

DOI: 10.31793/1680-1466.2021.26-2.105

# Порівняльне імуногістохімічне дослідження BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних і BRAF<sup>V600E</sup>-негативних радіогенних і спорадичних папілярних тиреоїдних карцином

Л.Ю. Зурнаджи<sup>1</sup>,  
Т.І. Рагунович<sup>2</sup>,  
В.О. Саєнко<sup>2</sup>,  
М.Ю. Болгов<sup>1</sup>,  
С.В. Масюк<sup>3</sup>,  
С.В. Бурко<sup>1</sup>,  
Т.Л. Дегтярєва<sup>1</sup>,  
С.В. Чернишов<sup>1</sup>,  
С.В. Гулєватий<sup>1</sup>,  
Н. Міцутаке<sup>2</sup>,  
М.Д. Тронько<sup>1</sup>,  
Т.І. Богданова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

<sup>2</sup>Інститут захворювань, пов'язаних із наслідками вибуху атомної бомби, університету Нагасакі (Японія)

<sup>3</sup>ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»

**Резюме.** Найпоширенішою точковою мутацією в папілярній тиреоїдній карциномі (ПТК) є BRAF<sup>V600E</sup>, яку пов'язують із більш агресивною поведінкою пухлини. Тим часом дані про частоту цієї мутації в різних вікових групах пацієнтів при наявності або відсутності радіаційного впливу в анамнезі вельми суперечливі. У більшості зазначених досліджень не використовувалися адекватні контрольні групи та/або не оцінювалися інвазійні властивості ПТК. **Мета** — порівняння за допомогою імуногістохімічного (ІГХ) дослідження частоти експресії мутантного білка BRAF<sup>V600E</sup> в однакових за віком на момент операції групах хворих із радіогенними та спорадичними ПТК і оцінювання інвазійних властивостей BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних і BRAF<sup>V600E</sup>-негативних ПТК в обох серіях. **Матеріал і методи.** ІГХ дослідження виконані на 247 радіогенних ПТК (105 — діти ≤14 років, 52 — підлітки 15-18 років, 91 — дорослі 19-28 років на момент операції) і 138 спорадичних ПТК (39 — діти, 37 — підлітки, 62 — дорослі зазначеного вище віку). ІГХ дослідження проводили з антитілами anti-BRAF (mutated V600E) antibody (VE1) ab228461 (Abcam). **Результати.** У радіогенних ПТК частота експресії мутантного білка BRAF<sup>V600E</sup>, що свідчить про наявність BRAF<sup>V600E</sup> мутації, була істотно нижче, ніж у спорадичних ПТК (10,5% і 30,4%,  $p=2,67E-06$ ); частота мутації підвищувалася з віком пацієнтів в обох серіях. За порівняння BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних і BRAF<sup>V600E</sup>-негативних радіогенних ПТК статистично значущі відмінності відзначені в частотах більшості вивчених характеристик. Із боку домінантної структури в радіогенних BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних ПТК переважає типова папілярна, а в радіогенних BRAF<sup>V600E</sup>-негативних ПТК — солідно-трабекулярна ( $p=1,12E-06$  і  $p=0,001$  відповідно).

© Л.Ю. Зурнаджи, Т.І. Рагунович, В.О. Саєнко, М.Ю. Болгов, С.В. Масюк, С.В. Бурко, Т.Л. Дегтярєва, С.В. Чернишов, С.В. Гулєватий, Н. Міцутаке, М.Д. Тронько, Т.І. Богданова

## Оригінальні дослідження

но). Частота всіх основних показників інвазійності в  $BRAF^{V600E}$ -позитивних радіогенних ПТК була статистично значимо нижче, ніж у  $BRAF^{V600E}$ -негативних ПТК. За частотою більшості вивчених характеристик  $BRAF^{V600E}$ -позитивні спорадичні ПТК не відрізнялися від  $BRAF^{V600E}$ -негативних, або ж, як і в радіогенних ПТК, окремі показники інвазійності були нижче, ніж у  $BRAF^{V600E}$ -негативній групі, наприклад, лімфатично-кровоносна інвазія ( $p=7,46E-06$ ) або наявність N1b метастазів ( $p=0,025$ ).  $BRAF^{V600E}$ -позитивні ПТК з обох серій (на відміну від  $BRAF^{V600E}$ -негативних) практично не мали суттєвих статистичних розбіжностей у порівнянні між собою по всім вивченим показникам. **Висновки.**  $BRAF^{V600E}$  мутація більш властива спорадичним, ніж радіогенним ПТК у всіх вікових групах, і її частота збільшується з віком пацієнтів в обох серіях. Порівняно з  $BRAF^{V600E}$ -негативними пухлинами  $BRAF^{V600E}$ -позитивні ПТК характеризувалися нижчими (радіогенні) або подібними (спорадичні) інвазійними властивостями в пацієнтів у віці до 28 років на момент операції в обох етіологічних серіях, що вказує на те, що  $BRAF^{V600E}$  мутація не асоціюється з більш агресивним перебігом захворювання у хворих молодого віку, незалежно від етіології ПТК.

**Ключові слова:** спорадична папілярна тиреоїдна карцинома, радіогенна папілярна тиреоїдна карцинома,  $BRAF^{V600E}$  мутація, імуногістохімічне дослідження.

Загальновідомо, що головними чинниками розвитку ПТК, як у дорослих, так і в дітей та підлітків, є зміни в мітоген-активованому протеїнкіназному сигнальному шляху. Цей шлях активує порушення в різних генах, найчастіше перебудови в гені *RET* (*RET-PTC* перебудови), та точкові мутації, найчастіше  $BRAF^{V600E}$  мутацію.

У перше десятиліття після аварії на Чорнобильській АЕС (ЧАЕС) розвиток ПТК (головним чином у дітей) був обумовлений, в основному, *RET/PTC3* перебудовами в гені *RET* [1-3], а після першого десятиліття спостерігався різний спектр перестановок у таких генах, як *RET*, *NTRK* та інших [4-6], зі зміщенням від *RET/PTC3* до *RET/PTC1* перебудов [5].

При проведенні молекулярно-біологічних досліджень щодо виявлення  $BRAF^{V600E}$  мутації в післячорнобильських ПТК отримано не однакові результати та зроблено іноді протилежні висновки. Так, одні дослідники повідомляли про значне зниження частоти  $BRAF^{V600E}$  мутації в ПТК хворих, які були опромінені внаслідок аварії на ЧАЕС [7-8], але при цьому використовували неадекватний за віком та місцем проживання неопромінений контроль. Інші дослідники використали як контроль випадки ПТК, видалені в дітей, що були народжені після аварії на ЧАЕС, і не знайшли  $BRAF$  мутації, як в опроміненій, так і в неопроміненій дитячих групах хворих України [9]. Між тим, вони відмічали, що частота  $BRAF$  мутації

в післячорнобильських ПТК суттєво зростала зі збільшенням віку пацієнтів, але порівняння з неопроміненними випадками не проводили.

Пізніше, з'явилися дані, які підтверджували відсутність  $BRAF$  мутації в післячорнобильських дитячих ПТК, але свідчили за наявність такої мутації в спорадичних ПТК, видалених у дітей, народжених після аварії на ЧАЕС [10].

На випадках ПТК, виявлених за результатами скринінгових обстежень мешканців забруднених регіонів України (дітей та підлітків на момент аварії на ЧАЕС) за Українсько-Американським тиреоїдним проектом встановлено, що доза опромінення щитоподібної залози (ЩЗ)  $^{131}I$  у хворих із ПТК (дорослі за віком на час операції) з наявною  $BRAF$  мутацією була суттєво нижчою за таку, що отримали хворі з генетичними перебудовами в ПТК [4, 6].

Слід зазначити, що в останні роки багато уваги приділяється можливості виявити  $BRAF^{V600E}$  мутацію в ПТК за допомогою ІГХ досліджень експресії мутантного білка  $BRAF^{V600E}$ , причому результати отримані паралельно молекулярно-генетичними та ІГХ методами повністю збігаються [11-17]. Це відкриває широкі можливості застосування ІГХ у виявленні  $BRAF^{V600E}$  мутації в ПТК на архівному патологічному матеріалі. Ми не знайшли публікацій щодо ІГХ досліджень із виявлення  $BRAF^{V600E}$  мутації в післячорнобильських ПТК.

**Мета роботи** — порівняння за допомогою ІГХ дослідження частоти експресії мутантного білка BRAF<sup>V600E</sup> в однакових за віком на момент операції групах хворих із радіогенними та спорадичними ПТК і оцінювання інвазійних властивостей BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних і BRAF<sup>V600E</sup>-негативних ПТК.

## Матеріал і методи

Вся інформація для аналізу отримана з клінічної бази даних ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України» (ІЕОР) за допомогою медичної інформаційної системи «TerDer» [18], з бази даних міжнародного проєкту «Чорнобильський банк тканин» (ЧБТ) [19] та гістопатологічної бази даних лабораторії морфології ендокринної системи ІЕОР. Дослідження узгоджено з Біоетичним Комітетом ІЕОР згідно з дозволами від 26.04.2018 р. (№ 22-КЕ) і 27.02.2020 р. (№ 31-КЕ) та з ЧБТ (проєкт № 001-2020).

