

Mutacije ret proto-onkogene v slovenski populaciji bolnikov z medularnim rakom ščitnice

Ret proto-oncogene mutations in the slovenian population of patients with medullary thyroid cancer

Miličević Sara¹, Bergant Damijan¹, Žagar Tina², Perić Barbara¹

¹Oddelek za onkološko kirurgijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

²Enota za epidemiologijo, Epidemiologija in register raka, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

Korespondenca: doc. dr. Barbara Perić, dr.med.

E-mail: bperic@onko-i.si

Poslano / Received: 23.10.2019

Sprejeto / Accepted: 2.2.2020

doi:10.25670/oi2020-002on

POVZETEK

Izhodišča. Medularni rak ščitnice (MRŠ) je redek endokrini tumor, ki se v približno 25 % primerov pojavlja v družinski obliki bolezni v sklopu multiple endokrine neoplazije tipa 2, v 75 % pa je bolezen sporadična. Namen dela je bil oceniti incidenco MRŠ ter pogostost in vrsto RET-mutacij v slovenski populaciji bolnikov med letoma 1995 in 2015.

Metode. Retrospektivno smo analizirali podatke Registra raka Republike Slovenije in Registra bolnikov z MRŠ Onkološkega Inštituta v Ljubljani, zbrane med letoma 1995 in 2015. Vključili smo 143 bolnikov s potrjenim MRŠ in 43 njihovih zdravih sorodnikov, ki so bili napoteni na genetsko svetovanje in testiranje. Genomsko DNK smo izolirali iz levkocitov periferne krvi. Eksone 10, 11, 13, 14, 15 in 16 RET protoonkogene smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo. Točkovne mutacije RET protoonkogene smo odkrili z metodo SSCA in DNA-sekvenciranjem. Zaznane mutacije so bile potrjene z restriktijskimi encimi.

Rezultati. Zarodno mutacijo RET protoonkogene smo odkrili pri 51 osebah; med njimi je bilo 37 bolnikov z MRŠ, kar predstavlja 25,9 % vseh bolnikov z MRŠ. Odkrili smo osem različnih mutacij RET protoonkogene. Najpogosteje smo potrdili mutacijo v kodonih 634 in 618, sledili so kodoni 790, 804 in 918. Povprečna groba letna incidenčna stopnja MRŠ v Sloveniji za opazovano obdobje znaša 0,34/100.000 prebivalcev.

Zaključek. Ocenjena povprečna groba letna incidenčna stopnja MRŠ v Sloveniji je bila 0,34/100.000. Poleg tega smo ugotovili, da se RET-mutacija pojavlja v naši populaciji bolnikov v 25,9 % ter da najpogosteje prizadene kodona 634 in 618.

Ključne besede: medularni karcinom ščitnice, multipla endokrini neoplazija 2, genetsko svetovanje in testiranje, totalna tiroidektomija, groba incidenčna stopnja

ABSTRACT

Background. Medullary thyroid cancer (MTC) is a rare, endocrine tumour that occurs as part of hereditary cancer syndrome in approximately 25% of cases and develops as a sporadic form in 75%. The aim of the study was to evaluate the frequency and type of RET mutation occurrence in the Slovenian population between 1995 and 2015.

Methods. A retrospective analysis of the National Cancer Registry of the Republic of Slovenia and the Registry of Patients with MTC of the Institute of Oncology in Ljubljana between 1995 and 2015 was made. The data of 143 patients with confirmed MTC and 43 healthy relatives referred to genetic counselling and testing was analyzed. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes. Exons 10, 11, 13, 14, 15 and 16 of the RET proto-oncogene were amplified in the polymerase chain reaction (PCR). Point mutations of the RET gene were detected by single strand confirmation analysis (SSCA) and DNA sequencing. Detected mutations were confirmed by restriction enzymes.

Results. A germline mutation in the RET proto-oncogene was identified in 51 individuals, 37 among them were patients with MTC, which accounts for 25.9% of all patients with MTC. Eight different germline RET mutations were found. Codons 634 and 618 were the most frequently altered codons, followed by codon 790, codon 804 and codon 918. The average crude incidence rate of MTC (between 1995 and 2015) is 0.34 per 100,000.

Conclusions. We estimated that the crude incidence rate of MTC in Slovenia is 0.34 per 100,000. We discovered that 25.9% of Slovenian patients with MTC are RET mutation carriers. The most common mutations were found on codons 634 and 618.

Keywords: medullary thyroid carcinoma, multiple endocrine neoplasia 2, genetic counselling and testing, total thyroidectomy, crude incidence rate

UVOD

Medularni rak ščitnice (MRŠ) je neuroendokrini tumor parafolikularnih oz. C-celic ščitnice. C-celice izvirajo iz embrionalnega nevralnega grebena, njihova značilnost pa je tvorba kalcitonina. MRŠ je po kliničnih lastnostih in histološki sliki podoben neuroendokrinim tumorjem, kot so karcinoidi in otočkastocelični tumorji (1).

Biološke značilnosti MRŠ so za bolnike manj ugodne v primerjavi z drugimi dobro diferenciranimi raki ščitnice (2). 10-letno celokupno preživetje bolnikov z MRŠ je približno 50 %. Najpomembnejši prognostični faktor je stadij tumorja ob diagnozi, zato sta pomembna zgodnja diagnostika in zgodnje kirurško zdravljenje (2, 3).

