtų atkreipti dėmesį į tai, kad pacientų šeimose yra ir daugiau MEN2 sindromu sergančių pacientų, kurie tyrime nedalyvavo, todėl MEN2 sindromo dažnis bendroje skydliaukės meduline karcinoma sergančiųjų populiacijoje gali būti didesnis nei mūsų nustatytas dažnis.

Literatūros duomenimis, tarp sergančiųjų MEN2 sindromu dažniausiai nustatomas MEN2A sindromas (56-90 proc. atvejų), kiek rečiau - šeiminės skydliaukės medulinės karcinomos sindromas (20-35 proc. atvejų), rečiausiai - MEN2B sindromas (5-9 proc. atvejų) [3,12]. Įvertinus genetinių tyrimų bei klinikinius duomenis, taip pat pacientų šeimos anamnezę, nustatėme, kad mūsų tirtoje imtyje dažniausiai nustatytos MEN2A sindromą sukeliančios *RET* protoonkogeno mutacijos bei šis sindromas (62,5 proc.), kiek rečiau - MEN2B (25,0 proc.), rečiausiai - šeiminės skydliaukės medulinės karcinomos sindromą (12,5 proc.). MEN2 sindromui būdinga tai, kad navikai atsiranda anksčiau nei sporadiniais atvejais [1-3]. Mūsų tirtoje imtyje MEN2 sindromą sukeliančias *RET* protoonkogeno mutacijas paveldėjusiems pacientams skydliaukės medulinė karcinoma atsirasdavo statistiškai reikšmingai anksčiau nei sporadiniais atvejais - 29,8 vs. 49,5 metai (p=0,01).

Literatūros duomenimis, nenustatyta statistiškai reikšmingo vyrų ir moterų sergamumo MEN2 sindromu ar jam būdingais navikais dažnių skirtumo [1]. Mūsų tirtoje imtyje sporadine skydliaukės meduline karcinoma moterys sirgdavo statistiškai reikšmingai dažniau nei vyrai - 72,3 proc. vs. 27,7 proc. (p=0,002), tačiau tarp MEN2 sindromui būdingas *RET* protoonkogeno mutacijas turinčių pacientų nenustatytas statistiškai reikšmingas dažnių skirtumas - 62,4 proc. vs. 37,5 proc. (p=0,48). Tai galima paaiškinti tuo, kad paveldima skydliaukės medulinė karcinoma atsirada dėl *RET* protoonkogeno mutacijų, kurios paveldimos autosominiu dominantiniu būdu, esant 50 proc. paveldėjimo tikimybei bei beveik pilnai išreikštam mutacijos penetrantiškumui, neturėtų būti reikšmingo vyrų ir moterų sergamumo paveldima skydliaukės meduline karcinoma dažnių skirtumo.

Mūsų atlikto tyrimo metu nustatėme literatūroje aprašytas, dažniausiai pasitaikančias MEN2 sindromą sukeliančias *RET* protoonkogeno mutacijas (2,9-13), esančias 611, 618, 634 bei 918 kodonuose, taip pat kiek rečiau nustatomą - 791 kodono mutaciją. Šių mutacijų įtaka MEN2 sindromo atsiradimui įrodyta eksperimentiniais tyrimais, pagrįsta klinikiniais tyrimais bei praktika [13,15,16-18]. Tarp sergančiųjų MEN2 sindromu dažniausiai atsiranda ekstraceliulinio RET tirozino kinazės domeno amino rūgščių sudėtį pakeičiančių *RET* protoonkogeno mutacijų, sukeliančių MEN2A bei šeiminės skydliaukės medulinės karcinomos sindromus, rečiau - intraceliulinio, dėl kurio dažniausiai atsiranda šeiminės skydliaukės medulinės karcinomos bei MEN2B sindromai [3,6,10-13,19]. Įvykus vieno nukleotido substitucijai *RET* protoonkogene, pakinta ląstelės membranos receptoriaus RET tirozino kinazės struktūra ir funkcija: receptorius tampa nuolat aktyvuotas net ir nesant ligandų [4-8]. Įvykus *RET* protoonkogeno mutacijoms, dėl kurių pakeičiama amino rūgštis ekstraceliuliniame RET tirozino kinazės domene, įvyksta receptoriaus monomerų dimerizacija nesant ligandų, dėl ko fosforilinama intraceliulinė receptoriaus dalis, aktyvuojamas intaceliulinis signalo perdavimas [6,19]. Net 5 iš 8 mūsų tirtų pacientų (611, 618, 634 kodonų mutacijos) MEN2 sindromas atsirado dėl šio RET tirozino kinazės aktyvavimo mechanizmo. Įvykus *RET* protoonkogeno mutacijoms, dėl kurių pakaičiama amino rūgštis intraceliuliniame RET tirozino kinazės domene, būna aktyvuoti net šio receptoriaus monomerai [19]. Mūsų tirtoje imtyje 3 pacientams (791, 918 kodonų mutacijos) MEN2 sindromas atsirado dėl šio RET tirozino kinazės aktyvinimo mechanizmo.

