

Е. С. Малахина, Е. Ю. Буравлева, Г. И. Лифшиц, М. Л. Филипенко

Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
просп. Академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия
E-mail: evabur@mail.ru

СОМАТИЧЕСКАЯ МУТАЦИЯ BRAF ПРИ УЗЛОВЫХ ОБРАЗОВАНИЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Узловой зоб (УЗ) – наиболее частое изменение со стороны желез внутренней секреции. Один из обязательных методов обследования при узловом зобе – тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ). Однако для своевременной диагностики папиллярного рака щитовидной железы необходим дополнительный диагностический метод. Соматическую мутацию гена BRAF V600E (T1799A) определяли методом аллель-специфичной «real-time» ПЦР в аспиратах из узловых образований щитовидных желез пациентов – жителей Новосибирска (госпитальная выборка). Аспираты были получены методом ТАБ под контролем УЗИ. Обследовано 103 пациента в возрасте $55,0 \pm 3,0$ года. В группу сравнения включили 8 больных с установленным цитологическим диагнозом папиллярной карциномы. Группу контроля составили 95 человек с прочими цитологическими вариантами (фолликулярная опухоль – 20,4 %, медуллярная карцинома – 2,0 %, аутоиммунный тиреоидит – 9,7 %, коллоидный зоб – 61,2 %). По предварительным данным, частота соматической мутации в основной группе составила 37,5 %, в контрольной – 3,1 %, что соответствует аналогичным показателям для европейской популяции, описанной в литературе.

Ключевые слова: щитовидная железа, папиллярная карцинома, ген BRAF, соматическая мутация BRAF V600E (T1799A).

Узловой зоб – наиболее частое изменение со стороны желез внутренней секреции. Его распространенность среди взрослых в регионах йодного дефицита достигает 30 % случаев. Узловые образования классифицируют по морфологическим критериям на доброкачественные узлы (95 %) – это коллоидный зоб, фолликулярная аденома, и злокачественные узлы – папиллярный, фолликулярный, анапластический рак. Ведущий морфологический вариант рака щитовидной железы (ЩЖ) – папиллярная карцинома (55–75 %) [1].

Соматическая мутация в гене BRAF является частым повреждением при раке ЩЖ. Данная мутация – ключевой онкоген при опухолях ЩЖ и наблюдается в 18–87 % случаев рака органа. Наиболее часто мутация представлена при папиллярном раке, а также определяется у больных с низкодифференцированным, анапластическим раком [2–4]. Кроме того, мутация BRAF определена и подтверждена при меланоме, колоректальном раке, глиоме, мелкоклеточном раке легкого [5]. В 2002 г. описана со-

матическая мутация BRAF, которая с высокой частотой обнаруживалась в злокачественных меланоммах. Ген BRAF лоцирован на хромосоме 7q34 [6]. Среди трех изоформ RAF-киназы (ARAF, BRAF, CRAF) фермент BRAF имеет наибольшую активность, чувствительность к MEK [5; 7]. Белок BRAF – серин-треонин-киназа является важным звеном RAS-BRAF-МАРК-киназного пути, играя ключевую роль в клеточной пролиферации, дифференцировке и апоптозе. В большинстве случаев это миссенс-мутация BRAFV600E (T1799A, exon 15) [8–10]. Точечная мутация и трансверсия T1799A в гене BRAF приводит к замене валина на глутамат в белке BRAF. В результате чего активируется сайт регуляции фосфорилирования в белке BRAF, что оказывает существенное влияние на транскрипцию генов, которые вовлечены в процессы дифференцировки, апоптоза клетки. Экспрессия активирующей мутации BRAF детерминирует клинический фенотип папиллярной карциномы ЩЖ.

Соматическая мутация в гене BRAF на сегодняшний день расценивается как наиболее распространенный молекулярный дефект (39–69 %) при спорадической папиллярной карциноме [8–10].