MRŠ predstavlja 5–10 % vseh rakov ščitnice (2). MRŠ najpogosteje odkrijemo kot solitaren nodus v zgornjem polu ščitnice. Najpogosteje se pojavi med 4. in 6. desetletjem življenja (4). Moški in ženske zbolijo v približno enakem odstotku (2).

Večina MRŠ je sporadičnih, v približno 20–25 % pa odkrijemo družinsko obliko bolezni, v sklopu multiple endokrine neoplazije tipa 2 (MEN 2), ki se deduje avtosomno dominantno (1). Zaradi pogostosti družinske oblike bolezni vse bolnike z MRŠ in krvne sorodnike nosilcev mutacije napotimo na genetsko svetovanje in testiranje. Le tako lahko odkrijemo mutacijo pri zdravih nosilcih še pred razvojem MRŠ (4).

MRŠ se pojavlja v sklopu dveh sindromov, MEN 2A in MEN 2B (1). Oba povzročata konstitutivna aktivacija mutiranega RET protoonkogenega. Bolniki s klasičnim sindromom MEN 2A zbolijo z MRŠ, lahko pa tudi s feokromocitom (PHEO) v 40–50 % nosilcev mutacije, primarnim hiperparatiroidizmom (HPTH) v 10–20 %, Hiršprungovo boleznijo (HSCR) v 7 % in v redkih primerih s kožno lihenamiloidozo (4). Penetranca MRŠ v družinah z RET-mutacijo je kar 95 % (5). Z opisanim klasičnim fenotipom MEN 2A so povezane mutacije kodona 634, nekoliko manj pa kodonov 609, 611, 618 ali 620 (4). Za bolnike s sindromom MEN 2B sta značilna zgodnejši pojav MRŠ in večja smrtnost kot pri bolnikih z MEN 2A. MEN 2B se pojavlja redkeje, samo v 5–10 % bolnikov s sindromom MEN 2. Za bolnike s sindromom MEN 2B je značilen MRŠ v kombinaciji s PHEO (45 %), z multiplimi mukoznimi nevrinomi (100 %) in marfanoidnim habitusom (65 %) (5). Za kar 95 % bolnikov s klasičnim fenotipom MEN 2B je značilna zarodna mutacija RET protoonkogenega v kodonu 918 (4).

Prognoza zgodaj odkritega in zdravljenega MRŠ je boljša, zato se nosilec RET-mutacije svetuje preventivna totalna tiroidektomija (TT) (6). V katerem življenjskem obdobju je treba opraviti preventivno TT, je odvisno od vrste mutacije (4). Poleg mutacij so opisane tudi spremembe RET protoonkogenega, katerih klinični pomen ni jasen. Za nekatere izmed teh različic nejasnega pomena (*angl. variant of unknown significance, VUS*) se je tradicionalno uporabljal izraz polimorfizmi, mednje pa sodijo tudi intronske mutacije (4).

Oceniti, kako pogosto se v neki populaciji pojavlja mutacija, ki šele po nekaj letih ali desetletjih vodi v nastanek bolezni, je zahtevno. Natančno incidenco in prevalenco mutacij v populaciji lahko poznamo, le če skrbno beležimo nosilce mutacij v populacijskem registru (7). Tovrstni registri za nosilce RET-mutacij v Evropi niso na voljo.

Slovenski bolniki z MRŠ po potrditvi te oblike raka ščitnice zdravljenje nadaljujejo na Onkološkem inštitutu Ljubljana (OI). Od leta 1995 sta v tej ustanovi na voljo genetsko svetovanje in testiranje prisotnosti mutacij RET protoonkogenega. Podatki o bolnikih z MRŠ in nosilcih RET-mutacije so se do pred kratkim beležili v bolnišnični zbirki podatkov (Register bolnikov z MRŠ

OI Ljubljana), v zadnjem letu pa bolnike z MRŠ obravnavamo v sklopu Ambulante za onkološko genetsko svetovanje.

Namen našega dela je bil oceniti grobo letno incidenčno stopnjo MRŠ v Sloveniji ter opisati vrsto in pogostost RET-mutacij v naši populaciji.

MATERIAL IN METODE

Retrospektivno smo analizirali podatke 199 bolnikov, obolelih za MRŠ, v letih 1995–2015 in zdravih oseb, vključenih v program genetskega svetovanja in testiranja. Iz Registra raka Republike Slovenije (RRRS) smo prejeli podatke o 156 bolnikih z MRŠ. Te smo primerjali s podatki Registra bolnikov z MRŠ OI Ljubljana. V Registru bolnikov z MRŠ OI Ljubljana so zbrani podatki 149 bolnikov z MRŠ ter 43 testiranih sorodnikov, pri katerih MRŠ nismo dokazali. Pregledali smo vse citološke in histološke izvide ter iz raziskave izločili tri bolnike, ki niso imeli dokazanega MRŠ. Zdravniška dokumentacija dveh bolnikov, ki nista bila zdravljeni na OI, ni bila dostopna. Dva bolnika iz RRRS zaradi neznanega razloga nista bila v Registru bolnikov MRŠ OI. Osem bolnikov, ki med ugotovitvijo MRŠ niso bili prebivalci Slovenije, smo izločili iz raziskave. Število vseh slovenskih bolnikov z MRŠ, ki so bili zdravljeni na OI med letoma 1995 in 2015, je torej 143. Časovno obdobje smo opredelili glede na leto uvedbe genetskega testiranja v Sloveniji leta 1995 in razpoložljivost podatkov v RRRS, ki so trenutno na voljo za leto 2015.

