

КОМБИНИРОВАННЫЙ АНАЛИЗ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИИ ГЕНА BRAF И ЭКСПРЕССИИ ГАЛЕКТИНА-3 В ДООПЕРАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д.Ю. Семенов^{1,2}, М.И. Зарайский², Л.Е. Колоскова³, М.Е. Борискова¹, И.Ю. Сабурова², П.А. Панкова¹, Н.С. Фещенко¹, О.И. Филиппова², У.В. Фарафонова¹, О.П. Пестерова², М.А. Быков¹

¹Кафедра общей хирургии (заведующий – доктор мед. наук, профессор Д.Ю. Семенов) Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова

²Кафедра лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины (заведующий – канд. мед. наук, профессор В.Л. Эммануэль) Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова

³Отделение переливания крови (заведующая – канд. мед. наук О.И. Филиппова) больницы №26, Санкт-Петербург
Д.Ю. Семенов – профессор, заведующий кафедрой общей хирургии ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад.И.П.Павлова; М.И. Зарайский – профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад.И.П.Павлова; Л.Е. Колоскова – врач-лаборант, клинико-диагностическая лаборатория СПбГУЗ Городская больница №26; М.Е. Борискова – ассистент кафедры общей хирургии ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад.И.П.Павлова; И.Ю. Сабурова – ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад.И.П.Павлова; П.А. Панкова – ассистент кафедры общей хирургии ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад.И.П.Павлова; Н.С. Фещенко – врач-хирург, кафедра общей хирургии ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад.И.П.Павлова; О.И. Филиппова – заведующий отделением переливания крови СПбГУЗ Городская больница №26; У.В. Фарафонова – клинический ординатор кафедры общей хирургии ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад.И.П.Павлова; О.П. Пестерова – аспирант кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад.И.П.Павлова; М.А. Быков – врач-хирург, кафедра общей хирургии ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад.И.П.Павлова

В ходе работы была изучена возможность использования определения экспрессии галектина-3 методом проточной флуориметрии и наличия мутации гена BRAF методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в пунктате из узла щитовидной железы, полученном при тонкоигольной аспирационной биопсии, в диагностике высокодифференцированного рака щитовидной железы на дооперационном этапе. В исследование включен 41 пациент с узловыми образованиями щитовидной железы. По данным цитологического исследования материала, полученного при тонкоигольной аспирационной биопсии, у 20 пациентов выявлен папиллярный рак щитовидной железы, у 17 – фолликулярная опухоль, у 4 – узловой коллоидный зоб. Методом проточной флуориметрии была исследована экспрессия галектина-3 и мутация гена BRAF методом ПЦР в материале пункционной биопсии. Чувствительность комбинированного анализа экспрессии галектина-3 и выявления мутации гена BRAF в диагностике рака щитовидной железы составила 95%, специфичность и диагностическая точность также по 95%. Комбинированный анализ экспрессии галектина-3 методом проточной флуориметрии и определение BRAF-мутации методом ПЦР могут быть использованы в дооперационной дифференциальной диагностике высокодифференцированного рака и доброкачественных узловых неоплазий щитовидной железы.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, галектин-3, BRAF.

Combined analysis of BRAF-gene mutation and galectin-3 expression in pre-operative diagnostics of thyroid cancer

D. Yu. Semenov^{1,2}, M. I. Saraisky², L. E. Koloskova³, M. E. Boriskova¹, I. Yu. Saburova², P. A. Pankova¹, N. S. Fechenko¹, O. I. Filippova², U. V. Farafonova¹, O. P. Pesterova², M. A. Bykov¹

Pavlov's Medical University of Sankt-Petersburg, Department of General Surgery and Department of Laboratory Diagnostics and Molecular Medicine

To assess the utility of combined detection BRAF gene mutation and Gal-3 expression from FNAB specimens in preoperative diagnostic of thyroid gland cancer. 41 patients with thyroid gland nodules were included in the study. By cytological conclusions of evaluated FNA specimens 20 patients had papillar thyroid cancer (PTC), 17 – follicular neoplasia, and 4 – nodular colloid goiter. Gal-3 expression were evaluated by flow cytometry method; BRAF gene mutation were evaluated by PCR. In our study the sensitivity of combined detection BRAF gene mutation and Gal-3 expression was 95%, specificity – 95%, diagnostic accuracy – 95%. Combined detection of BRAF gene mutation by PCR and Gal-3 expression by flow cytometry could be used in preoperative diagnostic of thyroid gland cancer.