MEN2B sindromą sukeliančios *RET* protoonkogeno *de novo* mutacijos nustatomos apie 50 proc. šio sindromo atvejų [3,12]. Tarp mūsų tirtų pacientų abiem MEN2B sindromu sergantiems pacientams nustatytos

germinacinės *RET* protoonkogeno 16 egzono 918 kodono *de novo* mutacijos. Šeiminės anamnezės nebuvimas, taip pat naujai atsiradusios mutacijos apsunkina MEN2B sindromo diagnostiką.

Sergantiesiems MEN2 sindromu yra nustatyta genotipo sąsaja su ligos fenotipu: paveldėjus konkrečią *RET* protoonkogeno mutaciją galima prognozuoti, kuris MEN2 sindromo potipis atsiras, kokia skirtingų navikų atsiradimo rizika ar net klinikinė eiga [3,9-12]. Atsižvelgiant į tai pacientai skirstomi į tris rizikos kategorijas, kurios padeda pasirinkti tinkamą skydliaukės medulinės karcinomos profilaktikos strategiją. Šiuo metu MEN2 sindromui būdingas *RET* protoonkogeno mutacijas paveldėjusiems pacientams visuotinai priimta radikali skydliaukės medulinės karcinomos profilaktika - dažniausiai sindromo paveldėtojams atliekama profilaktinė tiroidektomija [3,12,20]. Atsiradus galimybei genetiškai diagnozuoti asimptominius MEN2 sindromo paveldėtojus šiuo metu retai taikomas pacientų stebėjimas siekiant anksti diagnozuoti skydliaukės medulinę karcinomą ir jai atsiradus pradėti gydymą, nes atsiradus skydliaukės medulinei karcinomai didėja jos išplitimo rizika, blogėja pacientų prognozė [3,20]. Atsižvelgiant į MEN2 sindromą sukeliančią mutaciją skiriamos aukštos rizikos grupė (jai priskiriamos 609, 790, 791, 804, 649, 891 bei 768 kodonų mutacijos, sindromo paveldėtojams profilaktinę tiroidektomiją rekomenduojama atlikti 5-10 metų amžiaus), aukštesnės - (jai priskiriamos 611, 618, 620, 630, 631 ir 634 kodonų mutacijos, sindromo paveldėtojams profilaktinę tiroidektomiją rekomenduojama atlikti 5-6 metų amžiaus), aukščiausios - (jai priskiriamos 883 ir 918 kodonų mutacijos, šių mutacijų paveldėtojams rekomenduojama profilaktinę tiroidektomiją atlikti iki 1 metų amžiaus, o vyresniems pacientams - iš karto nustačius genetinę diagnozę) [3,12,20]. Tarp mūsų tirtų pacientų atsižvelgiant į nustatytą MEN2 sindromui būdingą *RET* protoonkogeno mutaciją, aukštos rizikos grupei buvo priskitas 1 pacientas (791 kodono mutacija), aukštesnės - 5 (611, 618, 634 kodonų mutacijos), aukščiausios - 2 (918 kodono mutacija). Įvertinus *RET* protoonkogeno mutacijas ir jų keliamą riziką dėl MEN2 sindromo atsiradusios skydliaukės medulinės karcinomos atveju galima ne tik įvertinti šio naviko agresyvumą bei klinikinę eigą, bet ir prognozuoti kitų navikų atsiradimo tikimybę, be to, šios rizikos įvertinimas svarbus ir pacientų pirmos eilės giminėms, tarp kurių, genetiniais tyrimų būdais nustačius MEN2 sindromo paveldėtojus, galima įvertinti jų MEN2 sindromo eigos riziką, pasirinkti tinkamą skydliaukės medulinės karcinomos profilaktikos strategiją.