V Sloveniji genetsko svetovanje in testiranje ponudimo vsem bolnikom s histološko potrjenim MRŠ. V navedenem obdobju smo na OI Ljubljana bolnikom z MRŠ in njihovim zdravim sorodnikom v prvem kolenu sorodstva po podpisu soglasja za genetsko testiranje odvzeli vzorec periferne venske krvi. Iz levkocitov je bila nato z uveljavljenimi metodami pridobljena genomska DNK (deoksiribonukleinska kislina). Eksoni 10, 11, 13, 14, 15 in 16 RET protoonkogenega so bili pomnoženi z verižno reakcijo s polimerazo. Točkovne mutacije RET protoonkogenega so bile odkrite z metodo enoverižne konformacijske analize (*angl. Single Strand Conformation Analysis, SSCA*) in DNK-sekvenciranjem. Zaznane mutacije so bile potrjene z restrikcijскими encimi. Ob pozitivnih rezultatih je bilo za dvojno potrditev ponovljeno genetsko testiranje (z novim krvnim vzorcem). Metoda je standardna in predhodno natančno opisana (8, 9). Genetsko testiranje so opravili v Laboratoriju za Molekularno genetiko Inštituta za patologijo MF Ljubljana pod vodstvom prof. dr. Glavača.

Paciente smo razdelili glede na to, ali so imeli v družinski anamnezi MRŠ, PHEO in/ali HPTH ali pa je bila družinska anamneza negativna. Upoštevali smo starost bolnikov z MRŠ med postavitvijo diagnoze ter starost nosilcev mutacije med preventivno TT. Grobo letno incidenčno stopnjo smo izračunali kot število novih primerov MRŠ v časovnem obdobju (v enem letu), deljeno s številom oseb, ki so na sredini tega opazovnega obdobja živele v slovenski populaciji. Podatke o številu prebivalstva smo pridobili na podatkovnem portalu SI-STAT Statističnega urada Republike Slovenije (10). Časovni trend smo ovrednotili z regresijsko analizo Joinpoint. Uporabili smo program Joinpoint Regression Program (Version 4.6.0.0.–April 2018) (11,12). Pogostnost mutacij smo izrazili glede na število družin z določeno mutacijo. Število testiranih smo izrazili kot razmerje – število testiranih sorodnikov/indeks bolnik. Pri izračunu smo upoštevali le družine, katerih indeks bolnik je imel histološko potrjen MRŠ v obdobju 1995–2015 ter dokazano mutacijo RET protoonkogenega. Statistično analizo podatkov smo opravili s pomočjo programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences za Windows verzija 19.0). Rezultati so izraženi kot povprečje s standardnim odklonom. Kot statistično pomembno smo upoštevali vrednost $p < 0,05$.

REZULTATI

Retrospektivno smo analizirali podatke 199 oseb, obolelih za MRŠ, in oseb, vključenih v genetsko svetovanje in testiranje prisotnosti RET-mutacije v letih 1995–2015. Sprva smo primerjali osebne podatke bolnikov z MRŠ, zbranih v RRRS, s podatki bolnikov iz Registra bolnikov z MRŠ OI Ljubljana in odkrili popolno ujemanje v 149 primerih. Primerjava podatkov RRRS in Registra bolnikov z MRŠ OI Ljubljana je tako pokazala, da se populaciji bolnikov ujemata v 95,5 %. V 21-letnem opazovanem obdobju smo v slovenski populaciji zasledili 143 novih primerov MRŠ. Povprečna groba letna incidenčna stopnja MRŠ v Sloveniji v obdobju 1995–2015 znaša 0,34/100.000. Letna incidenčna stopnja je v povprečju skozi celotno obdobje naraščala s 3,6-odstotnim letnim prirastkom ($p < 0,05$). Slika 1 prikazuje grobe letne incidenčne stopnje in trendno črto, temelječo na modelu Joinpoint.

Med bolniki z MRŠ je bilo 72 (72/143; 50,3 %) žensk in 71 (71/143; 49,7 %) moških. Izmed 143 bolnikov z MRŠ je družinsko obremenitev navajalo 21 bolnikov (21/143; 14,7 %), negativno družinsko anamnezo pa 113 bolnikov (113/143; 79,0 %); v dokumentaciji 9 bolnikov (9/143; 6,3 %) podatka o družinski anamnezi ni. Pri vseh bolnikih (21/21) s pozitivno družinsko anamnezo smo odkrili mutacijo RET protoonkogenega.

Med bolniki z negativno družinsko anamnezo smo odkrili 16 (16/113; 14,2 %) nosilcev mutacije RET protoonkogenega, pri 10 (10/113; 8,8 %) pa smo dokazali VUS. Sporadično obliko MRŠ smo potrdili pri 85 (85/113; 75,2 %) bolnikih, saj prisotnosti mutacije nismo dokazali, dva bolnika pa v genetsko testiranje nista privolila. Štirje (4/16; 25,0 %) bolniki z mutacijo RET protoonkogenega, a z negativno družinsko anamnezo so navajali pri sorodnikih v prvem ali drugem kolenu druge boleznī ščitnice.

Povprečna starost bolnikov s sporadično obliko MRŠ je bila med odkritjem bolezni $58,8 \pm 14,4$ leta, bolnikov z RET-mutacijo pa $41,4 \pm 19,3$ leta. Med obema skupinama je bila statistična pomembna razlika v starosti med odkritjem bolezni ($p < 0,05$). Preventivna TT je bila opravljena v povprečni starosti $22,2 \pm 17,0$ leta.

