

Тестирование соматических мутаций: роль в дифференциальной диагностике новообразований щитовидной железы

© В.А. Качко^{1*}, А.Р. Зарецкий^{2,3}, В.Э. Ванушко⁴,
Н.М. Платонова^{1,4}, А.Ю. Абросимов⁴, Г.В. Семкина⁴

¹ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² ООО “Евроген Лаб”, Москва, Россия

³ ФГБУН “Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Москва, Россия

⁴ ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии” Минздрава России, Москва, Россия

Обоснование. При дооперационной диагностике новообразований щитовидной железы (ЩЖ) цитологическое исследование материала тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) является золотым стандартом и служит основанием для планирования лечебной стратегии. Однако в 10–30% случаев доброкачественный или злокачественный характер новообразования ЩЖ не может быть однозначно установлен по цитологии, что приводит к невозможности заранее выбрать оптимальную стратегию лечения. Для таких случаев крайне актуален поиск методов уточняющей дифференциальной диагностики, среди которых наиболее перспективным в настоящее время считается мутационное тестирование.

Цель: оценить возможность использования мутационных тестов для дифференциальной диагностики новообразований ЩЖ на дооперационном этапе.

Методы. Проведено одноцентровое проспективное исследование, в которое были включены пациенты с новообразованиями ЩЖ, проходившие хирургическое лечение в ФГБУ “НМИЦ эндокринологии” Минздрава России с 2012 по 2014 г. Образцы цитологического, гистологического материала и плазмы крови пациентов тестировали на наличие соматических мутаций в “горячих точках” генов *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* и *TERT*.

Результаты. В исследование было включено 75 пациентов, из них 29 с папиллярным раком ЩЖ низкого риска, 29 с фолликулярными новообразованиями ЩЖ и 17 с узловым коллоидным зобом. Мутации в “горячих точках” гена *BRAF* (экзон 15, район кодонов 600–601) были обнаружены у 29 пациентов, мутации в “горячих точках” гена *NRAS* (экзон 3, кодон 61) – у 8 пациентов; мутации в “горячих точках” генов *KRAS*, *TERT* и *EIF1AX* выявлены не были. Совпадение результатов мутационного тестирования цитологического и гистологического материала составило 91,7%. Мутация опухолевого происхождения в циркулирующей ДНК плазмы крови была обнаружена в одном случае. Прогностическая ценность положительного результата (PPV) мутационного теста на цитологическом материале в отношении злокачественного характера опухоли ЩЖ составила 100% для гена *BRAF* и 0% для гена *NRAS*.

Заключение. Тест на мутации в “горячих точках” гена *BRAF* на цитологическом материале может быть использован в качестве дополнительного маркера для уточнения характера новообразования ЩЖ при неопределенном результате цитологического исследования. Не получено данных за информативность использования в аналогичных ситуациях тестов на мутации в “горячих точках” генов *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* и *TERT*, а также мутационного тестирования циркулирующей ДНК плазмы крови.

Ключевые слова: новообразования щитовидной железы, рак щитовидной железы, дифференциальная диагностика, неопределенный результат цитологического исследования, молекулярно-генетические исследования, соматические мутации, гены *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX*, *TERT*.

Somatic mutation testing: the role in differential diagnosis of thyroid neoplasms

© Vera A. Kachko^{1*}, Andrew R. Zaretsky^{2, 3}, Vladimir E. Vanushko⁴,
Nadezhda M. Platonova^{1, 4}, Alexander Yu. Abrosimov⁴, Galina V. Semkina⁴

¹ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Department of Endocrinology, Moscow, Russia

² Evrogen Lab LLC, Moscow, Russia

³ Shemyakin-Ovchinnikov Research Institute for Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴ Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

Background: In the preoperative diagnosis of thyroid tumors the cytological examination of the material of fine needle aspiration biopsy is the gold standard and serves as the basis for planning of treatment strategy. However, in 10–30% of cases, it cannot be clearly established by cytology whether the nature of thyroid neoplasm benign or malignant, which leads to the inability to choose the optimal treatment strategy in advance. For such cases, it is extremely important to search for methods of clarifying differential diagnosis, among which mutation testing is currently considered the most promising.

Aims: To evaluate the possibility of using mutation tests for clarifying differential diagnosis of thyroid neoplasms at the preoperative stage.

Materials and methods: We performed the prospective single center study, which included patients with the thyroid neoplasms, who had been treated in the Endocrinology Research Center, Moscow, Russia from 2012 to 2014. Samples of histological material, cytological material and blood plasma of these patients were tested for the presence of somatic mutations in hot spots of the genes *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *TERT*, and *EIF1AX*.