IŠVADOS

1. Giminystės ryšiais nesusijusių pacientų, sergančių skydliaukės meduline karcinoma, imtyje MEN 2 sindromą sukeliančių germinacinių *RET* protoonkogeno mutacijų ir šio sindromo probandų dažnis Lietuvoje buvo 17,02 proc. (PI 6,4-27,7 proc.).

2. Skydliaukės meduline karcinoma segantiesiems pacientams, kuriems nustatytos MEN2 sindromą sukeliančios germinacinės *RET* protoonkogeno mutacijos, dažniausiai (62,5 proc. atvejų) buvo nustatomos MEN2A sindromą sukeliančios mutacijos, esančios 611, 618, 634 kodonuose, rečiau (25,0 proc. atvejų) - MEN2B sindromą sukelianti mutacija, esanti 918 kodone, rečiausiai - šeiminės skydliaukės medulinės karcinomos sindromą sukelianti mutacija, esanti 791 kodone. Visi pacientai, kuriems nustatomos MEN2 sindromą sukeliančios germinacinės *RET* protoonkogeno mutacijos, buvo heterozigotai mutacijos atžvilgiu.

3. Skydliaukės meduline karcinoma sergantiems pacientams, kuriems nustatytos MEN2 sindromą sukeliančios germinacinės *RET* protoonkogeno mutacijos, dažniausiai nustatytos ekstraceliulinio *RET* tirozino kinazės domeno amino rūgščių sudėtį keičiančios MEN2 sindromą sukeliančios germinacinės *RET* protoonkogeno mutacijos - 62,5 proc., rečiau - intraceliulinio - 37,5 proc.

4. Pacientai, kuriems nustatytos MEN2 sindromą sukeliančios germinacinės *RET* protoonkogeno mutacijos, skydliaukės meduline karcinoma susirgdavo statistiškai reikšmingai anksčiau nei šių mutacijų neturintieji - 29,8 vs. 49,5 metai (p=0,01).

Literatūra

1. Juodelė L, Juozaitytė E, Žindžius A, Pundzius J. Dauginių endokrininių navikų sindromai. Antrasis tipas. Medicina (Kaunas), 2005; 41(4):281-94.

2. Raue F, Frank-Raue K. Update multiple endocrine neoplasia type 2. Familial cancer 2010; 9(3):449-57.

3. Kloos RT, Eng Ch, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H et al. Medullary Thyroid Cancer: Management Guidelines of the American Thyroid Association. Thyroid 2009; 19(6):565-612.

4. Hansford JR, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. J Mol Genet 2000; 37:817-827.

5. Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. Cancer 2005; 5: 367-375.

6. Arighi E, Borello MG, Sariola H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. Cytocine and Growth Facator Reviews 2005; 16:441-467.

7. Murakumo Y, Jijiwa M, Asai N, Ichihara M, Takahashi M. RET and neuroendocrine tumors. Pituitary 2006; 9:179-192.

8. Lai AZ, Gujral TS, Mulligan LM. RET Signaling in Endocrine Tumors: Delving Deeper into Molecular Mechanisms. Endocr Pathol 2007; 18:57-67.

9. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel R at al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and diseas phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. JAMA 1996; 276:1575-9.

10. Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG et al. Genotype-phenotype correlations in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the International RET Mutation Consortium. J int Med 1995; 238:343-346.

11. Frank-Raue K, Hoppner W, Frilling A et al. Mutations of the RET proto-oncogene in German multiple endocrine neoplasia families: relation between genotype and phenotype. J Clin Endocr Metab 1996; 81:1780-1783.