Skupno smo mutacijo RET protoonkogenega odkrili pri 51 osebah. Med 143 bolniki z MRŠ je bila mutacija prisotna v 37 primerih (37/143), kar predstavlja 25,9 % opisane populacije bolnikov. Odkriti nosilci mutacij so izvirali iz 20 različnih družin. Najpogosteje smo odkrili mutacijo v kodonih 634 (6/20; 30,0 %) in 618 (6/20; 30,0 %), sledili so kodon 790 (5/20; 25,0 %), kodon 804 (2/20, 10,0 %) in kodon 918 (1/20; 5,0 %).

Odkritih je bilo 10 bolnikov z MRŠ in VUS, ki so pripadali 10 različnim družinam. Zaznani sta bili dve različici na intronu in štiri različice na eksonu. Pri treh bolnikih smo odkrili kombinacijo intronskih sprememb +84 G>A ter +88delC.

Testirali smo tudi 55 sorodnikov 30 bolnikov, ki so znani nosilci sprememb zaporedja RET protoonkogenega, s histološko dokazanim MRŠ po terapevtski TT. Odkrili smo 31 (31/55; 56,4 %) nosilcev mutacije in/ali VUS ter 24 (24/55 43,6 %) sorodnikov brez sprememb zaporedja RET protoonkogenega. Genetsko testiranje sta opravila 2,8 sorodnika/indeks bolnika (nosilca mutacije). Na podlagi rezultatov testiranja smo preventivno TT opravili pri 26 nosilcih RET-mutacije. Pri dvanajstih (12/26; 46,2 %) je patohistološki izvid po posegu potrdil MRŠ, pri dvanajstih (12/26; 46,2 %) le hiperplazijo C-celic (HCC), pri dveh (2/26; 7,7 %) pa v tkivu ščitnice nismo našli MRŠ ali HCC. Pet sorodnikov bolnikov z MRŠ ter VUS zaradi nejasnosti vpliva teh sprememb na tveganje za razvoj MRŠ redno ambulantno spremljamo. V tabeli 1 so navedeni fenotipi družin vseh odkritih nosilcev mutacije ali VUS.

Slika 1: Groba letna incidenčna stopnja MRŠ v obdobju 1995–2015 s trendno črto, temelječo na modelu Joinpoint

