

ЗНАЧЕНИЕ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИИ ГЕНА BRAF В ДООПЕРАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д.Ю. Семенов¹, М.И. Зарайский², М.Е. Борискова¹, И.Ю. Сабурова²,
П.А. Панкова¹, Н.С. Фещенко¹, В.Г. Чаусова¹, У.В. Фарафонова¹, О.П. Пестерова²

¹ Кафедра общей хирургии ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова»
(зав. кафедрой — д. м. н., проф. Д.Ю. Семенов)

² Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины
ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» (зав. кафедрой — д. м. н. проф. В.Л. Эмануэль)

Цель. Выявление значимости наличия мутации V600E гена BRAF в дооперационной диагностике рака щитовидной железы.
Материал и методы. В исследование включены 46 пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы, которым была проведена тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ). ДНК выделялась сорбентным методом из материала ТАБ. Выявление мутации гена BRAF проводилось с помощью ПЦР с праймерами, характерными для дикого и мутантного типа гена.

Результаты. По результатам цитологического исследования все пациенты были разделены на 3 группы: 1-я — больные с узловым коллоидным зобом (УКЗ) (9), 2-я — больные папиллярным раком (ПР) (19) и 3-я — пациенты с неопределенными результатами ТАБ (18). В группе пациентов с ПР все диагнозы были подтверждены гистологически, и мутация гена BRAF была выявлена у 15 (79%) пациентов. В группе с неопределенным цитологическим диагнозом только у одного пациента определена мутация гена BRAF и при гистологическом исследовании был диагностирован фолликулярный рак. У 16 пациентов с гистологическим диагнозом «фолликулярная аденома», у 9 пациентов с УКЗ и у 1 пациента с фолликулярным раком мутации BRAFV600E выявлено не было. Таким образом, мы получили следующие критерии достоверности метода: чувствительность — 76%, специфичность — 100% и диагностическая точность — 89%.

Выводы. Выявление мутации BRAFV600E может быть использовано в качестве дополнительного метода дооперационной диагностики РЩЖ.

Ключевые слова: щитовидная железа, узловой зоб, рак щитовидной железы, фолликулярная неоплазия

Detection of BRAF Gene Mutation in Preoperative Diagnostic of Thyroid Gland Cancer

D.Yu. Semyonov¹, M.I. Zarayskiy², M.E. Boriskova¹, I.Yu. Saburova²,
P.A. Pankova¹, N.S. Feshenko¹, V.G. Chausova¹, U.V. Farafonova¹, O.P. Pesterova²

¹ General surgery department, Pavlov State Medical University of St. Petersburg.

² Laboratory diagnostic department with course of molecular medicine,
Pavlov State Medical University of St. Petersburg

Purpose: To assess the utility of BRAFV600E mutation detection in preoperative thyroid cancer diagnostic.

Material and methods: We studied 46 aspirates taken by FNA from patients with thyroid gland nodes. Thyroid tissue aspirates DNA was extracted by sorbent method. BRAF gene mutation was analyzed with primers specific for wild and mutant gen type by RT-PCR.

Results: All patients were divided into three groups by cytological conclusions: colloid nodules (9), PTC (19), and suspicious for malignancy (18). In the group of patients with PTC all diagnoses were confirmed by histology, and BRAF gene mutation was detected in 15 (79%) FNAB specimens. In the group with suspicious cytological diagnosis only one patient had follicular cancer by histology and positive BRAF mutation. There were detected no BRAF

Адрес для корреспонденции: Фарафонова Ульяна Валентиновна — врач-интерн, кафедра общей хирургии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова — 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8. ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова». E-mail: medici@yandex.ru

mutation in 16 patients with histologically proven follicular adenoma, in 9 patients with colloid nodular goiter and in one patient with follicular cancer. Thereby, we received the following criteria values of method's reliability: sensitivity – 76%, specificity – 100%, diagnostic accuracy – 89%.

Conclusions: Detection of the BRAFV600E mutation may be a useful adjunct marker for preoperative diagnostic of thyroid gland cancer.

Key words: thyroid, nodular goiter, thyroid cancer, follicular lesion

В последнее время отмечается рост числа больных с узловыми образованиями щитовидной железы (УОЩЖ) [1, 4], которые обнаруживают у 5–70% населения [1, 2, 6, 19]. Актуальность проблемы дифференциальной диагностики УОЩЖ заключается в том, что, по некоторым данным, от 10 до 22% солитарных узлов ЩЖ являются злокачественными, а почти в 90% случаев РЩЖ на ранних стадиях развивается под маской узлового зоба [3].