Гістологічна обробка біопсійного матеріалу проводилася за стандартним протоколом, розробленим для ЧБТ [19, 20]. При цьому визначали масу та розмір часток ЩЗ; розмір пухлини/пухлин, її/їхню локалізацію в залозі, щільність і колір; розмір, кількість, щільність і колір усіх видалених лімфовузлів.

Фіксацію зразків проводили в 10% розчині нейтрального формаліну, подальшу гістологічну обробку — в автоматі «ASP200S» («Leica Biosystems», Німеччина). Занурення зразків у парафін здійснювали за допомогою пристрою «LAMB» («Ames Company», Великобританія). Кількість отриманих парафінових блоків залежала від розміру пухлини та числа видалених лімфовузлів. Мікротомію парафінових блоків проводили на ротаційному мікротомі «RM 2125 RTS» («Leica Biosystems», Німеччина), що дозволяло отримувати серійні зрізи для одночасного оглядового морфологічного та ІГХ досліджень. Препарати забарвлювали гематоксиліном і еозином, вивчали в мікроскопах «Leica Biosystems» і «Carl Zeiss» (Німеччина). Остаточний патологічний діагноз узгоджено з останньою класифікацією 4-го видання Всесвітньої організації охорони здоров'я [21]. Переважна більшість випадків була додатково проаналізована групою міжнародних експертів-патологів ЧБТ проєкту [19,

20]. Діагноз ПТК було підтверджено в усіх наведених випадках. Категорії pTNM визначали за 7-м і останнім 8-м виданнями міжнародної Класифікації злоякісних пухлин [22, 23].

ІГХ дослідження проводили у відділі радіаційної молекулярної епідеміології Інституту захворювань, пов'язаних із наслідками вибуху атомної бомби, університету Нагасакі (Японія). Протокол ІГХ дослідження включав депарафінізацію, дегідратацію зрізів із наступним промиванням у фосфатному буфері, демаскувальну обробку (витримка в автоклаві при 120 °С протягом 15 хв у буфері CC1 («Ventana Medical Systems», США)), блокування неспецифічного забарвлення та ендогенної пероксидазної активності, інкубацію у вологій камері з мишачими моноклональними anti-BRAF (mutated V600E) antibody (VE1) ab228461 (Abcam) («Abcam», США) в розведенні 1:100 при температурі 37 °С протягом 1 год. Для виявлення продукту ІГХ реакції використовували систему візуалізації «Novolink Polymer Detection System» («Leica Biosystems», Німеччина), яка включала обробку вторинними кролячими антимишачими антитілами (IgG), що входили до вказаної системи, промивку у фосфатному буфері, приєднання пероксидазної мітки та власне візуалізацію продукту реакції за допомогою хромогена DAB, розчиненого у відповідному буфері («Leica Biosystems», Німеччина). Ядра клітин дофарбовували гематоксиліном Майєра. Зрізи зневоднювали в серії спиртів зростальних концентрацій, просвітлювали ксилолом і заключали в синтетичну полімерну середу. ІГХ реакцію вважали за позитивну (експресія мутантного білка BRAF<sup>V600E</sup>) за наявності брунатного забарвлення цитоплазми епітеліальних клітин пухлини. Як позитивний контроль використовували зрізи ПТК із зареєстрованою наявністю BRAF<sup>V600E</sup> мутації молекулярно-біологічним методом полімеразно-ланцюгової реакції.

Для проведення ІГХ досліджень щодо виявлення частоти BRAF<sup>V600E</sup> мутації в радіогенних і спорадичних ПТК парафінові блоки з наявною тканиною пухлини ЩЗ відбиралися з випадків ПТК, прооперованих в ІЕОР протягом періоду з 1990 до 2015 року, тобто з моменту вірогідного зростання в Україні захворюваності на тиреоїдний рак. Враховуючи, що найвищий ризик

## Оригінальні дослідження

розвитку раку ЩЗ після аварії на ЧАЕС спостерігався в наймолодших дітей, які проживали в найбільш забруднених  $^{131}\text{I}$  регіонах України [24, 25], ми визначили радіогенні випадки як ті, що були видалені в дітей віком  $\leq 4$  років на момент аварії на ЧАЕС, які мешкали в Київській, Чернігівській та Житомирській областях. Додатково хворі були розподілені за віком на час операції на дітей ( $\leq 14$  років), підлітків (15-18 років) та молодих дорослих (19-28 років).

Група порівняння – спорадичні випадки ПТК – відібрана серед осіб, що народилися після аварії на ЧАЕС (з 1 січня 1987 року, або пізніше, тобто не зазнали дії  $^{131}\text{I}$ ), збігалися за віком на час операції та проживали в тих самих областях, як і хворі з радіогенними випадками, або в місті Києві. Зважаючи на те, що хворі зі спорадичними випадками на час проведення дослідження не перевищували за віком 28 років, до радіогенних випадків у разі порівняльного аналізу також не включено хворих віком понад 28 років на час операції.

Для проведення ІГХ дослідження відібрано парафінові блоки від 247 радіогенних ПТК (105 – діти, 52 – підлітки, 91 – дорослі) і 138 спорадичних ПТК (39 – діти, 37 – підлітки, 62 – дорослі).

Дози опромінення ЩЗ внаслідок дії  $^{131}\text{I}$  були розраховані для кожного пацієнта у відділі дозиметрії ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» з використанням екологічної дозиметричної моделі, яка містить систему екологічного транспорту йоду та біокінетичні моделі йоду за системою, що використовувалася для випадків ЧБТ («TD-СТВ») [24, 25] залежно від наявності прямих вимірювань активності ЩЗ у травні-червні 1986 року безпосередньо в даній особі чи в інших осіб із того ж населеного пункту.

Одноваріантний статистичний аналіз отриманих даних проведено за допомогою комп'ютерної програми IBM SPSS Statistics Version 24 («International Business Machines Corp.», США) і SAS9.4 («SAS Institute», США). Вірогідність різниці для категоричних даних оцінювали за допомогою точного двостороннього тесту Фішера (Fisher's Exact Test) чи його розширеного варіанта (тест Фішера-Фрімана-Халтона, Fisher-Freeman-Halton test), а для безперервних даних – за допомогою непараметричного тесту Манна-Уїтні (Mann-Whitney

test). Вірогідність вікових трендів оцінювали за допомогою тесту Кокрана-Армітажа (Cochran-Armitage test). Різницю між показниками вважали вірогідною при  $p < 0,05$ .

## Результати та обговорення

Позитивна ІГХ реакція з антитілами до мутованого BRAF<sup>V600E</sup>-протеїну зафіксована при дослідженні радіогенних ПТК лише в одному зі 104 випадків (1,0%) у дітей, у 6 з 52 випадків (11,5%) у підлітків, а також у 19 з 91 випадку (20,9%) у дорослих віком від 19 до 28 років на час операції (табл. 1).

**Таблиця 1.** Частота BRAF<sup>V600E</sup> мутації в радіогенних і спорадичних ПТК у різних вікових групах

**Table 1.** Frequency of BRAF<sup>V600E</sup> mutation in radiogenic and sporadic PTC in the different age groups

Вікові групи на час операції Age groups at the time of surgery	Радіогенні ПТК Radiogenic PTC (n=247)		Спорадичні ПТК Sporadic PTC (n=138)		p-value
	кількість* number*	%	кількість* number*	%	
Діти віком $\leq 14$ років Children aged $\leq 14$ years	1/104	1,0	5/39	12,8	0,006
Підлітки віком 15-18 років Adolescents aged 15-18 years	6/52	11,5	12/37	32,4	0,030
Молоді дорослі віком 19-28 років Young adults aged 19-28 years	19/91	20,9	25/62	40,3	0,011
Разом Total	26/247	10,5	42/138	30,4	2,67E-06
Віковий тренд Age trend	Зростаючий Uptrend		Зростаючий Uptrend		3,37E-06 Радіогенні 0,004 Спорадичні 3,37E-06 Radiogenic 0,004 Sporadic

Примітка: \* — кількість випадків позитивної ІГХ реакції з антитілами до мутованого BRAF<sup>V600E</sup>-протеїну / загальна кількість випадків відповідної вікової групи.

Note: \* — the number of cases of positive IHC reaction with antibodies to the mutated BRAF<sup>V600E</sup>-protein / the total number of cases of the corresponding age group.

У кожній з однакових за віком груп, як і в спорадичній серії в цілому, частота  $BRAF^{V600E}$  мутації була суттєво вищою, ніж у відповідних вікових групах радіогенної серії, але в обох серіях досліджень простежувалися вірогідно зростаючі вікові тренди ( $p_{\text{тренд}}=0,37E-06$ ,  $p_{\text{тренд}}=0,004$  відповідно), тобто наявність  $BRAF^{V600E}$  мутації має вікову залежність незалежно від етіології пухлини.