Groba letna incidenčna stopnja MRŠ v obdobju 1995 – 2015 s trendno črto

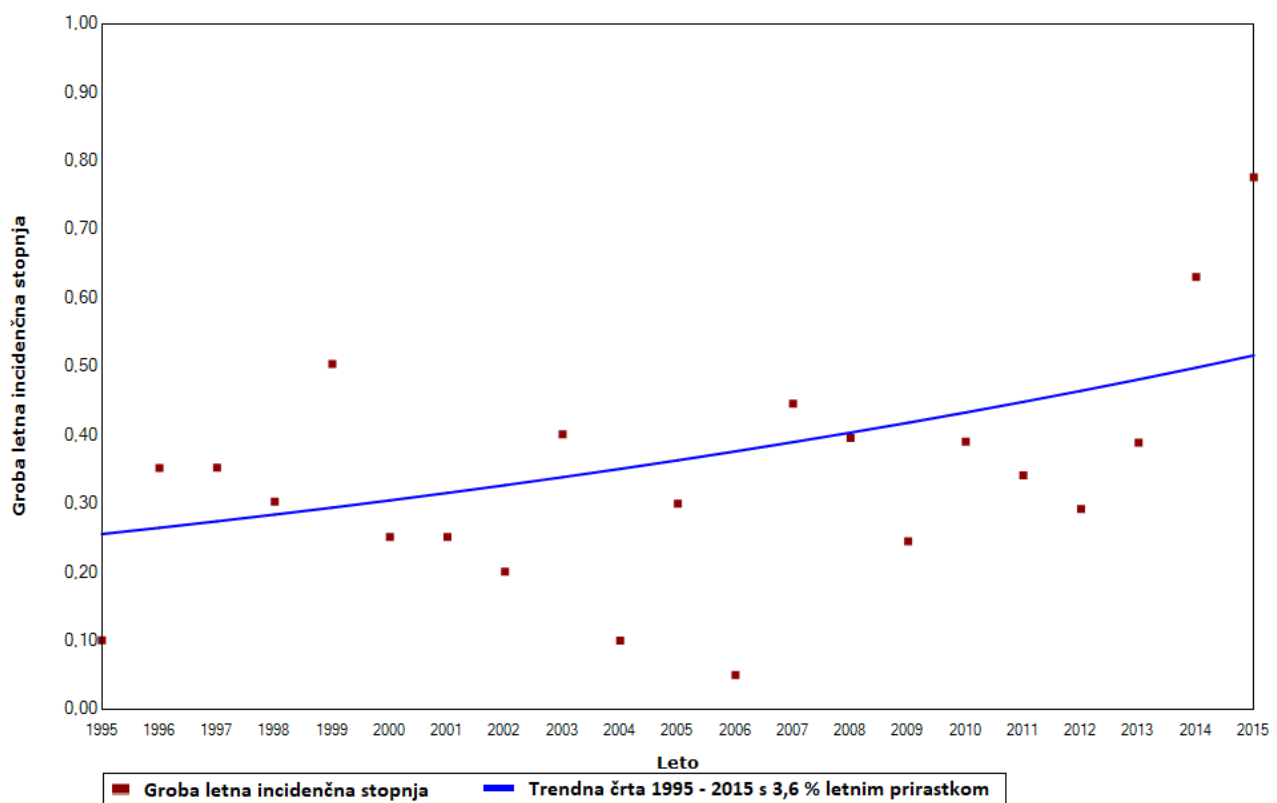


Tabela 1: Fenotipi družin vseh odkritih nosilcev mutacije ali VUS

| DRUŽINA | SPOL | | ŠT. TESTIRANIH | GC | MUTACIJA | BOLEZNI | | | | TERAPEVTSKA TT | PROFILAKTIČNA TT | | |
|-----------------|------|---|----------------|--------------------|--------------------------------|---------|------|------|------|----------------|------------------|-----|--------|
| | M | F | | | | MRŠ | PHEO | HPTH | HSCR | | MRŠ | HCC | ni HCC |
| 1 | 2 | 2 | 4 | 4 | C618S | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | C634R | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 3 ^a | 2 | 3 | 5 | 2 | C634G | 2 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 4 ^a | 4 | 3 | 7 | 6 | C634Y | 6 | 3 | 0 | 0 | 2 | 4 | 0 | 0 |
| 5 | 4 | 2 | 6 | 3 + 1 ^b | C618S | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| 6 ^a | 0 | 2 | 2 | 2 | L790F | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 7 ^a | 2 | 2 | 4 | 1 | C634Y | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 8 ^a | 4 | 2 | 6 | 4 | C618F | 3 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| 9 ^a | 0 | 1 | 1 | 1 | C618F | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 10 ^a | 2* | 1 | 3* | 3* | C634R | 2* | 2* | 2* | 0 | 2* | 0 | 1 | 0 |
| 11 ^a | 1 | 1 | 2 | 2 | C618F | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 12 ^a | 0 | 2 | 2 | 2 | L790F | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 13 ^a | 2 | 3 | 5 | 3 | L790F | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| 14 ^a | 4 | 4 | 8 | 5 | L790F | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 15 ^a | 2 | 0 | 2 | 2 | V804M | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 16 ^a | 4 | 4 | 8 | 7 | L790F | 5 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 2 | 0 |
| 17 ^a | 0 | 1 | 1 | 1 | V804M | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 18 ^a | 1 | 3 | 4 | 1 | C634R | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 19 ^a | 2 | 0 | 2 | 1 | C618F | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 20 ^a | 1 | 1 | 2 | 1 | M918T | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 1 | 0 | 1 | 1 | S649L | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 0 | 1 | 1 | 1 | S836S | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 1 | 1 | 2 | 2 | IVS8+84G>A, IVS8+88delC | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 1 | 0 | 1 | 1 | S904S | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 2 | 0 | 2 | 2 | IVS8+84G>A, IVS8+88delC, S836S | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | 0 | 1 | 1 | 1 | S836S | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | 2 | 1 | 3 | 3 | IVS8+84G>A, IVS8+88delC | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 0 | 1 | 1 | 1 | G691S | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 29 | 0 | 1 | 1 | 1 | S904S | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | 1 | 0 | 1 | 1 | G691S | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

GC – nosilec mutacije; MRŠ – medularni karcinom ščitnice; PHEO – feokromocitom; HPTH – hiperparatiroidizem; HSCR – Hiršprungova bolezen; HCC – hiperplazija C celic; TT - totalna tiroidektomija; a Družine, katerih indeks bolnik je imel histološko potrjen MTC že pred letom 1995; b Družinski član je imel dokazan VUS S-904-S na 15. eksonu; *1 bolnik ni bil prebivalec Republike Slovenije.

RAZPRAVA

Retrospektivna analiza podatkov RRRS in bolnišničnega Registra bolnikov z MRŠ OI Ljubljana je pokazala, da je v obdobju 1995–2015 z MRŠ zbolelo 143 bolnikov, prebivalcev RS. RRRS, ki je eden najstarejših populacijskih registrov v Evropi, elektronsko beleži vse bolnike z diagnozo raka v Sloveniji. Podatki, pridobljeni s pomočjo nacionalnega registra, omogočajo natančnejšo oceno pogostosti bolezni v slovenski populaciji kot bolnišnični registri, na podlagi katerih poročajo drugi raziskovalci (13). Zaradi načina obdelave podatkov RRRS so bili med nastankom raziskave na voljo podatki za leto 2015 (14). Te podatke smo primerjali s podatki bolnišničnega Registra bolnikov z MRŠ OI Ljubljana, v katerem so zabeleženi podatki o bolnikih z MRŠ in sorodnikih, vključenih v program genetskega svetovanja in testiranja. To bazo na OI Ljubljana vodimo od leta 1995. Ob tem je pomembno vedeti, da so mutacije RET protoonkoga in njihov pomen za nastanek MRŠ znane šele iz let 1993 in 1994, kar je omogočilo genetsko svetovanje (15). Primerjava podatkov RRRS in Registra bolnikov z MRŠ OI Ljubljana je pokazala, da se zabeleženi podatki o bolnikih z MRŠ ujemajo v 95,5 % primerov. V petih primerih neujemanja bolnikom, navedenim v RRRS, s ponovnim pregledom dokumentacije MRŠ nismo potrdili, dva bolnika iz RRRS pa zaradi neznanega razloga nista bila v Registru bolnikov MRŠ OI.