Традиционно для дифференциальной диагностики УОЩЖ используется тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) под контролем УЗИ с последующим цитологическим исследованием биоптата. Однако цитологический метод имеет ряд ограничений, а именно получение при ТАБ неинформативных и неопределенных результатов. Неопределенные результаты ТАБ связаны с отсутствием точных цитологических критериев для дифференциальной диагностики ряда доброкачественных и злокачественных заболеваний ЩЖ. Доля таких аспиратов весьма высока и составляет в среднем около 30% [13, 15]. 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 [7, 10]. На сегодняшний день окончательный диагноз может быть установлен только в результате гистологического исследования.

Таким образом, поиск новых методов дооперационной дифференциальной диагностики УОЩЖ является одной из актуальных проблем современной тиреологии, что позволило бы улучшить диагностику РЩЖ и уменьшить количество диагностических операций.

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 ряде работ зарубежных исследователей

[12, 18] описывается мутация V600E в 15-й экзоне гена BRAF (BRAFV600E), как наиболее часто встречающаяся при ПРЩЖ. Наличие данной мутации ведет к дестабилизации в RAF-киназном гене, что в конечном итоге способствует 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, 11, 13, 15, 20].

Цель работы: выявление значимости наличия мутации V600E в гене BRAF в дооперационной диагностике РЩЖ.

Материал и методы

Характеристика групп пациентов

В исследование были включены 46 пациентов, обследованных на базе кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины и оперированных на кафедре общей хирургии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова в период с 2007 по 2008 гг. Средний возраст пациентов составил $48,0 \pm 8,5$ года; соотношение мужчин и женщин – 1 : 10 соответственно.

Всем пациентам было выполнено стандартное клиническое обследование: определение уровня ТТГ, св.Т4, УЗИ ЩЖ, ТАБ узлов ЩЖ под УЗ-контролем, по показаниям – радионуклидное сканирование ЩЖ с ^{123}I .

До операции всем больным проведена ТАБ под УЗ-контролем с последующим цитологическим исследованием аспирата в цитологической лаборатории ЦЛД СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Пункционная тонкоигольная биопсия выполнена также под УЗ-контролем (табл. 1) [2].

На основании цитологического диагноза пациенты были разделены на 3 группы: 1-я – с коллоидным зобом, 2-я – с папиллярным раком и 3-я – лица, у которых цитологическое заключение звучало как “фолликулярная опухоль”, т. е. на основании

Таблица 1. Распределение пациентов по группам в зависимости от цитологического диагноза

Результат ТАБ	Доброкачественный (УКЗ)	Злокачественный (ПР)	Неопределенный (ФО)
Число пациентов, n	9	19	18

Примечание: УКЗ – узловой коллоидный зоб, ПР – папиллярный рак, ФО – фолликулярная опухоль.

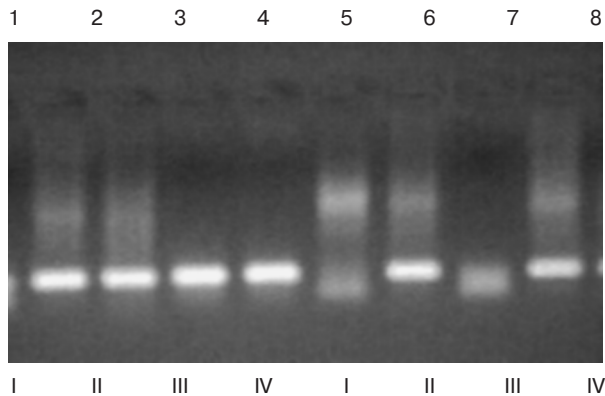


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации. Дорожки 1, 2, 3, 4 – “дикий” и мутантный тип гена BRAF. У всех 4 пациентов (I–IV) присутствует “дикий” тип гена BRAF (внутренний контроль); дорожки 5, 6, 7, 8 – мутантный тип гена BRAF. Пациенты II и IV – положительные по мутации в гене BRAF, пациенты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

цитологического заключения нельзя было исключить злокачественную природу узла. Группы пациентов сравнимы по полу, возрасту. Все больные были прооперированы. Показания к операции: папиллярный рак и фолликулярная опухоль по данным ТАБ. Следует отметить, что у 1 пациента с цитологическим диагнозом “фолликулярная опухоль” клинически имела место токсическая аденома. У 9 пациентов с диагнозом “УКЗ” по данным цитологического исследования показанием к операции был узловой зоб больших размеров со смещением органов шеи.

Забор материала проводился на дооперационном этапе при выполнении ТАБ УОЩЖ под УЗ-контролем. Далее выполнялось молекулярно-генетическое исследование на наличие в материале пункционной биопсии мутации V600E гена BRAF. Окончательная верификация диагноза выполнялась по данным гистологического исследования.