Розглядаючи більш детально радіогенну серію досліджень, слід зазначити, що хворі з наявністю  $BRAF^{V600E}$  мутації в ПТК були старші за віком на момент операції, а латентний період розвитку пухлини, тобто час, що минув між аварією на ЧАЕС та операцією, у них був довшим, ніж у тих, хто не мав такої мутації (табл. 2). Крім того, доза опромінення  $^{131}\text{I}$  ЩЗ хворих із  $BRAF^{V600E}$ -позитивною ПТК була вірогідно

**Таблиця 2.** Загальна характеристика хворих із  $BRAF^{V600E}$ -позитивними та  $BRAF^{V600E}$ -негативними радіогенними ПТК  
**Table 2.** Main characteristics of patients with  $BRAF^{V600E}$ -positive and  $BRAF^{V600E}$ -negative radiogenic PTC

Характеристики Characteristics	$BRAF^{V600E}$ (+) (n=26)		$BRAF^{V600E}$ (-) (n=221)		p-value
	кількість чи медіана number or median	% чи МКД % or IQR*	кількість чи медіана number or median	% чи МКД % or IQR*	
Жінки Female	20	76,9	141	63,8	0,276
Чоловіки Male	6	23,1	80	36,2	0,276
Вік на момент аварії (роки) Age at accident, years	2,0	1-3	2,0	1-3	0,924
Вік на час операції (роки) Age at operation, years	24,1	18,7-27,3	15,4	12,0-21,3	2,03E-06
Латентний період (роки) Latency, years	22,1	17,5-24,9	13,1	9,3-18,5	1,24E-06
Тиреоїдна доза $^{131}\text{I}$ (мГр) Thyroid dose of $^{131}\text{I}$ , mGy	200,0	134-390	350,0	173-825	0,019

Примітка: \* — % для «категоричних» даних; МКД (міжквартильний діапазон) для «безперервних» кількісних даних.  
Note: \* — % for «categorical» data; IQR (interquartile range) for «continuous» quantitative data.

**Таблиця 3.** Гістопатологічні характеристики  $BRAF^{V600E}$ -позитивних і  $BRAF^{V600E}$ -негативних радіогенних ПТК  
**Table 3.** Histopathological characteristics of  $BRAF^{V600E}$ -positive and  $BRAF^{V600E}$ -negative of radiogenic PTC

Характеристики Characteristics	$BRAF^{V600E}$ (+) (n=26)		$BRAF^{V600E}$ (-) (n=221)		p-value
	кількість чи медіана number or median	% чи МКД % or IQR*	кількість чи медіана number or median	% чи МКД % or IQR*	
Розмір пухлини (мм) Tumor size, mm	10,0	6,0-20,0	16,0	12,0-30,0	4,57E-04
Мікро-ПТК <10 мм Micro-PTC <10 mm	14	53,8	36	16,3	5,44E-05
Повністю інкапсульована ПТК Completely encapsulated PTC	5	19,2	32	14,5	0,560
Домінантна будова: Dominant growth pattern:					
папілярна papillary	17	65,4	40	18,1	1,12E-06
фолікулярна follicular	5	19,2	75	33,9	0,183
солідно-трабекулярна solid-trabecular	4	15,4	106	48,0	0,001
Онкоцитарні зміни Oncocytic changes	8	30,8	31	14,0	0,042
Супутній хронічний тиреоїдит Concomitant chronic thyroiditis	6	23,1	31	14,0	0,244

Примітка: див. примітки до таблиці 2.  
Note: see notes for Table 2.



## Оригінальні дослідження

нижчою, ніж у хворих із BRAF<sup>V600E</sup>-негативною ПТК (медіана 200,0 проти 350,0,  $p=0,019$ ).

Порівнюючи гістопатологічні характеристики BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних і BRAF<sup>V600E</sup>-негативних радіогенних ПТК можна бачити, що BRAF<sup>V600E</sup>-позитивні пухлини були менші за середнім розміром та відрізнялися вірогідно вищою частотою мікрокарцином розміром до 10 мм (табл. 3).

Більшість BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних ПТК (65,4%) характеризувалися домінантною папілярною будовою, а 30,8% таких пухлин мали онкоцитарні зміни в клітинах, що суттєво перевищувало відповідні показники BRAF<sup>V600E</sup>-негативної групи. У протилежність цьому, BRAF<sup>V600E</sup>-негативні радіогенні ПТК вірогідно частіше мали солідно-трабекулярну домінантну будову.

Разом із тим, основні інвазійні властивості, що відповідають за більш агресивну поведінку пухлини, а саме ознаки екстратиреоїдного розповсюдження, лімфатично-кровоносної інвазії, наявності регіонарних і віддалених метастазів, також більшою мірою були притаманні BRAF<sup>V600E</sup>-негативним,

ніж BRAF<sup>V600E</sup>-позитивним радіогенним ПТК (табл. 4).

Повторні операції з приводу рецидивів метастазування ПТК, не менш, ніж через 6 місяців після первинного втручання, мали місце лише в BRAF<sup>V600E</sup>-негативній групі хворих у 8 з 219 випадків (3,7%; для двох хворих інформація щодо наявності/відсутності рецидивів відсутня). Як і первинна пухлина, рецидиви метастазів у всіх 8 випадках були BRAF<sup>V600E</sup>-негативними.

Пацієнти з BRAF<sup>V600E</sup>-позитивними ПТК спорадичної серії, як і радіогенної, суттєво відрізнялися старшим віком на час операції від пацієнтів із BRAF<sup>V600E</sup>-негативними ПТК (табл. 5).

BRAF<sup>V600E</sup>-позитивні ПТК у спорадичній серії досліджень, як і в радіогенній серії, мали менший середній розмір і вищу частоту мікрокарцином порівняно з BRAF<sup>V600E</sup>-негативними пухлинами. Спорадичні BRAF<sup>V600E</sup>-позитивні пухлини ЩЗ також значно частіше мали класичну папілярну будову та характеризувалися онкоцитарними змінами в клітинах пухлин порівняно з BRAF<sup>V600E</sup>-негативними ПТК (табл. 6, рис.).

**Таблиця 4.** Інвазійні характеристики BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних і BRAF<sup>V600E</sup>-негативних радіогенних ПТК

**Table 4.** Invasive characteristics of BRAF<sup>V600E</sup>-positive and BRAF<sup>V600E</sup>-negative of radiogenic PTC

Характеристики Characteristics	BRAF <sup>V600E</sup> (+) (n=26)		BRAF <sup>V600E</sup> (-) (n=221)		p-value
	кількість number	%	кількість number	%	
Інтраїреїдне поширення Intrathyroid spread	10	38,5	108	48,9	0,407
Багатофокусний ріст Multifocal growth	6	23,1	30	13,6	0,235
Лімфатично-кровоносна інвазія Lymphatic/vascular invasion	9	34,6	159	71,9	1,91E-04
Екстратиреоїдна інвазія: Extrathyroidal extension:					
pT3 (TNM*, 7 видання) pT3 (TNM*, 7 <sup>th</sup> edition)	7	26,9	119	53,8	0,012
pT3b (TNM*, 8 видання) pT3b (TNM*, 8 <sup>th</sup> edition)	2	7,7	36	16,3	0,389
Регіонарні метастази (N1): Regional metastases (N1):	9	34,6	122	55,2	0,061
N1a	6	23,1	43	19,5	0,611
N1b	3	11,5	79	35,7	0,014
Віддалені метастази (M1) Distant metastases (M1)	1	3,8	38	17,2	0,091
Реоперовані рецидиви регіонарних метастазів Re-operated regional metastases recurrences	0/26	–	8/219	3,7	1,0000

Примітка: \* TNM — Класифікація злоякісних пухлин.

Note: \* TNM — Classification of malignant tumours.

На відміну від радіогенної серії, BRAF<sup>V600E</sup>-позитивні ПТК спорадичної серії вірогідно не відрізнялися від BRAF<sup>V600E</sup>-негативних за більшістю показників інвазійності, лише ознаки лімфатично-кровоносної інвазії, подібно до радіогенної серії, суттєво частіше мали місце серед BRAF<sup>V600E</sup>-негативних ПТК (табл. 7).

Відсоток рецидивів метастазування був практично однаковим в обох серіях (8 із 247 випадків або 3,2% і 4 з 138 випадків або 2,9% відповідно,  $p=1,0000$ ), але, на відміну від радіогенної серії, серед спорадичних ПТК 3 з 4 рецидивів

визначалися в BRAF<sup>V600E</sup>-позитивній групі та характеризувалися також наявністю BRAF<sup>V600E</sup> мутації, при цьому відповідність BRAF статусу первинної пухлини ЩЗ та рецидиву згідно з коефіцієнтом Коена каппа (Cohen's kappa coefficient) була повною ( $\kappa=1,000$ ,  $p=0,001$ ).

Зауважимо, що BRAF<sup>V600E</sup>-позитивні ПТК у радіогенній та спорадичній серіях були подібні за розміром, частотою мікрокарцином ЩЗ, домінантною структурою (типова папілярна в більшості випадків) (табл. 8). Єдину статистично значиму відмінність зафіксовано щодо

**Таблиця 5.** Загальна характеристика хворих із BRAF<sup>V600E</sup>-позитивними і BRAF<sup>V600E</sup>-негативними спорадичними ПТК  
**Table 5.** Main characteristics of patients with BRAF<sup>V600E</sup>-positive and BRAF<sup>V600E</sup>-negative of sporadic PTC

Характеристики Characteristics	BRAF <sup>V600E</sup> (+) (n=42)		BRAF <sup>V600E</sup> (-) (n=96)		p-value
	кількість чи медіана number or median	% чи МКД % or IQR*	кількість чи медіана number or median	% чи МКД % or IQR*	
Жінки Female	34	81,0	81	84,4	0,626
Чоловіки Male	8	19,0	15	15,6	0,626
Вік на час операції (роки) Age at operation, years	21,0	16,4-24,3	17,1	14,0-21,7	0,006

Примітка: див. примітки до таблиці 2.