V obdobju 1995–2015 je bilo v RRRS zabeleženih 2.695 primerov raka ščitnice, od tega 143 MRŠ (16). Delež MRŠ torej znaša 5,3 % vseh karcinomov ščitnice, kar je skladno z opisi v literaturi (2). V majhni slovenski populaciji letno na novo zbolijo številno oseb za redko boleznijo, kot je MRŠ. Leta 2015 smo odkrili največ bolnikov, MRŠ smo namreč diagnosticirali 16 osebam, medtem ko je bil v letu 2006 MRŠ histološko dokazan le pri eni osebi. Posledično se grobe letne incidenčne stopnje med leti močno razlikujejo. S pomočjo programa Joinpoint Regression, ki se uporablja za opis in kvantifikacijo trendov s prilagajanjem opazovanih (incidenčnih) stopenj v krivuljo, ki z naklonom in s smerjo predstavlja spreminjanje trendov (12), smo ugotovili, da je incidenca MRŠ v slovenski populaciji v opazovanem obdobju v povprečju naraščala. Povprečni letni prirastek je znašal 3,6 % in je statistično pomemben ($p < 0,05$). Povprečna groba letna incidenčna stopnja MRŠ v Sloveniji v obdobju 1995–2015 znaša 0,34/100.000.

Kljub majhni populaciji slovenskih bolnikov z MRŠ je bila med nosilci mutacije in sporadičnimi bolniki z MRŠ statistično pomembna razlika v starosti med odkritjem bolezni; povprečna starost bolnikov s sporadično obliko MRŠ je bila $58,8 \pm 14,4$ leta, bolnikov z RET-mutacijo pa $41,4 \pm 19,3$ leta. Tudi tuji raziskovalci poročajo, da je družinska oblika MRŠ odkrita 15–20 let prej kot sporadična, kar je posledica predvsem aktivnega iskanja nosilcev mutacij pri sorodnikih bolnikov s sindromom MEN 2 ter posledičnim odkritjem MRŠ, ko bolezen še ni klinično izražena (17, 18). MRŠ pa se pri nosilcih mutacije v povprečju pojavi pri mlajših bolnikih kot sporadična oblika bolezni (4).

V izbrani populaciji bolnikov z MRŠ jih je 14,7 % navajalo družinsko obremenitev, na podlagi katere bi lahko posumili na sindrom MEN. Pri preostalih bolnikih družinska obremenitev ni bila prisotna (79,0 %) ali pa podatke ni bil znan (6,3 %). Mutacijo RET protoonkoga smo odkrili pri vseh bolnikih z MRŠ in družinsko obremenitvijo ter pri 14,2 % tistih, ki niso navedli družinske obremenitve. Raziskovalci poročajo o 5–10 % odkritih RET-mutacij v navidezno sporadični skupini bolnikov z MRŠ (19). Skupno smo v slovenski populaciji mutacijo RET protoonkoga odkrili pri 25,9 % bolnikov z MRŠ, kar je skladno s poročili drugih raziskovalcev (1).

Opisali smo tudi VUS-spremembe RET protoonkoga, ki smo jih odkrili pri 7,0 % bolnikov z MRŠ. Tudi pri petih testiranih sorodnikih smo odkrili VUS, ki je mogoče prav tako povezana

z večjo dovzetnostjo za razvoj ali progres MRŠ (5). Pri treh bolnikih odkrita kombinacija intronskih sprememb +84G > A ter +88 del C v literaturi še ni bila opisana. V zadnjih letih so bile objavljene raziskave, ki so opisovale povečano prevalenco VUS pri bolnikih z družinskim ali sporadičnim MRŠ v primerjavi s splošno populacijo (5). VUS naj bi bile odgovorne za višjo ogroženostjo za razvoj MRŠ, nekatere tudi za zgodnejši nastanek bolezni in večje tveganje za zasevke v regionalnih bezgavkah in oddaljenih organih (20). Drugi avtorji razlike v pojavnosti VUS med pacienti z MRŠ in splošno populacijo niso potrdili (5).

Pri bolnikih, ki so zboleli za MRŠ v obdobju 1995–2015, in njihovih testiranih družinskih članih smo zasledili mutacije na eksonih 10, 11, 13, 14 ter 16. Testiranja prisotnosti mutacije na eksonih 8 in 9 v naši populaciji bolnikov trenutno ne izvajamo. Čeprav so mutacije teh eksonov redke, bi bilo smiselno razmisliti o uvedbi testiranja. Irci so namreč leta 2013 objavili prikaz primera 30-letne slovenske bolnice, pri kateri so odkrili nadledvične žleze PHEO ter z genetskimi testi dokazali zarodno mutacijo RET protoonkoga na eksonu 8, in sicer G533C. Opravili so tudi preventivno TT in potrdili HCC. To je prvi opisan primer mutacije eksona 8 pri osebi slovenskega izvora. Pri materi opisane bolnice je bila opravljena TT, ne pa tudi genetsko testiranje, in odkrit MRŠ (21). Mutacija G533C je sicer karakteristična za grško etnično skupino, s prevalenco 36,2 % v skupini bolnikov z dednim MRŠ, in specifična za mediteransko območje. Dejstvo, da vse države ne testirajo 8 eksona RET protoonkoga, je mogoče razlog za redko odkritje te mutacije v družinah zunaj zahodne Evrope (22).