Цель исследования: изучить частоту соматической мутации гена BRAF V600E (T1799A) в госпитальной выборке пациентов Новосибирска с цитологически диагностированной папиллярной карциномой щитовидной железы.

Материал и методы

В исследование были включены пациенты с узловыми формами зоба, обратившиеся в консультативный центр к врачу эндокринологу. Забор материала производился с письменного согласия больных и протоколировался по стандартам этического комитета учреждения. Исследуемая группа была представлена 103 пациентами в возрасте $55,0 \pm 3,0$ года. Подавляющее большинство пациентов имели эутиреоидное состояние либо компенсированный (субкомпенсированный) эутиреоз.

Пациентам проведена тонкоигольная аспирационная биопсия узловых образований под контролем УЗИ. Каждое узловое образование пунктировалось от 2 до 4 раз. Аспират из шприца наносили на предметное стекло и исследовали цитологически, окраска препарата осуществлялась по методике Май – Грюнвальд – Гимзе. Из пункционно-го шприца с помощью GST-раствора (0,5 мл) забирали смыв клеток. Суспензия подвергалась замораживанию при -70°C и хранилась до выполнения молекулярно-генетического исследования.

Дезоксинуклеотидтрифосфаты (dNTP) и олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Последовательности нуклеотидных праймеров: прямой – 5'-AATAGGTGATTTTGGTC-TACCTACAGA-3', обратный – 5'-GTTCA-AACTGATGTGACCCACT-3'.

ДНК выделяли из аспириатов узловых образований щитовидных желез методом выделения из лизатов в растворе D [11]. Соматическую мутацию гена BRAF V600E (T1799A) определяли методом аллель-специфичной «real-time» ПЦР, которая про-

водилась в стандартном буфере K-20: 100 mM Tris-HCl (pH 8,9), 550 mM KCl, 0,5 % Twen 20, 20 mM MgCl₂, содержащем 0,2 mM dNTP, 0,3 мкМ растворы нуклеотидных праймеров, 20–100 нг ДНК и 0,5 активной Taq-cold ДНК-полимеразы, SYBRGreen I (1 : 25 000) в объеме 20 мкл. На реакционную смесь наслаивали 20 мкл минерального масла (ICN). ПЦР проводилась с помощью амплификатора iQ5 iCycler при следующих условиях: начальная денатурация при 95°C 3 мин, далее в течение 40 циклов с денатурацией 3 с при 96°C , отжигом праймеров 2 с при 64°C и элонгацией 3 с при 72°C . Финальная элонгация – 2 мин при 72°C .

Полученные результаты интерпретировали исходя из анализа графиков накопления флюоресценции, специфичность оценивалась с помощью кривой плавления. Накопление флюоресцентного сигнала прямо пропорционально накоплению фрагментов ДНК, так как использовался интеркалирующий краситель SYBR Green – вещество, способное к значительному увеличению флюоресценции при связывании с двухцепочечной молекулой ДНК. При регистрации кривой плавления происходит денатурация двуцепочечных продуктов ПЦР и соответственно снижается уровень флюоресцентного сигнала. Температура плавления для BRAF составила 76°C .

Результаты исследования и обсуждение

По результатам цитологического диагноза в группу сравнения включили 8 больных (7,8 %) с установленным цитологическим диагнозом папиллярной карциномы. Группу контроля составили 95 человек с прочими цитологическими вариантами (фолликулярная опухоль – 20,4 %, медуллярная карцинома – 2 %, аутоиммунный тиреоидит – 9,7 %, коллоидный зоб – 61,2 %) (табл.).

По предварительным данным, частота соматической мутации гена BRAF в группе сравнения составила 37,5 %, что значительно не отличалось от результатов других исследований спорадических случаев папиллярной карциномы [8–10]. В группе контроля частота соматической мутации гена BRAF составила 3,1 % (2 случая – фолликулярная неоплазия, 1 – коллоидный зоб). По данным

Структура заболеваний у обследованных больных с патологией ЩЖ

Варианты цитологического диагноза	Количество больных	
	абс.	%
Коллоидный зоб	63	61,2
Фолликулярная опухоль	21	20,4
Аутоиммунный тиреоидит	10	9,7
Папиллярный рак	8	8,0
Медуллярный рак	2	2,0

литературы соматическая мутация BRAF T1799A не определяется при коллоидном зобе. Подобные случаи требуют, по нашему мнению, дополнительного обследования пациентов.