Note: see notes for Table 2.

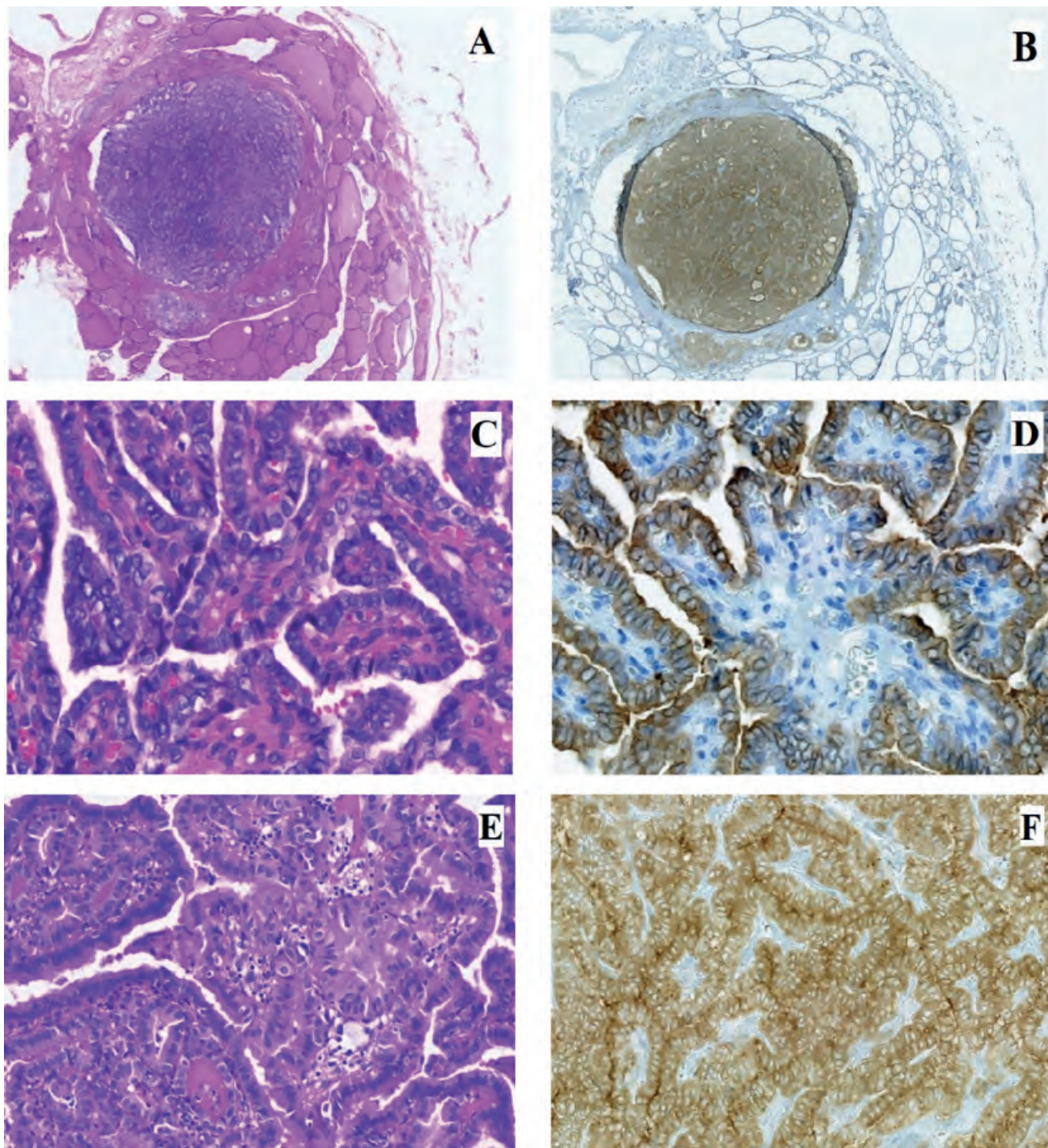
**Таблиця 6.** Гістопатологічні характеристики BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних і BRAF<sup>V600E</sup>-негативних спорадичних ПТК  
**Table 6.** Histopathological characteristics of BRAF<sup>V600E</sup>-positive and BRAF<sup>V600E</sup>-negative of sporadic PTC

Характеристики Characteristics	BRAF <sup>V600E</sup> (+) (n=42)		BRAF <sup>V600E</sup> (-) (n=96)		p-value
	кількість чи медіана number or median	% чи МКД % or IQR1	кількість чи медіана number or median	% чи МКД % or IQR1	
Розмір пухлини (мм) Tumor size, mm	11,0	8,0-15,0	21,0	13,0-31,0	2,64E-05
Мікро-ПТК <10 мм Micro-PTC <10 mm	19	45,2	18	18,8	0,002
Повністю інкапсульована ПТК Completely encapsulated PTC	6	14,3	32	33,3	0,023
Домінантна будова: Dominant growth pattern:					
папілярна papillary	31	73,8	35	36,5	7,91E-05
фолікулярна follicular	4	9,5	33	34,4	0,003
солідно-трабекулярна solid-trabecular	7	16,7	28	29,2	0,141
Онкоцитарні зміни Oncocytic changes	26	61,9	36	37,5	0,010
Супутній хронічний тиреоїдит Concomitant chronic thyroiditis	9	21,4	29	30,2	0,310

Примітка: див. примітки до таблиці 2.

Note: see notes for Table 2.

Оригінальні дослідження



**Рис.** BRAF<sup>V600E</sup>-позитивні ПТК.

*Примітка: А і В — мікрокарцинома розміром 5 мм: ×50; С і D — домінуюча папілярна будова: ×400; Е і F — онкоцитарні зміни в клітинах пухлини: ×400; А, С і Е — гематоксилін-еозин; В, D і F — ІГХ реакція з антитілами anti-BRAF (mutated V600E) antibody (VE1) ab228461 (Abcam).*

**Fig.** BRAF<sup>V600E</sup>-positive PTC.

*Note: A, B — microcarcinoma sized 5 mm: ×50; C, D — papillary dominant growth pattern: ×400; E, F — oncocytic changes in the tumor cells: ×400; A, C, E — hematoxylin-eosin; B, D, F — immunohistochemical reaction with antibody anti-BRAF (mutated V600E) antibody (VE1) ab228461 (Abcam).*



**Таблиця 7.** Інвазійні характеристики BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних і BRAF<sup>V600E</sup>-негативних спорадичних ПТК**Table 7.** Invasive characteristics of BRAF<sup>V600E</sup>-positive and BRAF<sup>V600E</sup>-negative of sporadic PTC

Характеристики Characteristics	BRAF <sup>V600E</sup> (+) (n=42)		BRAF <sup>V600E</sup> (-) (n=96)		p-value
	кіль- кість number	%	кіль- кість number	%	
Інтра tiroїдне поширення Intrathyroid spread	9	21,4	22	22,9	1,000
Багатофокусний ріст Multifocal growth	10	23,8	11	11,5	0,075
Лімфатично-кровоносна інвазія Lymphatic/vascular invasion	13	31,0	62	64,6	7,46E-06
Екстратироїдна інвазія: Extrathyroidal extension:					
<i>pT3 (TNM*, 7 видання)</i> <i>pT3 (TNM*, 7<sup>th</sup> edition)</i>	11	26,2	40	41,7	0,089
<i>pT3b (TNM*, 8 видання)</i> <i>pT3b (TNM*, 8<sup>th</sup> edition)</i>	0	-	3	3,1	0,553
Регіонарні метастази (N1): Regional metastases (N1):	15	35,7	42	43,8	0,454
<i>N1a</i>	11	26,2	16	16,7	0,244
<i>N1b</i>	4	9,5	26	27,1	0,025
Віддалені метастази (M1) Distant metastases (M1)	1	2,4	5	5,2	0,407
Реоперовані рецидиви регіонарних метастазів Re-operated regional metastases recurrences	3	7,1	1	1,0	0,084

Примітка: див. примітки до таблиці 4.

Note: see notes for Table 4.

вищої частоти онкоцитарних змін у BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних спорадичних ПТК (61,9% порівняно з 30,8%,  $p=0,024$ ).