Key words: *thyroid cancer, galectin-3, BRAF.*

Введение

Одним из актуальных вопросов современной тиреологии является диагностика рака щитовидной железы (РЩЖ), так как узловые образования ЩЖ обнаруживаются при ультразвукографическом исследовании у 13–67% взрослых, а выявление рака среди них составляет 5–10% [1]. Стандартным методом дооперационной диагностики РЩЖ является тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) с цитологическим исследованием аспириата. Однако данный метод имеет ряд ограничений, в частности получение неопределенных результатов, включающих фолликулярную неоплазию и подозрительные на рак результаты. Неопределенные результаты ТАБ связаны с отсутствием точных цитологических критериев для дифференциальной диагностики ряда добро- и злокачественных заболеваний ЩЖ. Доля таких аспириатов весьма высока и может достигать 30% [10, 13]. Таким образом, невозможность на дооперационном этапе имеющимися методами исключить опухолевую природу узла ЩЖ является показанием к выполнению диагностической операции. При хирургическом вмешательстве лишь в 15–20% неопределенных результатов цитологического исследования выявляется злокачественный процесс [6, 8]. На сегодняшний день окончательный диагноз может быть установлен только в результате гистологического исследования.

Таким образом, поиск новых методов дооперационной диагностики высокодифференцированного РЩЖ является актуальной проблемой современной тиреологии, что позволило бы улучшить диагностику РЩЖ и сократить количество диагностических операций [11, 15, 17].

В настоящее время исследование событий молекулярного уровня занимает ведущее место в определении патогенеза различных форм РЩЖ и соответственно может быть применено в диагностических целях. В работах ряда зарубежных исследователей [7, 12, 16] описывается мутация V600E в 15-м экзоне гена BRAF (BRAV600E), как наиболее часто встречающаяся при папиллярном РЩЖ. Наличие данной мутации ведет к дестабилизации в RAF-киназном ге-

не, что в конечном итоге приводит к активации MAP-киназного пути и повышению митотической и пролиферативной активности клетки. При исследовании гистологического материала больных, прооперированных по поводу РЩЖ, наличие BRAFV600E мутации определялось с частотой 38–69% [5, 7, 9, 10, 13, 21].

Один из активно изучаемых онкомаркеров – галектин-3, белок из семейства лектинов, который является маркером развития неопластических процессов. В ряде работ [4, 3, 18] было показано, что галектин-3 может играть роль маркера злокачественного роста опухолей ЩЖ. В частности, большое количество исследований посвящено изучению возможности использования галектина-3 в качестве онкомаркера папиллярного РЩЖ. В отношении возможности использования экспрессии данного белка в диагностике фолликулярного РЩЖ приводятся разноречивые данные. Так, ряд авторов [2] указывают на невозможность использования экспрессии галектина-3 в диагностике фолликулярного РЩЖ. Другие исследователи [18, 19] приводят данные об использовании экспрессии галектина-3 в дифференциальной диагностике фолликулярного рака и фолликулярной аденомы ЩЖ на дооперационном этапе.

Наиболее актуальным в настоящее время представляется применение различных методик и онкомаркеров, ответственных за разные пути онкогенеза [20]. В связи с этим основной целью нашей работы являлось изучение возможности совместного использования определения экспрессии галектина-3 методом проточной флуориметрии и наличия мутации гена BRAF методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в пунктате из узла ЩЖ, полученном при ТАБ в дооперационной диагностике высокодифференцированного рака.