V slovenski populaciji bolnikov z MRŠ so bile najpogostejše družine z mutacijo kodonov 634 (30,0 %) in 618 (30,0 %). Mutacije, izražene glede na število odkritih družin, omogočajo primerjavo z drugimi evropskimi populacijami. Mutacija v kodonu 634 je tudi v literaturi opisana kot najpogostejša mutacija dedne oblike MRŠ (5). Z njo povezujemo pogostejši pojav PHEO in agresivnejši potek MRŠ (22). Tretje najpogostejše odkrito mutacijo smo našli na kodonu 790 (ekson 13). Mutacija L790F je v drugih populacijah opisana kot manj pogosta (5). Visok odstotek teh mutacij so zasledili le še v Nemčiji (13 %), kjer so 3-krat pogostejše kot v opisani francoski ali italijanski populaciji (7). V italijanski populaciji zelo pogosto odkrito mutacijo V804M smo pri nas potrdili le pri dveh družinah (23). V družinah s to mutacijo se najpogosteje pojavlja samo MRŠ, bolezen pa naj bi bila manj agresivna. V novejšem času to mutacijo povezujejo z neobčutljivostjo na tirozin kinazne inhibitorje, kar mogoče kaže na to, da lahko vrsta mutacije vpliva tudi na zdravljenje napredovalega MRŠ (19). Pri enem bolniku pa smo odkrili de novo mutacijo na kodonu 918, ki se pojavlja v več kot 95 % primerov bolnikov s sindromom MEN 2B in ki je zaradi zgodnjega nastopa in agresivne oblike bolezni uvrščena med mutacije z zelo visokim tveganjem (4). V izbranem obdobju nismo dokazali mutacij v kodonih 620 in 891, ki se pogosteje pojavljajo v drugih evropskih državah (22).

Znano je, da se fenotip bolnikov razlikuje glede na mesto mutacije RET protoonkoga (24). Največ pridruženih endokrinopatij smo odkrili pri nosilcih mutacije v kodonu 634 RET protoonkoga. Bolniki z mutacijo na s cisteinom bogati ekstracelularni domeni tirozin kinaznega receptorja (kodona 618 in 634) so imeli poleg MRŠ pridružen uni- ali bilateralni PHEO v 39,1 % primerov, HPTH pa v 17,4 %. Prisotnost spremljajočih paratiroidnih in adrenalnih neoplazij je skladna z opisi v literaturi (4). Tudi v naši populaciji smo pri nosilki mutacije C618S poleg MRŠ odkrili HSCR. Koeksistenca MEN2A in HSCR je opisana pri nosilcih mutacij v kodonu 620, v manjši meri pa tudi v kodonih 609, 611 in 618 (23).

MRŠ kot samostojno entiteto smo odkrili pri 4 od 5 družin z

dokazano mutacijo L790F ter pri 12 družinah, v katerih je bila odkrita mutacija V804M ali pa VUS. Eden izmed članov družine z dokazano mutacijo L790F je imel poleg MRŠ tudi HPTH. V literaturi HPTH v povezavi z mutacijo L790F ne poročajo (25, 26). L790F in V804M sta tudi sicer opisani kot mutaciji, značilni za podtip sindroma MEN 2A, pri katerem se MRŠ pojavlja brez spremljajočih endokrinopatij (4).

Nosilci mutacij RET protoonkogeno so pripadali 20 različnim družinam. V povprečju sta genetsko testiranje v slovenski populaciji opravila 2,8 sorodnika/indeks bolnika. Na število testiranih sorodnikov in opravljenih preventivnih TT vplivata velikost družin in tudi compliance bolnikov oziroma zdravih sorodnikov. To razmerje je v naši populaciji višje kot v sorodni grški študiji (2,2 sorodnika/indeks bolnika) in nižje od študije Italijanov (3,4 sorodnika/indeks bolnika) (22, 23). Zanimivo je, da so podatki španske študije o testiranju BRCA zarodne mutacije primerljivi, saj so v povprečju testirali 3,6 sorodnika/indeks bolnika, čeprav je ozaveščenost ljudi o dednem raku dojke in/ali jajčnikov višja kot ozaveščenost o družinski obliki MRŠ (27). V nasprotju z mediteranskimi državami pa lahko precej višjo compliance opazimo na Danskem, kjer je bilo za mutacijo RET protoonkogeno v povprečju testiranih kar 8,9 sorodnika/indeks bolnika (15). Sicer uspešen program genetskega svetovanja in testiranja bolnikov z MRŠ v naši populaciji bo v prihodnje treba nadgraditi z ozaveščanjem o pomenu sindroma MEN in pravočasnem odkrivanju nosilcev mutacij.

ZAKLJUČKI

Z retrospektivno analizo podatkov smo ocenili povprečno grobo letno incidenčno stopnjo MRŠ v slovenski populaciji, ki za opazovano obdobje znaša 0,34/100.000 prebivalcev. RET-mutacijo smo odkrili pri 25,9 % bolnikov, rezultat pa je skladen s poročili drugih raziskovalcev. Najpogosteje mutacija prizadene kodona 634 in 618.