Стосовно характеристик інвазійності BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних ПТК у радіогенній та спорадичній серіях, то жодної статистично значимої різниці між ними не було виявлено

**Таблиця 8.** Статистичне порівняння загальних і гістопатологічних характеристик BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних і BRAF<sup>V600E</sup>-негативних радіогенних і спорадичних ПТК**Table 8.** Statistical comparison of main and histopathological characteristics of BRAF<sup>V600E</sup>-positive and BRAF<sup>V600E</sup>-negative of radiogenic and sporadic PTC

Характеристики Characteristics	BRAF <sup>V600E</sup> (+) радіогенні ПТК / BRAF <sup>V600E</sup> (+) спорадичні ПТК BRAF <sup>V600E</sup> (+) radiogenic PTC / BRAF <sup>V600E</sup> (+) sporadic PTC	BRAF <sup>V600E</sup> (-) радіогенні ПТК / BRAF <sup>V600E</sup> (-) спорадичні ПТК BRAF <sup>V600E</sup> (-) radiogenic PTC / BRAF <sup>V600E</sup> (-) sporadic PTC
	p-value (n=26/42)	p-value (221/96)
Жінки Female	0,762	0,001
Чоловіки Male	0,762	0,001
Вік на час операції (роки) Age at operation, years	0,024	0,063
Розмір пухлини (мм) Tumor size, mm	0,523	0,247
Мікро-ПТК <10 мм Micro-PTC <10 mm	0,619	0,630
Повністю інкапсульована ПТК Completely encapsulated PTC	0,737	0,001
Домінантна будова: Dominant growth pattern:		
<i>папілярна</i> <i>papillary</i>	0,517	0,001
<i>фолікулярна</i> <i>follicular</i>	0,288	1,000
<i>солідно-трабекулярна</i> <i>solid-trabecular</i>	1,000	0,002
Онкоцитарні зміни Oncocytic changes	0,024	0,002
Супутній хронічний тироїдит Concomitant chronic thyroiditis	1,000	0,002

Примітка: див. примітки до таблиці 2.

Note: see notes for Table 2

(табл. 9). Між тим, варта уваги одна невірорідна, але важлива відмінність, а саме розвиток поодиноких рецидивів метастазів серед BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних спорадичних ПТК (3/42, 7,1%) за відсутності рецидивів серед BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних радіогенних ПТК (0/26,  $p=0,281$ ).

## Оригінальні дослідження

**Таблиця 9.** Статистичне порівняння інвазійних характеристик BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних і BRAF<sup>V600E</sup>-негативних радіогенних і спорадичних ПТК

**Table 9.** Statistical comparison of invasive characteristics of BRAF<sup>V600E</sup>-positive and BRAF<sup>V600E</sup>-negative of radiogenic and sporadic PTC

Характеристики Characteristics	BRAF <sup>V600E</sup> (+) радіогенні ПТК / BRAF <sup>V600E</sup> (+) спорадичні ПТК BRAF <sup>V600E</sup> (+) radiogenic PTC / BRAF <sup>V600E</sup> (+) sporadic PTC p-value (n=26/42)	BRAF <sup>V600E</sup> (-) радіогенні ПТК / BRAF <sup>V600E</sup> (-) спорадичні ПТК BRAF <sup>V600E</sup> (-) radiogenic PTC / BRAF <sup>V600E</sup> (-) sporadic PTC p-value (221/96)
Інтра tiroїдне поширення Intrathyroid spread	0,167	3,40E-05
Багатофокусний ріст Multifocal growth	1,000	0,717
Лімфатично-кровоносна інвазія Lymphatic/vascular invasion	0,794	0,231
Екстратироїдна інвазія: Extrathyroidal extension:		
<i>pT3 (TNM*, 7 видання)</i>	1,000	0,051
<i>pT3 (TNM*, 7<sup>th</sup> edition)</i>		
<i>pT3b (TNM*, 8 видання)</i>	0,143	0,001
<i>pT3b (TNM*, 8<sup>th</sup> edition)</i>		
Регіонарні метастази (N1): Regional metastases (N1):	1,000	0,067
<i>N1a</i>	1,000	0,639
<i>N1b</i>	1,000	0,154
Віддалені метастази (M1) Distant metastases (M1)	1,000	0,004
Реоперовані рецидиви регіонарних метастазів Re-operated regional metastases recurrences	0,281	0,285

Примітка: див. примітки до таблиці 4.

Note: see notes for Table 4.

Водночас BRAF<sup>V600E</sup>-негативні пухлини ЩЗ мали численні вірогідні відмінності з порівняння двох серій. Так, у радіогенній серії вони вірогідно частіше мали солідно-трабекулярну доміную будову, рідше були

інкапсульованими, рідше характеризувалися онкоцитарними змінами та ознаками супутнього тироїдиту, ніж у спорадичній серії.

Саме BRAF<sup>V600E</sup>-негативним радіогенним ПТК притаманні виразніші інвазійні властивості (див. табл. 8), що зумовлювало їхню агресивнішу біологічну поведінку порівняно зі спорадичними ПТК, встановлену нами в попередніх дослідженнях [26, 27].

Таким чином, BRAF<sup>V600E</sup> мутація більш властива спорадичним, ніж радіогенним ПТК, виявленим в однакових за віком групах. Наявність BRAF<sup>V600E</sup> мутації асоціюється в обох серіях досліджень з однаковими гістопатологічними характеристиками первинних ПТК у радіогенній та спорадичній серіях, а саме високою частотою мікрокарцином ЩЗ розміром до 10 мм, доміантною типовою папілярною будовою і подібними інвазійними властивостями.

## Висновки

1. BRAF<sup>V600E</sup> мутація більш властива спорадичним, ніж радіогенним ПТК в однакових за віком групах, але частота таких змін істотно зростає з віком прооперованих хворих в обох серіях досліджень.
2. У радіогенній серії доза опромінення ЩЗ у хворих із наявністю BRAF<sup>V600E</sup> мутації в ПТК була статистично значимо нижчою порівняно з аналогічним показником у хворих із відсутністю такої мутації в пухлині.
3. Наявність BRAF<sup>V600E</sup> мутації асоціювалася з однаковими гістопатологічними ознаками ПТК, як у радіогенній, так і в спорадичній серіях, а саме, високою частотою мікрокарцином ЩЗ розміром до 10 мм, доміантною типовою папілярною будовою і наявністю онкоцитарних змін у клітинах пухлин.
4. BRAF<sup>V600E</sup>-позитивні первинні ПТК характеризувалися нижчими (радіогенні) чи подібними (спорадичні) інвазійними властивостями в пацієнтів віком до 28 років на час операції в обох етіологічних серіях, що вказує на те, що BRAF<sup>V600E</sup> мутація не асоціюється з більш агресивним перебігом захворювання у хворих молодого віку незалежно від етіології ПТК.