Материал и методы

В ходе выполнения данного проекта нами был обследован 41 пациент с узловыми образованиями ЩЖ, поступившие в клинику общей хирургии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова в 2008–2009 гг. Все

пациенты были обследованы по стандартному алгоритму: клинические и лабораторно-инструментальные методы, такие как определение уровня ТТГ, УЗИ и ТАБ под ультразвуковым контролем. Соотношение заболевших мужчин и женщин было 1 : 6. Средний возраст составил $46,9 \pm 12$ лет. Всем пациентам была выполнена пункционная биопсия под ультразвуковым контролем. На основании данных цитологического исследования пунктата из образований ЩЖ пациенты были разделены 3 группы: в 1-ю группу включены 20 пациентов, при цитологическом исследовании аспирата которых выявлены признаки папиллярного рака; во 2-ю группу – 17 больных, у которых невозможно было подтвердить или исключить наличие РЩЖ по заключению ТАБ; в 3-ю – 4 человека с доброкачественными результатами цитологического исследования, включающими коллоидные узлы ЩЖ. Сравнительная характеристика исследуемых групп представлена в табл. 1.

Все пациенты были оперированы. Показаниями к операции в 1-й группе были признаки злокачественного роста, во 2-й – невозможность исключить наличие рака ЩЖ по данным ТАБ, в 3-й – выявление токсической аденомы ЩЖ или наличие узла большого размера, вызывающего компрессионный синдром. Окончательный диагноз у оперированных пациентов ставился на основании планового гистологического заключения. Помимо цитологического исследования всем пациентам было выполнено определение экспрессии белка галектина-3 методом проточной флуориметрии (ПФЦ). В качестве материала для исследования были использованы аспирационные биоптаты узловых образований ЩЖ. Образцы, полученных методом ТАБ узловых образований ЩЖ, помещали в раствор антикоагулянта и исследовали в течение 24 ч. В качестве антикоагулянта использовали гепарин 50 ЕД на 1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

Часть образцов замораживали при температуре $-15 - -18^\circ \text{C}$ более 24 ч, перед замораживанием аспираты помещали в фосфатно-буферный раствор (ФБР), содержащий антикоагулянт (АДЦ) и раствор ДМАЦ для фиксации и пермеабиллизации клеток. При необходимости образцы освобождали от эритроцитов стандартным методом лизиса (IO Test Lysing Solution, Beckman Coulter) и фильтровали для получения однородной клеточной суспензии. Для окрашивания образцов использовали:

1) непрямой метод иммунофлуоресценции с неконъюгированными мышиными моноклональными антителами (МкАТ) к галектину-3 человека (BD Biosciences), флуоресцеинконъюгированными (флуоресцеинизотиоционат) козьими антимышиными антителами (BD Biosciences) и прямыми конъюгата-

Таблица 1. Общая характеристика исследуемых групп пациентов

Характеристика	Группы		
	1-я	2-я	3-я
Заключение ТАБ	ПР	ФО	КЗ
Число пациентов	20	17	4
Соотношение мужчины : женщины	1 : 8,7	1 : 6,8	1 : 2
Средний возраст пациентов	44,3	47,9	54,3

Примечание. Здесь и далее: ПР – папиллярный рак, ФО – фолликулярная опухоль, КЗ – коллоидный зоб.

ми МкАТ к антигену CD45 (Beckman Coulter). После размораживания, окраски первичными и вторичными АТ клетки трехкратно промывали в ФБР. Титр неконъюгированных МкАТ 1 : 25, конъюгированных – 1 : 100;

2) прямые конъюгаты МкАТ к галектину-3 человека (Set, BD Bioscience).

В качестве отрицательного контроля для непрямого метода использовали образцы, неокрашенные первичными МкАТ. Для прямого метода применяли изотипический контроль (Set, BD Bioscience). Анализ готовых проб проводили на проточном цитометре EPICS XL (MCL, Beckman Coulter) с использованием программы System II.

Каждое клеточное событие оценивали по 4 параметрам: прямое светорассеяние – FSS (forward side scatter), боковое светорассеяние – SS (90° light/side scatter) и два детектора флуоресцентного сигнала. Первый, FL-1 – это детектор, выявляющий красители зеленого спектра (в данном случае флуоресцеинизотиоционат, обозначаемый как FITC), FL-2 – детектор, определяющий красители красного спектра (в нашем исследовании – фикоэритрин, обозначаемый как PE).

Нами также выполнялось молекулярно-генетическое исследование на наличие в материале пункционной биопсии мутации V600E гена BRAF.