Results: The study included 75 patients, 29 of them with low-risk papillary thyroid cancer, 29 with follicular neoplasm NA of the thyroid gland and 17 with colloid nodular goiter. Mutations in the “hot spots” of the *BRAF* gene (exon 15, codon area 600–601) were found in 29 patients, mutations in the “hot spots” of the *NRAS* gene (exon 3, codon 61) – in 8 patients; mutations in the hot spots of the *KRAS*, *TERT* and *EIF1AX* genes were not detected. Correlation of the results of mutational testing of cytological and histological material was 91.7%. Mutations of tumor origin in circulating blood plasma DNA were found in only 1 cases. The prognostic value of the positive result (PPV) of the mutation test on cytological material in relation to the malignant nature of the thyroid tumor was 100% for the *BRAF* gene and 0% for the *NRAS* gene.

Conclusions: The mutation test in the “hot spots” of the *BRAF* gene on cytological material can be used as an additional marker to clarify the nature of thyroid tumors, when the result of cytological examination are uncertain. Either in similar situations for mutation tests in the “hot spots” of genes *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* and *TERT* on cytological material, or mutation testing of circulating DNA of blood plasma can't be used as an additional marker.

Keywords: thyroid neoplasms, thyroid cancer, differential diagnosis, indeterminate result of thyroid cytology, molecular testing, somatic mutations, genes *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *TERT*, *EIF1AX*.

Обоснование

За последние десять лет получены важные данные о молекулярных механизмах формирования опухолей, были идентифицированы генетические изменения, ассоциированные с различными типами рака щитовидной железы (ЩЖ). Некоторые из выявленных маркеров стали применять в предоперационной диагностике узлов, которые по результатам тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) относятся к образованиям

с неопределенными результатами, – это диагностические категории Bethesda III–V. Категория III – фолликулярное поражение неопределенного значения/атипия неопределенного значения, риск злокачественности такого образования составляет 6–30%, категория IV – фолликулярная неоплазия/подозрение на фолликулярную неоплазию имеет умеренный риск злокачественности (10–40%) и категория V – подозрение на злокачественность имеет высокий риск злока-

чественности (45–75%) [1]. Согласно рекомендациям Американской тиреоидологической ассоциации (ATA) 2015 г. [2] и Американской ассоциации клинических эндокринологов (AACE) 2016 г. [3], рекомендуется рассмотреть молекулярное тестирование при неопределенных результатах ТАБ. Однако данные об отдаленных результатах применения молекулярных маркеров в клинической практике в настоящее время отсутствуют. Поэтому определение молекулярных маркеров для принятия решений об изменении лечебной тактики широко обсуждается и существенно не влияет на решение о показаниях к хирургическому вмешательству. Так, по данным исследований, только у 7,2–8,4% пациентов изменяется тактика лечения в результате молекулярного тестирования [4]. Согласно российским клиническим рекомендациям по диагностике и лечению высокодифференцированного рака ЩЖ у взрослых 2017 г., для дифференциальной диагностики опухолей ЩЖ в рамках цитологического заключения III, IV и V групп по Bethesda Thyroid Classification (2009) может быть полезным генетическое тестирование на *BRAF* и другие маркеры (*RAS*, *RET/PTC*, *PAX8/PPAR-γ*, *TERT* и др.). На сегодняшний день возможности этого метода ограничены и требуют дальнейшего накопления данных [5].

В нашем исследовании мы решили исследовать панель соматических мутаций в “горячих точках” генов *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX*, *TERT*, поскольку их обнаружение ассоциировано с обнаружением рака ЩЖ [10–16].

Ген *BRAF* кодирует цитоплазматический белок, участвующий во внутриклеточной передаче сигнала от рецепторов факторов роста. Ген *BRAF* относится к протоонкогенам; примерно в 7–8% случаев злокачественных опухолей человека обнаруживаются активирующие соматические мутации в этом гене, которые чаще всего локализуются в 15-м экзоне гена *BRAF* (кодоны 600–601). Реже встречаются так называемые неклассические мутации в 11-м и 15-м экзонах гена *BRAF* (в районе кодонов 469, 570–598, 603–605). Описано использование мутантного гена *BRAF* в качестве маркера для не-

инвазивного мониторинга опухолевого присутствия. Кроме того, мутационный статус гена *BRAF* может быть использован как прогностический и особенно как предиктивный маркер – наличие мутации в “горячих точках” этого гена ассоциировано с потенциальной устойчивостью к любым ингибиторам рецепторных тирозинкиназ, а также к монотерапии ингибиторами mTOR [14–16].