12. Raue F, Frank-Raue K. Genotype-phenotype relationship in multiple endocrine neoplasia type 2. Implications for clinical management. Hormones 2009; 8(1):23-28.

13. Margraf RL, Crockett DK, Krautscheid P et al. Multiple endocrine neoplasia type 2 RET protooncogene database: repository of MEN2-associated RET sequence variation and reference for genotype/phenotype correlations. Hum Mutat 2009; 30(4):548-56.

14. Ioana N Milos[1,2], Karin Frank-Raue[3], Nelson Wohllk[4] et al. Age-related neoplastic risk profiles and penetrance estimations in multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germ line RET Cys634Trp (TGC>TGG) mutation. Endocrine-Related Cancer 2008; 15(4):1035 -1041.

15. Mulligan LM, Eng C, Attie T, Lyonnet S, Marsh DJ, Hyland VJ et al. Divers phenotypes associated with exon 10 mutations of the RET proto-oncogene. Hum Mol Genet 1994; 3:2163-2167.

16. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Laimore TC et al. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN2A and FMTC. Hum Mol Genet 1993; 2:851-856.

17. Carlson KM, Dou S, Chi D, Scavarda N, Toshima K, Jackson CE at al. Single missens mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET proto-oncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:1579-83.

18. Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y et al. Mutation in the RET protooncogene assotiated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. Nature 1994; 367:375-376.

19. Plaza-Menacho I, Burzynski GM, de Groot JW, Eggen BJL, Hofstra RMW. Current concepts in RET-ralated genetics, signaling and therapeutics. Trens in Genetics 2006; 22(11):627-636.

20. Brandi ML, Gagel R, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C et al. Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2.

QUALITATIVE ANALYSIS OF RET PROTOONCOGENE MUTATIONS CAUSING THE SECOND TYPE OF MULTIPLE ENDOCRINE NEOPLASIA SYNDROME IN LITHUANIA

Linas Juodelė, Danielius Serapinas, Laimutis Kučinskas, Danutė Mazgelienė, Elona Juozaitytė

Summary

Key words: multiple endocrine neoplasia type 2, MEN2 syndrome, RET protooncogene, genetic analysis.

Introduction. Multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2) is a rare syndrome, inherited in an autosomal dominant pattern, characterized by combination of medullary thyroid carcinoma with pheochromacytoma, tumors of the parathyroid glands and more rare tumors. Therefore, up till now there are no data about RET protooncogene mutations causing MEN2 syndrome in Lithuania.

The aim of the study. To determine and evaluate RET protooncogene mutations in patients with MEN2 syndrome in Lithuania. To determine frequency of MEN2 syndrome probands in patients with medullary thyroid carcinoma in Lithuania.

Methods. A total of 47 unrelated patients with medullary thyroid carcinoma were enrolled into the study. Patients underwent genetic testing by DNA sequencing, detecting germline mutations causing MEN2 syndrome.

Results. RET protooncogene mutations causing MEN2 syndrome were detected in 8 patients of the 47 medullary thyroid carcinoma cases – 17.02% (CI 95% 6.4 – 27.7%). The most frequent RET protooncogene mutations (in 611 (N2), 618(N1), 634 (N2) codons) were detected to cause MEN2A syndrome (62.5%), less frequent mutation in 918 codone (N2) that caused MEN2B syndrome, most rare – familial medullary thyroid carcinoma syndrome causative mutation in 791 codone (N1). In patients with detected MEN2 syndrome causative mutations in RET protooncogene, medullary thyroid carcinoma manifested in younger age – 29.8 ±16.1 years, comparing with sporadic cases – 49.5±10.7 years.

Conclusions. For the first time in Lithuania in unrelated patients with medullary thyroid carcinoma detected frequency of probands and germline RET protooncogene mutations causing MEN2 syndrome was 17.02 (CI 95% 6.4 – 27.7%). The study has also assessed the potential role of RET protooncogene mutations to the clinical features of medullary thyroid carcinoma.

Correspondence to: juodele@hotmail.com

Gauta 2011-04-27

■