Преаналитический этап

Пункционная тонкоигольная биопсия проводилась под ультразвуковым контролем. Материал помещался в пробирки со стабилизирующей средой EverFresh RNA фирмы “Силекс” (Москва, Россия). Полученные образцы хранились при температуре 4°C до исследования (не более 2 дней).

Выделение ДНК

ДНК выделяли из ткани ЩЖ, используя набор “ДНК–ГС” (“ДНК-Технология”, Россия) согласно прилагаемой инструкции. В результате получали 100 мкл водного раствора содержащего от 3 до 10 мкг

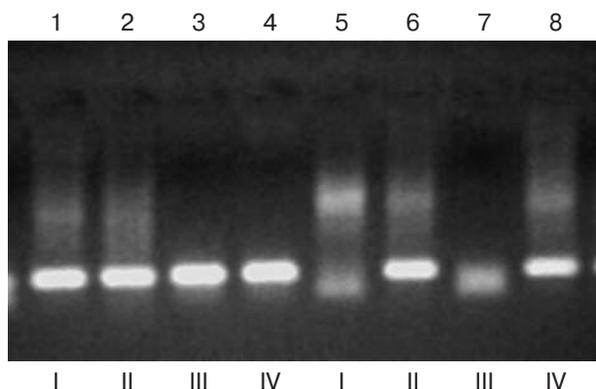


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации. Дорожки 1, 2, 3, 4 – “дикий” и мутантный тип гена BRAF. У всех 4 пациентов (I–IV) присутствует “дикий” тип гена BRAF (внутренний контроль). Дорожки 5, 6, 7, 8 – мутантный тип гена BRAF. Пациенты II и IV – положительные по мутации в гене BRAF, I и III – отрицательные по мутации в гене BRAF.

ДНК. После выделения образцы ДНК хранились при температуре -20°C до исследования.

Проведение ПЦР-анализа

Амплификация проводилась на приборе “Терцик” (“ДНК-технология”, Россия) по стандартной двухпраймерной схеме в конечном объеме 10 мкл. Реакционная смесь содержала: 2 мкл ДНК, 14 рМол каждого праймера, смесь дНТФ в конечной концентрации 240 мкМол и 2,5 единицы термостабильной Taq ДНК-полимеразы (Helicon, Россия) в стандартном ПЦР-буфере с содержанием Mg^{2+} 15 мМол. Последовательности используемых праймеров: обратный праймер (общий для дикого и мутантного аллелей гена BRAF) RP-BRAF 5'-GGCCAAAATT-TAATCAGTGGA-3' и 2-а прямых праймера: FW-BRAF 5'-TAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGT-3' – для “дикого” типа и M-BRAF 5'-GGTGATTTTG-GTCTAGCTACAAA-3' – для мутантного типа гена [17].

Программа амплификации состояла из начальной денатурации (96°C , 3 мин), 40 циклов, включавших денатурацию (94°C , 20 с), отжиг праймеров (61°C , 30 с), элонгацию (72°C , 40 с), и заключительной элонгации (72°C , 8 мин).

ПЦР-продукт без предварительной обработки наносился на 2% агарозный гель. Электрофорез проводился в стандартном трис-ЭДТА-боратном буфере при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 20 мин. Визуализация проводилась с помощью водного раствора бромистого этидия. Фотографирование электрофореграммы проводилось в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе (254 нм).

Оценка результатов исследования

Качественная оценка аналитических характеристик проводилась путем исследования данных электрофореграммы продуктов амплификации. Каждая проба оценивалась по наличию электрофоретического сигнала в двух дорожках: дорожка 1 (амплификация с праймерами для “дикого” и мутантного типов гена BRAF) и дорожка 2 (амплификация с праймерами только для мутантного типа гена BRAF). Наличие электрофоретического сигнала в дорожке 1 являлось контролем метода, в дорожке 2 свидетельствовало о наличии данной мутации в исследуемом образце (рис. 1).

Результаты выявления экспрессии галектина-3 и определения мутации гена BRAF в материале аспирационных биоптатов и сопоставление с диагнозами, сделанными по морфологическим критериям на послеоперационном материале, были оценены по следующим критериям [14]:

- предсказательная ценность положительного теста,
- чувствительность теста,
- предсказательная ценность отрицательного теста,
- специфичность теста,
- диагностическая точность метода.