Преаналитический этап

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

Выделение ДНК

ДНК выделяли из ткани ЩЖ, используя набор “ДНК-ГС” (фирма “ДНК-Технология”, Россия) согласно прилагаемой инструкции. В результате получали 100 мкл водного раствора, содержащего от 3 до 10 мкг ДНК. После выделения образцы ДНК до исследования хранились при температуре –20 °С.

Проведение ПЦР-анализа

Амплификация проводилась на приборе “Терцик” (фирма “ДНК-Технология”, Россия) по стандартной двухпраймерной схеме в конечном объеме 10 мкл. Реакционная смесь содержала: 2 мкл ДНК, 14 пМол 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'-GGC-CAAAATTTAATCAGTGGA-3' и 2-а прямых праймера: FW-BRAF 5'-TAGGTGATTTTGGTCTAGC-TACAGT-3' для дикого типа и FM-BRAF 5'-GGT-GATTTTGGTCTAGCTACAAA-3' для мутантного типа гена [22]. Программа амплификации состояла из начальной денатурации (96 °С, 3 мин) и 40 циклов, включавших денатурацию (94 °С, 20 с), отжиг праймеров (61 °С, 30 с), элонгацию (72 °С, 40 с) и заключительную элонгацию (72 °С, 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 выполнялась с помощью водного раствора бромистого этидия. Фотографирование электрофореграммы осуществлялось в УФ-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 на 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 на дорожке 1 являлось контролем метода. Наличие сигнала на дорожке 2 свидетельствовало о наличии данной мутации в исследуемом образце (рис. 1).

Результаты выявления мутации V600E гена BRAF в материале аспирационных биоптатов и сопоставление с диагнозами, сделанными по данным морфологического исследования на послеоперационном материале, были оценены по следующим критериям:

- предсказательная ценность положительного теста;
- чувствительность теста;
- предсказательная ценность отрицательного теста;
- специфичность теста;

Таблица 2. Сравнение результатов цитологического и планового гистологического исследований

Цитологическое заключение	Количество	Окончательный гистологический диагноз	Количество
Узловой коллоидный зоб	9	Узловой коллоидный зоб	9
Папиллярный рак	19	Папиллярный рак	19
Фолликулярная опухоль	18	Фолликулярная аденома	16
		Фолликулярный рак	2
Всего	46	Узловой коллоидный зоб	9
		Фолликулярная аденома	16
		Папиллярный рак	19
		Фолликулярный рак	2

Таблица 3. Выявление мутации гена BRAFV600E

Цитологическое заключение	Количество	Окончательный гистологический диагноз	Количество	BRAF-мутация	
				есть	нет
Узловой коллоидный зоб	9	Узловой коллоидный зоб	9	0	9
Папиллярный рак	19	Папиллярный рак	19	15	4
Фолликулярная опухоль	18	Фолликулярная аденома	16	0	16
		Фолликулярный рак	2	1	1
Всего	46		46	16	30

Таблица 4. Критерии достоверности метода выявления мутации V600E гена BRAF у пациентов с подозрением на РЩЖ

Параметры	BRAF-мутация, %	Доверительный интервал, %
Предсказательная ценность положительного теста	99,6	87,1–100,0
Чувствительность теста	76,2	61,3–76,7
Предсказательная ценность отрицательного теста	83,3	72,9–83,7
Специфичность теста	99,4	80,0–100,0
Диагностическая точность метода	89	

Примечание: для $p < 0,05$.

– диагностическая точность метода [16].

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

Результаты и их обсуждение

Всем прооперированным больным было выполнено гистологическое исследование операционного материала, по результатам которого проведен сравнительный анализ данных цитологического и гистологического исследований (табл. 2).

Результаты генетического исследования и их обсуждение

В группе пациентов с дооперационным цитологическим диагнозом “коллоидный зоб” мутантного типа гена BRAF не было выявлено ни в одном случае, что полностью совпало с данными планового гистологического послеоперационного исследования, при котором были поставлен диагноз “узловой коллоидный зоб” (табл. 3). В группе пациентов по

результатам цитологического исследования с бесспорным диагнозом “папиллярный рак” во всех случаях данный диагноз был подтвержден гистологическим исследованием, однако мутантный тип гена BRAF определялся в 15 (79%) образцах, а в 4 случаях мутантный тип гена BRAF не определялся.