Ген *NRAS* кодирует цитоплазматический белок, участвующий во внутриклеточной передаче сигнала от рецепторов факторов роста. Ген *NRAS* относится к протоонкогенам, примерно в 15% случаев злокачественных опухолей человека обнаруживаются активирующие соматические мутации в этом гене, которые чаще всего локализуются в экзоне 3 (кодоны 59 и 61) и реже в экзоне 2 (кодоны 12 и 13) или в экзоне 4 (кодоны 117 и 146). Описано использование мутантного гена *NRAS* в качестве маркера для неинвазивного мониторинга опухолевого присутствия [14–15].

Ген *KRAS* кодирует цитоплазматический белок, участвующий во внутриклеточной передаче сигнала от рецепторов факторов роста. Ген *KRAS* относится к протоонкогенам; примерно в 30–40% случаев злокачественных опухолей человека обнаруживаются активирующие соматические мутации в этом гене, которые чаще всего локализуются в экзоне 2 (кодоны 12 и 13) и реже в экзоне 3 (кодоны 59 и 61) или в экзоне 4 (кодоны 117 и 146). Описано использование мутантного гена *KRAS* в качестве маркера для неинвазивного мониторинга опухолевого присутствия [14–15].

Ген *TERT* кодирует каталитическую субъединицу теломеразной обратной транскриптазы – ядерный белок, выполняющий ключевую роль в реакции поддержания длины теломер. Поскольку поддержание длины теломер связано с увеличением пролиферативного потенциала клеток и потенциальным преодолением лимита Хейфлика, экспрессионная активность гена *TERT* и других генов теломеразного комплекса (*TERC*, *NOP10*, *GAR1*, *NHP2*, *REPTIN* и *PONTIN*) оказывается подавлена в большинстве нормальных клеток взрослого человека, за исключением стволовых клеток и активированных лимфо-

цитов. В большинстве злокачественных опухолей человека наблюдается патологическая активация теломеразы, которая может индуцироваться различными механизмами. Одним из таких механизмов являются соматические точечные мутации в “горячих точках” промоторной области гена *TERT* (преимущественно в позициях -124, -125, -138, -139, -146 и изредка -57 относительно начала кодирующей последовательности основного транскрипта данного гена – NM_198253.2). Эти мутации создают в промоторной области гена *TERT* сайты связывания транскрипционных факторов ETS/TCF, вследствие чего индуцируется экспрессия этого гена в клетках, в которых в норме она должна быть подавлена. Мутации в “горячих точках” промоторной области гена *TERT* обнаруживаются при различных типах злокачественных опухолей, включая глиальные опухоли головного мозга, рак щитовидной железы, меланому, колоректальный рак и некоторые другие. Эти мутации могут быть использованы для дифференциальной диагностики “пограничных” опухолей, поскольку наличие мутаций в промоторной области гена *TERT* с очень высокой вероятностью говорит о злокачественном характере новообразования [10–12].

Ген *EIF1AX* кодирует цитоплазматический белок, участвующий в трансляции (синтезе белка на матрице мРНК). Белок EIF1AX входит в состав так называемого преинициационного белкового комплекса, который специфически распознает экспонированный 5'-конец молекулы мРНК, связывается с ним и запускает сборку трансляционной “машины”. Ген *EIF1AX* относится к протоонкогенам. Соматические мутации в гене *EIF1AX* встречаются менее чем в 1% случаев злокачественных опухолей, в основном при увеальных и лептоменингеальных меланом, фолликулярных опухолях щитовидной железы, раке эндометрия и высокодифференцированных серозных опухолях яичников. Эти мутации локализованы преимущественно в экзоне 2 и в отдельных “горячих точках” экзонов 1 и 6. Функциональным результатом данных мутаций, скорее всего, является утрата чувствительности белка EIF1AX к ингибиторным сигналам и как следствие – активация трансляционного синтеза широ-

кого круга белков. В большинстве случаев мутации в гене *EIF1AX* обнаруживаются в опухолях с наименее агрессивным фенотипом, включая доброкачественные, вследствие чего наличие подобных мутаций считается благоприятным прогностическим фактором. Однако сочетание мутаций в гене *EIF1AX* с другими онкогенными событиями оказывается фактором менее благоприятного прогноза. Так, при фолликулярных опухолях щитовидной железы одновременное обнаружение мутаций в генах *EIF1AX* и *RAS* однозначно говорит о злокачественном характере опухоли. При анапластическом раке щитовидной железы наличие мутации в гене *EIF1AX* является предиктором особенно агрессивного течения заболевания [13].