При статистической обработке данных использовали χ^2 -критерий Пирсона для сравнения качественных показателей. Для описания выборок рассчитывали среднее и его стандартное отклонение. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Всем оперированным больным было выполнено гистологическое исследование операционного материала, по результатам которого проведен сравнительный анализ данных цитологического и гистологического исследований.

Результаты цитологического исследования аспирата из узла ЩЖ, полученного при ТАБ, и гистологического исследования удаленного образования ЩЖ представлены в табл. 2.

В 1-й группе больных, у которых по данным заключения цитологического исследования аспирата узла ЩЖ выявлены признаки папиллярного РЩЖ, диагноз “высокодифференцированный рак ЩЖ” подтвердился в 100% наблюдений (у 19 пациентов поставлен диагноз “папиллярный РЩЖ, а у одного диагностирован фолликулярный РЩЖ”).

Среди 17 пациентов 2-й группы с дооперационным диагнозом по данным ТАБ “фолликулярная опухоль” у 16 больных при гистологическом исследовании диагностированы доброкачественные образования ЩЖ: фолликулярная аденома – у 13 пациентов, коллоидный зоб – у 3 больных. Лишь у одного пациента выявлен фолликулярный РЩЖ.

Таблица 2. Результаты морфологических исследований у больных в изучаемых группах

Метод исследования	Группы					
	1-я		2-я		3-я	
ТАБ: заключение число пациентов, n	ПР 20		ФО 17		КЗ 4	
Гистологическое исследование: заключение число пациентов, n	ПР 19	ФР 1	ФА 13	КЗ 13	ФР 1	КЗ 4

Примечание. Здесь и далее ФА – фолликулярная аденома, ФР – фолликулярный рак.

Таблица 3. Оценка результатов цитологического исследования аспирата из узловых образований ЩЖ

Результат гистологического исследования	Результат цитологического исследования аспирата из узловых образований ЩЖ, полученного при ТАБ		
	ПР/фолликулярный РЩЖ	ФО	КЗ
Высокодифференцированный РЩЖ	Истинно положительный	Истинно положительный	Ложноотрицательный
Доброкачественные образования ЩЖ	Ложноположительный	Ложноположительный	Истинно отрицательный

Таблица 4. Диагностическая значимость цитологического метода исследования

Показатель диагностической значимости	%	ДИ
Чувствительность	100	88–100
Специфичность	20	8,3–20
Диагностическая точность	60	
Предсказательная ценность положительного теста	56,8	
Предсказательная ценность отрицательного теста	99,8	41,4–100

Примечание. $p > 0,05$; $k = 0,2$.

В 3-й группе больных, где по данным цитологического исследования аспирата из узла ЩЖ был диагностирован узловой коллоидный зоб, при гистологическом исследовании диагноз подтвердился в 100% случаев.

Для оценки показателей диагностической значимости результаты цитологического исследования аспирата из узловых образований ЩЖ были интерпретированы как представлено в табл. 3.

Чувствительность ТАБ составила 100%, специфичность – 20%, точность – 60%, предсказательная ценность положительного теста – 56,8%, а предсказательная ценность отрицательного теста – 99,8%. Результаты представлены в табл. 4.

Для проведения сравнительного анализа в алгоритм дооперационной диагностики узловых образований ЩЖ, кроме цитологического исследования аспирата, полученного при ТАБ, был включен ПФЦ-метод исследования экспрессии галектина-3 и ПЦР-метод определения наличия мутации гена BRAF. Результаты представлены в табл. 5.

Среди 20 пациентов 1-й группы с предоперационным диагнозом по данным ТАБ “папиллярный рак” экспрессия галектина-3 наблюдалась у 18 человек, у которых по данным гистологического исследования подтвержден диагноз “высокодифференцированный РЩЖ” (у 17 пациентов диагностирован папиллярный РЩЖ, у одного больного поставлен диагноз “фолликулярный РЩЖ”). У 2 человек, когда экспрессия галектина-3 не определялась, по данным гистологического исследования образования ЩЖ был выявлен папиллярный РЩЖ. BRAF-мутация была выявлена у 15 пациентов с папиллярным РЩЖ и не определялась у 4 больных папиллярным раком и у одного больного с фолликулярным раком.