LITERATURA

- Somnay YR, Schneider D, Mazeh H. Thyroid: Medullary Carcinoma. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2013 Apr;17(4):291-6.
- Elisei R, Alevizaki M, Conte-Devolx B, Frank-Raue K, Leite V, Williams GR. 2012 European thyroid association guidelines for genetic testing and its clinical consequences in medullary thyroid cancer. *Eur Thyroid J* 2013 Jan;1(4):216-31.
- Qi XP, Zhao JQ, Du ZF, Yang RR, Ma JM, Fei J, et al. Prophylactic thyroidectomy for MEN 2-related medullary thyroid carcinoma based on predictive testing for RET proto-oncogene mutation and basal serum calcitonin in China. *Eur J Surg Oncol* 2013 Sep;39(9):1007-12.
- Wells SA, Jr., Asa SL, Dralle H, Elisei R, Evans DB, Gagel RF, et al. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2015 Jun;25(6):567-610.
- Ceolin L, Siqueira DR, Romitti M, Ferreira CV, Maia AL. Molecular basis of medullary thyroid carcinoma: the role of RET polymorphisms. *Int J Mol Sci* 2012;13(1):221-39.
- Gimm O. Thyroid cancer. *Cancer Lett* 2001 Feb 26;163(2):143-56.
- Machens A, Lorenz K, Sekulla C, Hoppner W, Frank-Raue K, Raue F, et al. Molecular epidemiology of multiple endocrine neoplasia 2: implications for RET screening in the new millennium. *Eur J Endocrinol* 2013 Mar;168(3):307-14.
- Zupan A, Glavac D. The development of rapid and accurate screening test for RET hotspot somatic and germline mutations in MEN2 syndromes. *Exp Mol Pathol* 2015 Dec;99(3):416-25.
- Bergant D, Hocevar M, Besic N, Glavac D, Korosec B, Caserman S. Hereditary medullary thyroid cancer in Slovenia—genotype-phenotype correlations. *Wien Klin Wochenschr* 2006 Jul;118(13-14):411-6.
- Podatkovni portal SI-STAT [spletna stran na internetu]. Pridobljeno 22.5.2017 s spletne strani: <http://pxweb.stat.si/pxweb/dialog/statfile2.asp/>.
- Joinpoint Regression Program [računalniški program]. Version 4.5.0.0. - May 2017.
- Kim HJ, Fay MP, Feuer EJ, Midthune DN. Permutation tests for joinpoint regression with applications to cancer rates. *Stat Med* 2000 Feb 15;19(3):335-51.
- Figlioli G, Landi S, Romei C, Elisei R, Gemignani F. Medullary thyroid carcinoma (MTC) and RET proto-oncogene: mutation spectrum in the familial cases and a meta-analysis of studies on the sporadic form. *Mutat Res* 2013 Jan;752(1):36-44.
- Rak v Sloveniji. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije; 2016.
- Mathiesen JS, Kroustrup JP, Vestergaard P, Stochholm K, Poulsen PL, Rasmussen AK, et al. Distribution of RET Mutations in Multiple Endocrine Neoplasia 2 in Denmark 1994-2014: A Nationwide Study. *Thyroid* 2017 Feb;27(2):215-23.
- Zadnik V, Primic ZM, Lokar K, Jarm K, Ivanus U, Zagar T. Cancer burden in slovenia with the time trends analysis. *Radiol Oncol* 2017 Mar 1;51(1):47-55.
- Raue F. German medullary thyroid carcinoma/multiple endocrine neoplasia registry. German MTC/MEN Study Group. Medullary Thyroid Carcinoma/Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. *Langenbecks Arch Surg* 1998 Oct;383(5):334-6.
- Kihara M, Miyauchi A, Yoshioka K, Oda H, Nakayama A, Sasai H, et al. Germline RET mutation carriers in Japanese patients with apparently sporadic medullary thyroid carcinoma: A single institution experience. *Auris Nasus Larynx* 2016 Oct;43(5):551-5.
- Romei C, Mariotti S, Fugazzola L, Taccaliti A, Pacini F, Opocher G, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes (MEN 2): results from the ItaMEN network analysis on the prevalence of different genotypes and phenotypes. *Eur J Endocrinol* 2010 Aug;163(2):301-8.
- Ceolin L, Siqueira DR, Ferreira CV, Romitti M, Maia SC, Leiria L, et al. Additive effect of RET polymorphisms on sporadic medullary thyroid carcinoma susceptibility and tumor aggressiveness. *Eur J Endocrinol* 2012 May;166(5):847-54.
- Casey R, Prendeville S, Joyce C, O'Halloran D. First reported case in Ireland of MEN2A due to a rare mutation in exon 8 of the RET oncogene. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep* 2013;2013:130044.
- Sarika HL, Papathoma A, Garofalaki M, Saltiki K, Pappa T, Pazaitou-Panayiotou K, et al. Genetic screening of patients with medullary thyroid cancer in a referral center in Greece during the past two decades. *Eur J Endocrinol* 2015 Apr;172(4):501-9.

23. Romei C, Tacito A, Molinaro E, Agate L, Bottici V, Viola D, et al. Twenty years of lesson learning: how does the RET genetic screening test impact the clinical management of medullary thyroid cancer? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015 Jun;82(6):892-9.
24. Toledo SP, Lourenco DM, Jr., Toledo RA. A differential diagnosis of inherited endocrine tumors and their tumor counterparts. *Clinics (Sao Paulo)* 2013 Jul;68(7):1039-56.
25. Bihan H, Murat A, Fysekidis M, Al-Salameh A, Schwartz C, Baudin E, et al. The clinical spectrum of RET proto-oncogene mutations in codon 790. *Eur J Endocrinol* 2013 Sep;169(3):271-6.
26. Frank-Raue K, Machens A, Scheuba C, Niederle B, Dralle H, Raue F. Difference in development of medullary thyroid carcinoma among carriers of RET mutations in codons 790 and 791. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008 Aug;69(2):259-63.
27. Moreno L, Linossi C, Esteban I, Gadea N, Carrasco E, Bonache S, et al. Germline BRCA testing is moving from cancer risk assessment to a predictive biomarker for targeting cancer therapeutics. *Clin Transl Oncol* 2016 Oct;18(10):981-7.

© Avtor(ji). To delo je objavljeno pod licenco Creative Commons Priznanje avtorstva 4.0.

© The author(s). This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0. International License (CC-BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>