## Список використаної літератури

- Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res.* 1997 May 1;57(9):1690-4.
- Rabes HM, Klugbauer S. Molecular genetics of childhood papillary thyroid carcinomas after irradiation: high prevalence of RET rearrangement. *Recent Results Cancer Res.* 1998;154:248-64.
- Smida J, Salassidis K, Hieber L, Zitzelsberger H, Kellerer AM, Demidchik EP, et al. Distinct frequency of ret rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus. *Int J Cancer.* 1999 Jan 5;80(1):32-8.
- Efanov AA, Brenner AV, Bogdanova TI, Kelly LM, Liu P, Little MP, et al. Investigation of the relationship between radiation dose and gene mutations and fusions in post-Chernobyl thyroid cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2018 Apr 1;110(4):371-378. Erratum in: *J Natl Cancer Inst.* 2018 Jun 1;110(6):685.
- Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, et al. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2000 Mar;6(3):1093-103.
- Leeman-Neill RJ, Kelly LM, Liu P, Brenner AV, Little MP, Bogdanova TI, et al. ETV6-NTRK3 is a common chromosomal rearrangement in radiation-associated thyroid cancer. *Cancer.* 2014 Mar 15;120(6):799-807.
- Nikiforova MN, Ciampi R, Salvatore G, Santoro M, Gandhi M, Knauf JA, et al. Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. *Cancer Lett.* 2004 Jun 8;209(1):1-6.
- Kumagai A, Namba H, Saenko VA, Ashizawa K, Ohtsuru A, Ito M, et al. Low frequency of BRAF T1796A mutations in childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Sep;89(9):4280-4.
- Powell N, Jeremiah S, Morishita M, Dudley E, Bethel J, Bogdanova T, et al. Frequency of BRAF T1796A mutation in papillary thyroid carcinoma relates to age of patient at diagnosis and not to radiation exposure. *J Pathol.* 2005 Apr;205(5):558-64.
- Ricarte-Filho JC, Li S, Garcia-Rendueles ME, Montero-Conde C, Voza F, Knauf JA, et al. Identification of kinase fusion oncogenes in post-Chernobyl radiation-induced thyroid cancers. *J Clin Invest.* 2013 Nov;123(11):4935-44.
- Jung YY, Yoo JH, Park ES, Kim MK, Lee TJ, Cho BY, et al. Clinicopathologic correlations of the BRAF<sup>V600E</sup> mutation, BRAF V600E immunohistochemistry, and BRAF RNA *in situ* hybridization in papillary thyroid carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2015 Feb;211(2):162-70.
- Pyo JS, Sohn JH, Kang G. BRAF Immunohistochemistry using clone VE1 is strongly concordant with BRAF<sup>V600E</sup> mutation test in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Pathol.* 2015 Sep;26(3):211-7.
- Paja Fano M, Ugalde Olano A, Fuertes Thomas E, Oleaga Alday A. Immunohistochemical detection of the BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma. Evaluation against real-time polymerase chain reaction. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2017 Feb;64(2):75-81.
- Zhu X, Luo Y, Bai Q, Lu Y, Lu Y, Wu L, et al. Specific immunohistochemical detection of the BRAF V600E mutation in primary and metastatic papillary thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2016 Feb;100(1):236-41.
- Chen D, Qi W, Zhang P, Zhang Y, Liu Y, Guan H, et al. Investigation of BRAF V600E detection approaches in papillary thyroid carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2018 Feb;214(2):303-7.
- Kim JK, Seong CY, Bae IE, Yi JW, Yu HW, Kim SJ, et al. Comparison of immunohistochemistry and direct sequencing methods for identification of the BRAF<sup>V600E</sup> mutation in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2018 Jun;25(6):1775-81.
- Oh HS, Kwon H, Park S, Kim M, Jeon MJ, Kim TY, et al. Comparison of immunohistochemistry and direct sanger sequencing for detection of the BRAF<sup>V600E</sup> mutation in thyroid neoplasm. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2018 Mar;33(1):62-9.
- Болгов МЮ. Автоматизация медицинских учреждений: руководство пользователя TherDep5. Киев: Издательство Куприянова; 2006. 464 с. (Bolgov MYu. Healthcare automation: TherDep5 user guide. Kyiv: Kupriyanov publishing house; 2006. 464 p. Russian).
- Thomas GA. The Chernobyl Tissue Bank: integrating research on radiation-induced thyroid cancer. *J Radiol Prot.* 2012 Mar;32(1):N77-80.
- Thomas GA, Williams ED, Becker DV, Bogdanova TI, Demidchik EP, Lushnikov E, et al. Chernobyl tumor bank. *Thyroid.* 2000 Dec;10(12):1126-7.
- Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G, Rosai J, editors. WHO classification of tumours of endocrine organs. WHO classification of tumours. 4<sup>th</sup> edition, volume 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017. 355 p.
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. TNM classification of malignant tumours. Seventh edition. Chichester, UK: Wiley-Blackwell; 2011. 336 p.
- Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. TNM classification of Malignant Tumours. Eighth edition. Oxford: Wiley-Blackwell; 2017. 272 p.
- Tronko M, Bogdanova T, Saenko V, Likhtarov I, Thomas GA, Yamashita S, editors. Thyroid cancer in Ukraine after Chernobyl. Dosimetry, epidemiology, pathology, molecular biology. Nagasaki, Japan: Nagasaki Association for Hibakusha's Medical Care (NASHIM); 2014. 175 p.
- Likhtarov I, Thomas G, Kovgan L, Masiuk S, Chepurny M, Ivanova O, et al. Reconstruction of individual thyroid doses to the Ukrainian subjects enrolled in the Chernobyl Tissue Bank. *Radiat Prot Dosimetry.* 2013 Oct;156(4):407-23.
- Bogdanova TI, Saenko VA, Brenner AV, Zurnadzhy LY, Rogounovitch TI, Likhtarov IA, et al. Comparative histopathologic analysis of «radiogenic» and «sporadic» papillary thyroid carcinoma: Patients born before and after the Chernobyl accident. *Thyroid.* 2018 Jul;28(7):880-890.
- Bogdanova TI, Saenko VA, Zurnadzhy LY, Rogounovitch TI, Ito M, Chernyshov SV, et al. Pathology of radiation-induced thyroid cancer: Lessons from Chernobyl thyroid cancer study. In: Kakudo K, editor. *Thyroid FNA cytology. Differential diagnoses and pitfalls.* Second edition. Singapore: Springer; 2019. 549-63.

## Подяка

Автори висловлюють подяку членам патологічної панелі ЧБТ, яка підтримується грантом Національного інституту раку США № U24CA082102: професорам О. Абросімову, Т. Богдановій, Д. Вільямсу, М. Іто, В. ЛіВолсі, Дж. Розаї, Г. Фадда, Дж. Хант, докторам Н. Двинських і Л. Зурнаджи за підтвердження патологічних діагнозів.

## Сравнительное иммуногистохимическое исследование BRAF<sup>V600E</sup>-позитивных и BRAF<sup>V600E</sup>-негативных радиогенных и спорадических папиллярных тиреоидных карцином

Л.Ю. Зурнаджи, Т.И. Рогуневич, В.А. Саенко, М.Ю. Болгов, С.В. Масюк, С.В. Бурко, Т.Л. Дегтярева, С.В. Чернишев, С.В. Гулеватый, Н. Мицутаке, Н.Д. Тронько, Т.И. Богданова

<sup>1</sup>ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

<sup>2</sup>Институт заболеваний, связанных с последствиями взрыва атомной бомбы, университет Нагасаки, Япония

<sup>3</sup>ГУ «Национальный научный центр радиационной медицины АМН Украины»

## Оригінальні дослідження

**Резюме.** Самой распространенной точковой мутацией в папиллярной тиреоидной карциноме (ПТК) является  $BRAF^{V600E}$ , которую связывают с более агрессивным поведением опухоли. Между тем, данные о частоте этой мутации в различных возрастных группах пациентов при наличии или отсутствии радиационного воздействия в анамнезе весьма противоречивы. В большинстве указанных исследований не использовались адекватные контрольные группы, и/или не оценивались инвазивные свойства ПТК. **Цель** — сравнение с помощью иммуногистохимического (ИГХ) исследования частоты экспрессии мутантного белка  $BRAF^{V600E}$  в одинаковых по возрасту на момент операции группах больных с радиогенной и спорадической ПТК и оценка инвазивных свойств  $BRAF^{V600E}$ -положительных и  $BRAF^{V600E}$ -негативных ПТК в обеих сериях. **Материал и методы.** ИГХ исследование выполнено на 247 радиогенных ПТК (105 — дети  $\leq 14$  лет, 52 — подростки 15-18 лет, 91 — взрослые 19-28 лет на момент операции) и 138 спорадических ПТК (39 — дети, 37 — подростки, 62 — взрослые указанного выше возраста). ИГХ исследования проводили с антителами anti-BRAF (mutated V600E) antibody (VE1) ab228461 (Abcam). **Результаты.** В радиогенных ПТК частота экспрессии мутантного белка  $BRAF^{V600E}$ , свидетельствующая о наличии  $BRAF^{V600E}$  мутации, была существенно ниже, чем в спорадических ПТК (10,5% и 30,4%,  $p=2,67E-06$ ); частота мутации повышалась с возрастом пациентов в обеих сериях. При сравнении  $BRAF^{V600E}$ -положительных и  $BRAF^{V600E}$ -негативных ПТК в радиогенной серии статистически значимые различия отмечены в частотах большинства изученных характеристик. Со стороны доминирующей структуры в радиогенных  $BRAF^{V600E}$ -положительных ПТК преобладает типичная папиллярная, а в радиогенных  $BRAF^{V600E}$ -негативных ПТК — солидно-трабекулярная ( $p=1,12E-06$  и  $p=0,001$  соответственно). Частота всех основных показателей инвазивности в  $BRAF^{V600E}$ -положительных радиогенных ПТК была статистически значимо ниже, чем в  $BRAF^{V600E}$ -негативной группе. В спорадической серии  $BRAF^{V600E}$ -положительные ПТК по частоте большинства изученных характеристик не отличались от  $BRAF^{V600E}$ -негативных или же, как и в радиогенной серии, отдельные показатели инвазивности были ниже, чем в  $BRAF^{V600E}$ -негативной группе, например, лимфососудистая инвазия ( $p=7,46E-06$ ) или наличие N1b метастазов ( $p=0,025$ ).  $BRAF^{V600E}$ -положительные ПТК из обеих серий (в отличие от  $BRAF^{V600E}$ -негативных) практически не имели значимых статистических различий при сравнении между собой по всем изученным показателям. **Выводы.**  $BRAF^{V600E}$  мутация более свойственна спорадическим, чем радиогенным ПТК во всех возрастных группах, и ее частота увеличивается с возрастом пациентов в обеих сериях. По сравнению с  $BRAF^{V600E}$ -негативными опухолями  $BRAF^{V600E}$ -положительные ПТК характеризовались более низкими (радиогенные) или подобными (спорадические) инвазивными свойствами у пациентов в возрасте до 28 лет на момент операции в обеих этиологических сериях, что указывает на то, что  $BRAF^{V600E}$  мутация не ассоциируется с более агрессивным течением заболевания у больных молодого возраста независимо от этиологии ПТК.

**Ключевые слова:** спорадическая папиллярная тиреоидная карцинома, радиогенная папиллярная тиреоидная карцинома,  $BRAF^{V600E}$  мутация, иммуногистохимическое исследование.