Во 2-й группе пациентов, у которых по данным ТАБ был поставлен диагноз “фолликулярная опухоль ЩЖ”, экспрессия галектина-3 и BRAF-мутация обнаружены у 2 больных из 17. Этим пациентам в послеоперационном периоде по данным гистологического исследования были поставлены следующие диагнозы: у одного пациента выявлен фолликулярный рак ЩЖ, у другого – “фолликулярная аденома ЩЖ”. Среди остальных 15 больных, у которых экспрессия галектина-3 и BRAF-мутация не выявлялась, по данным гистологического исследования выявлены доброкачественные образования ЩЖ.

В 3-й подгруппе среди 4 пациентов с доброкачественными образованиями ЩЖ по данным ТАБ экспрессия галектина-3 и BRAF-мутация не были выявлены ни у одного из больных (100%).

Для оценки показателей диагностической значимости результаты ПФЦ-исследования экспрессии галектина-3 и определения BRAF-мутации методом ПЦР в аспирате, полученном при ТАБ из узловых

Таблица 5. Сравнение данных ТАБ, гистологического исследования и результатов определения экспрессии галектина-3 и наличия BRAF-мутации в пунктате из узла ЩЖ

ТАБ	Гистологическое исследование	Экспрессия галектина-3 (ИЦХ)	Число, абс.	BRAF-мутация	Число, абс.
Папиллярный рак (20)	ФР(1)	Положительная	1	Отрицательная	1
	ПР (19)	Положительная	17	Положительная	15
Фолликулярная опухоль	ФА	Отрицательная	2	Отрицательная	4
		Положительная	1	Положительная	1
	КЗ (3) ФР (1)	Отрицательная	12	Отрицательная	12
		Положительная	3	Отрицательная	3
Коллоидный зоб (6)	КЗ (4)	Положительная	1	Положительная	1
		Отрицательная	4	Отрицательная	4

Таблица 6. Диагностическая значимость комбинированного анализа определения экспрессии галектина-3 и наличия BRAF-мутации в аспирате, полученном при ТАБ из узловых образований ЩЖ

Показатель диагностической значимости	%	ДИ
Чувствительность	95	81–99
Специфичность	95	80–99,6
Диагностическая точность	95	
Предсказательная ценность положительного теста	95	81–99,6
Предсказательная ценность отрицательного теста	95	80–99

Примечание. $p < 0,05$; $k = 0,9$.

образований ЩЖ, были интерпретированы следующим образом: положительная экспрессия галектина-3 и/или наличие BRAF-мутации в аспирате из узла ЩЖ, полученном при ТАБ, с диагностированным по данным окончательного гистологического исследования высококодифференцированным РЩЖ считались нами как истинно положительный результат. При отсутствии маркеров в этих образцах результат считался ложноотрицательным.

Положительная экспрессия галектина-3 и/или BRAF-мутация в аспирате из узла ЩЖ, полученном при ТАБ, с диагностированными по данным окончательного гистологического исследования доброкачественными образованиями ЩЖ считалась ложноположительным результатом, а отсутствие этих маркеров – истинно отрицательным результатом.

Таким образом, среди 21 пациента с установленным по данным гистологического исследования диагнозом “высокодифференцированный (папиллярный или фолликулярный) РЩЖ” экспрессия галектина-3 и/или BRAF-мутация выявлена у 20 больных, и лишь у одного пациента отсутствовала. Среди 20 больных с доброкачественными образованиями ЩЖ по данным гистологического исследования экспрессия галектина-3 и/или BRAF-мутация отсутствовала

у 19 пациентов, а была выявлена у одного пациента с фолликулярной аденомой ЩЖ.

Диагностическая значимость комбинированного анализа ПФЦ-метода определения экспрессии галектина-3 и BRAF-мутации ПЦР-методом в аспирате, полученном при ТАБ из узловых образований ЩЖ, представлена в табл. 6.