Большой интерес представляет 3-я группа, в которую вошли пациенты с цитологическим диагнозом “фолликулярная опухоль”. По данным гистологической оценки препаратов у 16 пациентов был поставлен окончательный диагноз фолликулярная аденома, и у двух – фолликулярный рак. Мутантный тип гена BRAF не определялся ни в одном из образцов, взятых у пациентов с фолликулярной аденомой. Однако в образцах, взятых у пациентов с фолликулярным раком, мутантный тип гена BRAF был обнаружен у одного больного. Критерии достоверности были вычислены по общепринятой методике [16] (табл. 4). Таким образом, чувствительность данного метода исследования составила 76%, специфичность – 100% и диагностическая ценность – 89% соответственно.

По данным нашего исследования наличие в образцах мутантного типа гена BRAF с вероятностью 100% свидетельствует о злокачественности процесса, а отсутствие данной мутации характерно для доброкачественных заболеваний.

Выводы

1. Наличие мутации V600E гена BRAF является диагностическим маркером высококодифференцированного рака щитовидной железы.

2. Выявление мутации гена BRAFV600E может быть использовано в качестве дополнительного метода дооперационной диагностики высококодифференцированного рака щитовидной железы.

Список литературы

1. *Валдина Е.А.* Заболевания щитовидной железы: Руководство. 3-е изд. СПб.: Питер, 2006.
2. *Гринева Е.Н.* Узловые образования щитовидной железы. Диагностика и врачебная тактика // Пробл. эндокринолог. 2003. Т. 49. №6. С. 59–62.
3. *Пачес А.И., Пронн Р.М.* Рак щитовидной железы. М., 1995.
4. *Томашевский И.О.* Рентгенофлюоресцентный метод в дифференциальной диагностике заболеваний щитовидной железы // Пробл. эндокринолог. 1997. Т. 43. № 3. С. 38–42.
5. *Brzezianska E., Pastuszek-Lewandoska D., Wojciechowska K. et al.* Investigation of V600E BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in the Polish population // Neuroendocrinol. Let. 2007. V. 28(4). P. 351–359.
6. *Burch H.B.* Evaluation and management of the solid thyroid nodule // Endocrinol. Metab. Clin. N. Am. 1995. V. 24. N 4. P. 663–698.
7. *Cibas E.S., Ducatman B.S.* Cytology / Diagnos principles and clinical correlates. A division of Harcourt Brace Company. Philadelphia – London – Toronto – Montreal – Sydney – Tokyo: WB Saunders company, 1996. P. 217–242.
8. *Viola D., Romei Cr., Biagini A. et al.* Prognostic significance of BRAF mutation in patients affected by papillary thyroid carcinoma with a follow up of 20 years // J. Clin. Endocrinol. 2007. V. 75(4). P. 325–324.
9. *Fugazzola L., Puxeddu E., Avenia N. et al.* Correlation between BRAFV600E mutation and clinic-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italy study and review of the literature // Endocrin. Relat. Cancer. 2006. V. 13(2). P. 455–464.
10. *Gharib H.* Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: advantages, limitations, and affect // Mayo Clin. Proc. 1994. V. 69. P. 44–49.
11. *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.
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 // Canc. Res. 2003. V. 63. P. 1454–1457.
13. *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 // . 2006. V. 65(5). P. 660–666.
14. *Lee J.H., Lee E.S., Kim Y.S.* Clinicopathologic significance of BRAF V600V mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis // Am. Canc. Soc. 2007. V. 10. P. 38–46.
15. *Rowe L.R., Bentz Br.G., Bentz J.S.* Utility of BRAF V600E mutation detection in cytologically indeterminate thyroid nodules // Cyto J. 2006. V. 3. P. 10–15.
16. *Linn S.* A new conceptual approach to teaching the interpretation of clinical tests // J. Sta. Educat. 2004. V. 12. N 3. P. 11–18.
17. *Xing M., Tufano R.P., Tufaro A.P. et al.* Detection of BRAF Mutation on Fine Needle Aspiration Biopsy Specimens: A New Diagnostic Tool for Papillary Thyroid Cancer // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004. V. 89(6). P. 2867–2872.
18. *Namba H., Nakashima M., Hayashi T. et al.* Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003. V. 88. P. 4393–4397.
19. *Tan G.H., Gharib H.* Thyroid incidentalomas: management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging // Ann. Intern. Med. 1997. V. 126. N 3 P. 226–231.
20. *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 // 2005. V. 446(6). P. 589–595.
21. *Ugolini Cl., Giannini R., Lupi Cr.* Presence of BRAF V600E in very early stages of papillary thyroid carcinoma // Thyroid. 2007. V. 17. N 5. P. 381–388.
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 research. 2003. V. 63. P. 4456–4561.