### Comparative immunohistochemical study $BRAF^{V600E}$ positive and $BRAF^{V600E}$ negative radiogenic and sporadic papillary thyroid carcinoma

I. Yu. Zurnadzy<sup>1</sup>, T.I. Rogounovitch<sup>2</sup>, V.O. Saenko<sup>2</sup>, M.Yu. Bolgov<sup>1</sup>, S.V. Masiuk<sup>3</sup>, S.V. Burko<sup>1</sup>, T.L. Degtyaryova<sup>1</sup>, S.V. Chernyshov<sup>1</sup>, S.V. Gulevatyi<sup>1</sup>, N. Mitsutake<sup>2</sup>, M.D. Tronko<sup>1</sup>, T.I. Bogdanova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SI «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

<sup>2</sup>Atomic Bomb Diseases Institute, Nagasaki University, Japan

<sup>3</sup>SI «National Research Center of Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

**Abstract.** The most common point mutation in papillary thyroid carcinoma (PTC), the  $BRAF^{V600E}$ , has been associated with more aggressive tumor behavior. Data on the frequency of the  $BRAF^{V600E}$  mutation in different age groups in patients with or without history of radiation exposure are quite discordant. In most studies, the adequate control groups were not analyzed, and/or the invasive properties of PTC were not evaluated. **The aim** of this work is a comparison of the frequency of the  $BRAF^{V600E}$  mutant protein expression in radiogenic and sporadic PTCs in similar by age groups of patients, and an assessing of invasive tumor properties. **Material and methods.** The immunohistochemical (IHC) study included 247 radiogenic PTCs (105 — children  $\leq 14$  years, 52 — adolescents 15-18 years, 91 — adults 19-28 years at the time of surgery) and 138 sporadic PTCs (39 — children, 37 — adolescents, 62 — adults of the indicated age). IHC staining was performed with the anti-BRAF (mutated V600E) antibody (VE1) ab228461 (Abcam). **Results.** The frequency of mutant  $BRAF^{V600E}$  protein expression (thus the  $BRAF^{V600E}$  mutation) was significantly lower in the radiogenic PTCs than in the sporadic PTCs (10.5% and 30.4%,  $p=2,607E-06$ ); the frequency displayed an age uptrend in both series. Comparison of the  $BRAF^{V600E}$ -positive and  $BRAF^{V600E}$ -negative PTCs in the radiogenic series revealed statistically significant differences in the frequencies of most characteristics. The radiogenic  $BRAF^{V600E}$ -positive PTCs frequently have typical papillary dominant structure, whereas the  $BRAF^{V600E}$ -negative PTCs — solid-trabecular ( $p=1.12E-06$  and  $p=0.001$ , respectively). The frequencies of most indicators of tumor invasiveness in the radiogenic  $BRAF^{V600E}$ -positive PTCs were statistically significantly lower than in the  $BRAF^{V600E}$ -negative ones. In the sporadic series, the  $BRAF^{V600E}$ -positive PTCs did not display differences in the frequencies of most characteristics from those of the  $BRAF^{V600E}$ -negative tumors, or, similarly to the radiogenic series, these were in some instances lower, e.g. lymphatic/vascular invasion ( $p=7.46E-06$ ) or N1b metastases ( $p=0.025$ ). When compared, the  $BRAF^{V600E}$ -positive PTCs from



the two series (unlike BRAF<sup>V600E</sup>-negative) did not statistically differ from each other for virtually all characteristics. **Conclusions.** The BRAF<sup>V600E</sup> mutation is more common in sporadic than radiogenic PTCs, its frequency increases with patients' age in both series. As compared to the BRAF<sup>V600E</sup>-negative PTCs, the BRAF<sup>V600E</sup>-positive PTCs were characterized by the lower (radiogenic) or similar (sporadic) invasive properties in patients aged up to 28 years at surgery in both etiological series, indicating that the BRAF<sup>V600E</sup> mutation does not confer more aggressive disease in young patients with PTC of either etiology.

**Keywords:** sporadic papillary thyroid carcinoma, radiogenic papillary thyroid carcinoma, BRAF<sup>V600E</sup> mutation, immunohistochemical study.

**Для цитування:** Зурнаджи ЛЮ, Рагунович ТІ, Саєнко ВО, Болгов МЮ, Масюк СВ, Бурко СВ, Дегтярьова ТЛ, Чернишов СВ, Гулеватий СВ, Міцутаке Н, Тронько МД, Богданова ТІ. Порівняльне імуногістохімічне дослідження BRAF<sup>V600E</sup>-позитивних і BRAF<sup>V600E</sup>-негативних радіогенних і спорадичних папілярних тиреоїдних карцином. *Ендокринологія.* 2021;26(2):105-118. DOI: 10.31793/1680-1466.2021.26-2.105.

**Адреса для листування:** Богданова Тетяна Іванівна, tutlabogdanova1948@gmail.com; ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна.

**Відомості про авторів:** Людмила Юліївна Зурнаджи, канд. мед. наук, старш. дослідник, пров. наук. співроб. лабораторії морфології ендокринної системи ДУ ІЕОР НАМНУ, ORCID: 0000-0001-5138-4532; Тетяна Іванівна Рагунович, MD, PhD, наук. співроб. відділу радіаційних медичних наук Інституту захворювань, пов'язаних з наслідками вибуху атомної бомби університету Нагасакі, Японія, orcid: 0000-0002-0616-3383; Володимир Олександрович Саєнко, канд. біол. наук, асоційов. проф. відділу радіаційної молекулярної епідеміології Інституту захворювань, пов'язаних з наслідками вибуху атомної бомби університету Нагасакі, Японія, orcid: 0000-0003-2844-3121; Михайло Юрійович Болгов, д-р. мед. наук, старш. наук. співроб., пров. наук. співроб. відділу хірургії ендокринних залоз ДУ ІЕОР НАМНУ, ORCID: 0000-0002-9011-9982; Сергій Володимирович Масюк, канд. фіз.-мат. наук, завідувач лабораторії радіологічного захисту ДУ ННЦРМ НАМНУ, orcid: 0000-0002-2744-8046; 0000-0002-5123; Світлана Валентинівна Бурко, наук. співроб. лабораторії морфології ендокринної системи ДУ ІЕОР НАМНУ, ORCID: 0000-0001-7597-3008; Тетяна Леонідівна Дегтярьова, наук. співроб. лабораторії морфології ендокринної системи ДУ ІЕОР НАМНУ, ORCID: 0000-0003-4204-0003; Сергій Вікторович Чернишов, канд. мед. наук, старш. наук. співроб. відділу хірургії ендокринних залоз ДУ ІЕОР НАМНУ, ORCID: 0000-0003-3530-2124; Сергій Васильович Гулеватий, наук. співроб. лабораторії радіології та радіобіології ДУ ІЕОР НАМНУ, ORCID: 0000-0002-2382-2950; Норісато Міцутаке, MD, PhD, професор відділу радіаційних медичних наук Інституту захворювань, пов'язаних із наслідками вибуху атомної бомби університету Нагасакі, Японія, orcid: 0000-0002-2744-8046; Микола Дмитрович Тронько, д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН України, акад. НАМН України, завідувач відділом фундаментальної та прикладної ендокринології та директор ДУ ІЕОР НАМНУ, ORCID: 0000-0001-7421-0981; Тетяна Іванівна Богданова, д-р біол. наук, проф., завідувачка лабораторії морфології ендокринної системи ДУ ІЕОР НАМНУ, ORCID: 0000-0001-5119-0236.

**Особистий внесок:** Зурнаджи Л.Ю. — участь у розробці концепції статті, перегляд та аналіз гістологічних препаратів, проведення ІГХ досліджень і аналіз результатів, участь у написанні рукопису; Рагунович Т.І. — відпрацювання методики ІГХ виявлення мутованого BRAF<sup>V600E</sup> протеїну, участь у проведенні імуногістохімічних досліджень; Саєнко В.О. — статистичний аналіз результатів, обговорення результатів, редагування російськомовного та англomовного резюме; Болгов М.Ю. — автоматизована підготовка електронної таблиці клінічних характеристик за власноручно розробленим алгоритмом; Масюк С.В. — дозиметричний супровід дослідження; Бурко С.В. — проведення гістологічних досліджень; Дегтярьова Т.Л. — проведення гістологічних досліджень; С.В. Чернишов — аналіз клінічних даних; Гулеватий С.В. — аналіз результатів радіоїодтерапії; Міцутаке Н. — обговорення отриманих результатів; Тронько М.Д. — обговорення отриманих результатів; Богданова — ідея, дизайн дослідження, аналіз результатів, написання, оформлення, підготовка до друку статті.

**Фінансування:** дослідження проводилось у рамках бюджетного фінансування за планом науково-дослідних робіт ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України» (№ державної реєстрації: 0118U002160) і за фінансової підтримки Інституту захворювань, пов'язаних із наслідками вибуху атомної бомби університету Нагасакі (Японія) та Програми спільного використання мережевого типу Науково-дослідного центру медичної науки про радіаційні катастрофи (Японія).

**Декларація з етики:** автори задекларували відсутність конфлікту інтересів і фінансових зобов'язань.

**Стаття:** надійшла до редакції 24.03.2021 р.; перероблена 09.04.2021 р.; прийнята до друку 02.07.2021 р.; надрукована 14.07.2021 р.

**Для цитування:** Зурнаджи ЛЮ, Рагунович ТІ, Саєнко ВА, Болгов МЮ, Масюк СВ, Бурко СВ, Дегтярева ТЛ, Чернышев СВ, Гулеватий СВ, Мицутаке Н, Тронько НД, Богданова ТИ. Сравнительное иммуногистохимическое исследование BRAF<sup>V600E</sup>-позитивных и BRAF<sup>V600E</sup>-негативных радиогенных и спорадических папиллярных тиреоидных карцином. *Эндокринология.* 2021;26 (2): 105-118. DOI: 10.31793/1680-1466.2021.26-2.105.

**Адрес для переписки:** Богданова Татьяна Ивановна, tutlabogdanova1948@gmail.com; ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины», ул. Вышгородская, 69, г. Киев, 04114, Украина.