Таким образом, чувствительность комбинированного анализа определения экспрессии галектина-3 и наличия BRAF-мутации в аспирате из узла ЩЖ составила 95%, специфичность – 95%, точность – 95%, предсказательная ценность положительного теста – 95%, а предсказательная ценность отрицательного теста – 95%.

Полученные данные показывают, что сравниваемые методы цитологического исследования и комбинированный анализ выявления экспрессии галектина-3 и BRAF-мутации обладают одинаковой высокой чувствительностью приближающейся к 100% (ДИ чувствительности исследуемых методов перекрываются). Однако цитологическое исследование не позволяет дифференцировать фолликулярную аденому и фолликулярный рак, а нередко в эту группу попадают пациенты с фолликулярным вариантом папиллярного рака, что сводит специфичность данного метода практически к нулю. Мы выполнили попытку с помощью определения экспрессии галектина-3 методом проточной флуориметрии и выявления BRAF-мутации методом ПЦР улучшить диагностику высококодифференцированного рака на дооперационном этапе. Специфичность данного метода составила 95%, диагностическая точность также 95%. Сравнительная характеристика диагностической значимости ТАБ с цитологическим исследованием и комбинированного анализа наличия BRAF-мутации и определения экспрессии галектина-3 представлена в табл. 7.

Таким образом, чувствительность цитологического исследования и комбинированного анализа определения экспрессии галектина-3 с выявлением

Таблица 7. Сравнительная характеристика диагностической значимости ТАБ с цитологическим исследованием и комбинированного анализа наличия BRAF-мутации и определения экспрессии галектина-3

Диагностическая значимость (ДИ)	Метод	
	цитологическое исследование	комбинированный анализ BRAF-мутации и экспрессии галектин-3
Чувствительность, %	100 (88–100)	95 (81–99)
Специфичность, %	20 (8,3–20)	95 (80–99,6)
Диагностическая точность, %	60	95
Предсказательная ценность положительного теста, %	57 (50–57)	95 (81–99)
Предсказательная ценность отрицательного теста, %	99,8 (41–100)	95 (80–99)

Примечание. $p > 0,05$, $k = 0,2$; $p < 0,05$, $k = 0,9$.

BRAF-мутации достаточно высокая и достоверно не отличается для обоих методов. Однако такой важный показатель, как специфичность метода в диагностике высокодифференцированного РЩЖ оказался достоверно более высоким для сочетанного применения двух методик – ПФЦ-метода определения экспрессии галектина-3 и ПЦР-диагностики BRAF-мутации. Соответственно ТАБ с цитологическим исследованием аспирата имеет высокую чувствительность, но низкую специфичность в выявлении злокачественных опухолей, а именно фолликулярного рака. Тогда как ПФЦ-метод определения экспрессии галектина-3 и ПЦР-выявление BRAF-мутации имеют высокие показатели чувствительности и достоверно является более специфичным методом в дооперационной диагностике высокодифференцированного РЩЖ. Особенно актуальным представляется использование данного метода в группе пациентов с цитологическим диагнозом “фолликулярная опухоль”. Соответственно, используя в рутинной практике более простой, экономически выгодный и чувствительный метод цитологического исследования в качестве скрининга, при выявлении подозрительных результатов (подозрительные на рак и неопределенные результаты) возможно использование более специфичного метода комбинированного анализа ПФЦ-исследования экспрессии галектин-3 и ПЦР-выявления BRAF-мутации.

Таким образом, выбранная нами для исследования методика комбинированного анализа – ПФЦ-метод определения экспрессии галектина-3 и ПЦР-метод для выявления BRAF-мутации в пунктате из образования ЩЖ – обладает высокой диагностической точностью и может быть использована в качестве дополнительного уточняющего пособия в дооперационной диагностике высокодифференцированного РЩЖ.