Таким образом, частота цитологических вариантов узлового зоба в госпитальной выборке пациентов, проживающих в Новосибирске, соответствует аналогичным показателям в йоддефицитных регионах как в России, так и в других странах. Частота соматической мутации BRAF T1799A при цитологически диагностированной папиллярной карциноме составила 37,5 %, что соответствует аналогичному показателю у больных европейских популяций.

Список литературы

1. *DeLellis R. et al.* World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of endocrine organs / R. DeLellis, R. V. Lloyd, H. Heitz. Lyon, 2004.
2. *Xing M.* BRAF mutation in thyroid cancer // *Endocr. Relat. Cancer.* 2005. Vol. 12. P. 245–262.
3. *Trovisco V. et al.* RAF mutations in the etiopathogenesis, diagnosis and prognosis of thyroid carcinomas / V. Trovisco, P. Soares, M. B. Sobrinho-Simoes // *Hum. Pathol.* 2006. Vol. 37. P. 781–786.
4. *BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment / S. Begum, E. Rosenbaum, R. Henrique et al.* // *Mod. Pathol.* 2004. Vol. 17. P. 1359–1363.
5. *Mutations of the BRAF gene in human cancer / H. Davies, G. R. Bignell, C. Cox et al.* // *Nature.* 2002. Vol. 417. P. 949–954.
6. *Chromosomal assignment of two human B-raf proto-oncogene loci: B-raf-1 encoding the p54 and B-raf-2, a processed pseudogene / A. Eychene, J. V. Barnier, F. Apiou et al.* // *Oncogene.* 1992. Vol. 7. P. 1657–1660.
7. *The ins and outs of RAF kinase / G. Daum, I. Eisenmann-Tape, H. W. Fries et al.* // *Trends. Biochem. Sci.* 1994. Vol. 19. P. 474–480.
8. *Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E in papillary thyroid cancers / H. Namba, M. Nakashima, T. Hayashi et al.* // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003. Vol. 88. P. 4393–4397.
9. *Mutational analysis of BRAF in fine needle aspiration biopsies of the thyroid: a potential application for the preoperative assessment of thyroid nodules / Y. Cohen, E. Rosenbaum, D. P. Clark et al.* // *Clin. Cancer Res.* 2004. Vol. 10. P. 2761–2765.
10. *BRAF T1796A transversion mutation in various thyroid neoplasms / M. Xing, V. Vasko, G. Tallini et al.* // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004. Vol. 89. P. 1365–1368.
11. *Маниатис Т. и др.* Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. М., 1984.

Материал поступил в редколлегию 19.03.2008

E. S. Malakhina, E. Yu. Buravleva, G. I. Lifshits, M. L. Filipenko

Somatic Mutation BRAF at Nodal Formations of Thyroid Gland

Somatic mutation of gene BRAF V600E (T1799A) defined a method allele-specific «real-time» PCR in aspirates from nodal formations of thyroid glands of patients – inhabitants of of Novosibirsk (hospital sample). Aspirates have been received by method ТАБ under the ultrasonic control. 103 patients at the age of $55,0 \pm 3,0$ years. In comparison bunch have included 8 patients with the established cytologic diagnosis of a papillary carcinoma. Control bunch 95 persons with other cytologic variants. On preliminary data, frequency of vegetative mutation in the basic bunch has compounded 37.5 %, in control – 3.1 % that corresponds to similar indicators for the European population described in the literature.

Keywords: thyroid gland, papillary carcinoma, gene BRAF, somatic mutation BRAF V600E (T1779A).