**Сведения об авторах:** Людмила Юльевна Зурнаджи, канд. мед. наук, ст. исследователь, вед. научн. сотр. лаборатории морфологии эндокринной системы ГУ ИЭОВ НАМНУ, ORCID: 0000-0001-5138-4532; Татьяна Ивановна Рагунович, MD, PhD, научн. сотр. отдела радиационных медицинских наук Института заболеваний, связанных с последствиями взрыва атомной бомбы университета Нагасакі, Япония, ORCID: 0000-0002-0616-3383; Владимир Александрович Саєнко, канд. биол. наук, ассоциированный проф. отдела радиационной молекулярной эпидемиологии Института заболеваний, связанных с последствиями взрыва атомной бомбы, университета Нагасакі, Япония, ORCID: 0000-0003-2844-3121; Михаил Юрьевич Болгов, д-р. мед. наук, ст. науч. сотр., вед. научн. сотр. отдела хирургии эндокринных желез ГУ ИЭОВ НАМНУ, ORCID: 0000-0002-9011-9982; Сергей Владимирович Масюк, канд. физ.-мат. наук, заведующий лабораторией радиационной защиты ГУ ННЦРМ НАМНУ, ORCID: 0000-0002-2744-8046; 0000-0002-5123; Светлана Валентиновна Бурко, научн. сотр. лаборатории морфологии эндокринной системы ГУ ИЭОВ НАМНУ, ORCID:

## Оригінальні дослідження

0000-0001-7597-3008; Татьяна Леонидовна Дегтярева, научн. сотр. лаборатории морфологии эндокринной системы ГУ ИЭОВ НАМНУ, ORCID: 0000-0003-4204-0003; Сергей Викторович Чернышев, канд. мед. наук, ст. научн. сотр. отдела хирургии эндокринных желез ГУ ИЭОВ НАМНУ, ORCID: 0000-0003-3530-2124; Сергей Васильевич Гулеватий, научн. сотр. лаборатории радиологии и радиобиологии ГУ ИЭОВ НАМНУ, ORCID: 0000-0002-2382-2950; Норисато Мицутаке, MD, PhD, профессор отдела радиационных медицинских наук Института заболеваний, связанных с последствиями взрыва атомной бомбы, университета Нагасаки, Япония, ORCID: 0000-0002-2744-8046; Николай Дмитриевич Тронько, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН Украины, акад. НАМН Украины, заведующий отделом фундаментальной и прикладной эндокринологии и директор ГУ ИЭОВ НАМНУ, ORCID: 0000-0001-7421-0981; Татьяна Ивановна Богданова, д-р биол. наук, проф., заведующая лабораторией морфологии эндокринной системы ГУ ИЭОВ НАМНУ, ORCID: 0000-0001-5119-0236.

**Личный вклад:** Журнаджи Л.Ю. — участие в разработке концепции статьи, просмотр и анализ гистологических препаратов, проведение ИГХ исследований и анализ результатов, участие в написании рукописи; Рогуневич Т.И. — отработка методики ИГХ выявления мутированного BRAF<sup>V600E</sup> протеина, участие в проведении иммуногистохимических исследований; Саенко В.А. — статистический анализ результатов, обсуждение полученных результатов, редактирование англоязычного резюме; Болгов М.Ю. — автоматизированная подготовка электронной таблицы клинических характеристик по собственноручно разработанному алгоритму; Масюк С.В. — дозиметрическое сопровождение исследования; Бурко С.В. — проведение гистологических исследований; Дегтярева Т.Л. — проведение гистологических исследований; С.В. Чернышев — анализ клинических данных; Гулеватий С.В. — анализ результатов радиойодтерапии; Мицутаки Н. — обсуждение полученных результатов; Тронько Н.Д. — обсуждение полученных результатов; Богданова Т.И. — идея, дизайн исследования, анализ результатов, написание, оформление, подготовка к печати статьи.

**Финансирование исследования:** проводилось в рамках бюджетного финансирования по плану научно-исследовательских работ ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины» (№ государственной регистрации: 0118U002160) и при финансовой поддержке Института заболеваний, связанных с последствиями взрыва атомной бомбы, университета Нагасаки (Япония) и Программы совместного использования сетевого типа Научно-исследовательского центра медицинской науки о радиационных катастрофах (Япония).

**Декларация по этике:** авторы задекларировали отсутствие конфликта интересов и финансовых обязательств.

**Статья:** поступила в редакцию 24.03.2021 г.; переработана 09.04.2021 г.; принята к печати 02.07.2021 г.; напечатана 14.07. 2021 г.

**For citation:** Zurnadzhly LYu, Rogounovitch TI, Saenko VO, Bolgov MYu, Masiuk SV, Burko SV, Degtyaryova TL, Chernyshov SV, Gulevatyi SV, Mitsutake N, Tronko MD, Bogdanova TI. Comparative immunohistochemical study of BRAF<sup>V600E</sup> positive and BRAF<sup>V600E</sup> negative radiogenic and sporadic papillary thyroid carcinomas. *Endokrynologia*. 2021;26(2): 105-118. DOI: 10.31793/1680-1466.2021.26-2.105.

**Correspondence address:** Bogdanova Tetiana Ivanivna, tutlabogdanova1948@gmail.com; SI «VP Komisarenko Institute

of Endocrinology and Metabolism of the NAMS of Ukraine», Vyshgorodska Str., 69, Kyiv, 04114, Ukraine.

**Information about the authors:** Liudmyla Yuliivna Zurnadzhly, MD, Ph.D., lead researcher of Laboratory of Morphology of the Endocrine System of the SI «IEM NAMSU», ORCID: 0000-0001-5138-4532; Tatiana Ivanovna Rogounovitch, MD, PhD, researcher of the Department of Radiation Medicine, Atomic Bomb Diseases Institute, Nagasaki University, Japan, ORCID: 0000-0002-0616-3383; Volodymyr Oleksandrovych Saenko, Ph.D., Associated Prof. of the Department of Radiation Molecular Epidemiology, Atomic Bomb Diseases Institute, Nagasaki University, Japan, ORCID: 0000-0003-2844-3121; Mikhail Yurievich Bolgov, lead researcher of the Department of Endocrine Surgery of the SI «IEM NAMSU», ORCID: 0000-0002-9011-9982; Serhiy Volodymyrovych Masiuk, Ph.D., Head of the Radiation Protection Laboratory of the SI «NSCRM NAMSU», ORCID: 0000-0002-2744-8046; 0000-0002-5123; Svetlana Valentinivna Burko, researcher of the Laboratory of Morphology of the Endocrine System of the SI «IEM NAMSU», ORCID: 0000-0001-7597-3008; Tetiana Leonidivna Degtyaryova, researcher of the Laboratory of Morphology of the Endocrine System of the SI «IEM NAMSU», ORCID: 0000-0003-4204-0003; Serhii Viktorovych Chernyshov, Ph.D., senior researcher of the Department of Endocrine Surgery of the SI «IEM NAMSU», ORCID: 0000-0003-3530-2124; Serhii Vasyliovych Gulevatyi, researcher of the Laboratory of Radiology and Radiobiology of the SI «IEM NAMSU», ORCID: 0000-0002-2382-2950; Norisato Mitsutake, MD, PhD, Professor of the Department of Radiation Medical Sciences of the Atomic Bomb Diseases Institute, Nagasaki University, Japan, ORCID: 0000-0002-2744-8046; Mykola Dmytrovych Tronko, MD, Ph.D., Prof., Corresponding Member NAS of Ukraine, Acad. NAMS of Ukraine, Head of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology and Director of the SI «IEM NAMSU», ORCID: 0000-0001-7421-0981; Tetiana Ivanivna Bogdanova, Ph.D., Prof., Head of the Laboratory of Morphology of the Endocrine System of the SI «IEM NAMSU», ORCID: 0000-0001-5119-0236.

**Personal contribution:** Zurnadzhly L.Yu. — participation in the development of the concept of the paper, review and analysis of histological specimens, IHC study and analysis of results, participation in the writing of the manuscript; Rogounovitch T.I. — development of IHC detection of mutated BRAF<sup>V600E</sup> protein, participation in IHC study; Saenko V.O. — statistical analysis of results, discussion of the results obtained, editing of English abstract; Bolgov M. Yu. — automated preparation of the spreadsheet of clinical characteristics according to a self-developed algorithm; Masiuk S.V. — dosimetric support of the study; Burko S.V. — histological study; Degtyaryova T.L. — histological study; Chernyshov S.V. — analysis of clinical data; Gulevatyi S.V. — analysis of RIT results; Mitsutaki N. — discussion of the results obtained; Tronko M.D. — discussion of the results obtained; Bogdanova T.I. — idea, research design, analysis of results, writing, design, preparation for publication of the paper.

**Funding:** the study was carried out within the budget funding according to the plan of research work of the State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism. NAMS of Ukraine», registration number of the study: 0118U002160; the study also was supported in part by the Atomic Bomb Diseases Institute, Nagasaki University, Japan, and the Program of the Network-Type Joint Usage / Research Center for Radiation Disaster Medical Science.

**Declaration of ethics:** The authors have declared no conflicts of interest or financial obligations.

**The article:** received 24 March 2021; revised 09 April 2021; accepted 02 July 2021; published 14 July 2021.