Список литературы

1. Валдина Е.А. Заболевания щитовидной железы: Руководство. 3-е изд. СПб.: Питер, 2006.
2. Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M. et al. The Thyroid Cancer Study Group Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions // *Lancet*. 2001. V. 357. P. 1982.
3. Bartolazzi A., Orlandi F., Saggiorato E., Volante M. Galectin-3-expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytology: a prospective multicentre study // *Lancet Oncol*. 2008 V. 9(6). P. 508–510.
4. Bernet V.J., Anderson J., Vaishnav Y., Solomon B. Determination of galectin-3 messenger ribonucleic Acid overexpression in papillary thyroid cancer by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2002 V. 87(10). P. 4792–4796.
5. Brzezianska E., Pastuszak-Lewandoska D., Wojciechowska K. et al. Investigation of V600E BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in the Polish population // *Neuro. Endocrinol. Lett*. 2007. V. 28(4). P. 351–359.
6. Cibas E.S., Ducatmann B.S. Cytology. Diagnos principles and clinical correlates. WB Saunders company. A division of Harcourt Brace Company. Philadelphia – London – Toronto – Montreal – Sydney – Tokyo, 1996. P. 217–242.
7. Dujardin F., Pages J.C., Collin C. et al. BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma: prevalence and detection in fine needle aspiration specimens // *Ann. Pathol*. 2010. V. 30(4). P. 252–262.
8. Gharib H. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: advantages, limitations, and affect // *Meyo Clin. Proc*. 1994. V. 69. P. 44–49.
9. Kebebew E., Weng J., Bauer J. et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer // *Ann. Surg*. 2007. V. 246(3). P. 466–470.
10. Chung K.W., Yang S.K. et al. Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule cytopathology diagnosis, especially in BRAFV600E mutation-prevalent area // *Clin. Endocrinol*. 2006. V. 65(5). P. 660–666.
11. Kim S.K., Hwang T.S., Yoo Y.B. et al. Surgical Results of Thyroid Nodules according to a Management Guideline Based on the BRAFV600E Mutation Status // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2011. Jan 14. Epub ahead of print.
12. Kimura E.T., Nikiforova M.N., Zhu Z. et al. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in

- papillary thyroid carcinoma // *Cancer Res.* 2003. V. 63. P. 1454–1457.
13. *Leslie R.R., Brandon G.B., Joel S.B.* Utility of BRAF V600E mutation detection in cytologically indeterminate thyroid nodules // *Cyto J.* 2006. V. 3. P. 10–15.
 14. *Linn S.* A new conceptual approach to teaching the interpretation of clinical tests // *J. Statist. Educat.* 2004. V. 12. N3.
 15. *Mekel M., Nucera C., Hodin R.A., Parangi S.* Surgical implications of B-RafV600E mutation in fine-needle aspiration of thyroid nodules // *Am. J. Surg.* 2010. V. 200(1). P. 136–143.
 16. *Namba H., Nakashima M., Hayashi T.* et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers // *J. Clin. Endocrinol. Met.* 2003. V. 88. P. 4393–4397.
 17. *Pelizzo M.R., Boschin I.M., Barollo S.* et al. BRAF analysis by fine needle aspiration biopsy of thyroid nodules improves preoperative identification of papillary thyroid carcinoma and represents a prognostic factor. A mono-institutional experience // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2010 Dec 23. Epub ahead of print.
 18. *Saggiorato E., De Pompa R., Volante M.* Characterization of thyroid 'follicular neoplasms' in fine-needle aspiration cytological specimens using a panel of immunohistochemical markers: a proposal for clinical application // *Endocr. Relat. Cancer.* 2005. V. 12(2). P. 305–317.
 19. *Saggiorato E., Cappia S., de Giuli P., Mussa A.* Galectin-3 as a presurgical immunocytochemical marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma // *J. Clin. Endocr. Met.* 2001. V. 86. N 11. P. 5152–5158.
 20. *Sapio M.R., Guerra A., Posca D.* et al. Combined analysis of galectin-3 and BRAFV600E improves the accuracy of fine-needle aspiration biopsy with cytological findings suspicious for papillary thyroid carcinoma // *Endocr. Relat. Cancer.* 2007. V. 14(4). P. 1089–1097.
 21. *Trovisco V., Soares .P., Preto A.* et al. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness // *Virchows Arch.* 2005. V. 446(6). P. 589–595.
 22. *Xu X., Quiros R.M., Gattuso P.* et al. High Prevalence of BRAF Gene Mutation in Papillary Thyroid Carcinomas and Thyroid Tumor Cell Lines // *Cancer. Res.* 2003. V. 63. P. 4561–4566.