Цель

Целью исследования являлось оценить возможность использования молекулярно-генетических маркеров для дифференциальной диагностики опухолей ЩЖ на дооперационном этапе.

Методы

Дизайн исследования

Проведено проспективное одноцентровое наблюдательное неконтролируемое выборочное исследование (рис. 1).

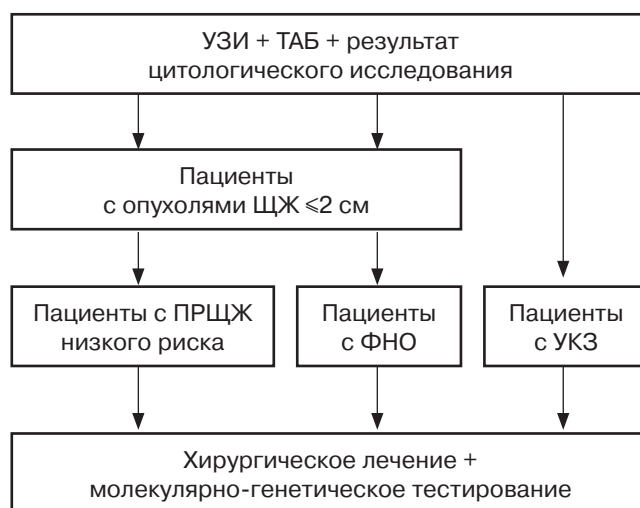


Рис. 1. Схема дизайна исследования.

Критерии соответствия

В ходе исследования пациентов набирали и распределяли в три группы.

- Критериями включения в группу папиллярного рака ЩЖ (ПРЩЖ) были размер образования менее 2 см, отсутствие признаков метастазирования или экстраклеточного распространения по данным ультразвукового исследования (УЗИ), что соответствовало стадии T1 низкого риска (по версии TNM 2009 г.).

- Критерием включения в группу фолликулярных новообразований (ФНО) был размер образования менее 2 см.

- В группу узлового коллоидного зоба (УКЗ) набирались пациенты с узловыми образованиями любых размеров, которым было показано проведение хирургического лечения (синдром компрессии органов шеи или косметический дефект).

Критериями невключения для всех групп были: некомпенсированный тиреотоксикоз, проведенная ранее операция на ЩЖ, отягощенный анамнез по наследственным и семейным формам заболеваний ЩЖ, повышенная концентрация кальцитонина в крови.

Условия проведения

В исследование включали пациентов, находившихся на лечении в хирургическом отделении ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России.

Продолжительность исследования

Набор пациентов в группы продолжался в течение трех лет – с 2012 по 2014 г.

Описание медицинского вмешательства

Всем пациентам, включенным в исследование, проводили лабораторно-инструментальный комплекс для подготовки, проведения и послеоперационного наблюдения: физикальное обследование; лабораторные

исследования: определение уровня тиреотропного гормона (ТТГ), общий анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, коагулограмму, определение уровня тиреоглобулина (ТГ), антител к ТГ (АТ-ТГ); инструментальные исследования: электрокардиограмму, рентгенографию органов грудной клетки, УЗИ ЩЖ, ТАБ с цитологическим исследованием пунктата, гистологическое исследование опухоли, сцинтиграфию всего тела с радиофармпрепаратом (изотопами йода ^{131}I , ^{123}I).

Основной исход исследования

Конечной точкой исследования был показатель прогностической ценности результатов генетического тестирования в отношении типа опухоли, выполненного на дооперационном этапе по цитологическому материалу и/или по плазме крови.

Анализ в подгруппах

Пациентов разделяли на три группы в зависимости от результатов УЗИ и цитологического исследования: ПРЩЖ низкого риска ($n = 29$), ФНО ($n = 29$), УКЗ ($n = 17$). Группы пациентов были несколько различны по возрасту и сопоставимы по полу и концентрации ТТГ (табл. 1).

Методы регистрации исходов

В рамках исследования пациентам проводили молекулярно-генетическое исследование цитологического, гистологического материала и плазмы крови.

Цитологические стекла были отобраны и использованы для выделения ДНК с согласия пациентов после получения результатов гистологического заключения. Все цитологические стеклопрепараты были приготовлены методом мазка и окрашены по Гимзе–Романовскому. Предоставленные стеклопрепараты были подвергнуты пересмотру с установлением цитологического диагноза

Таблица 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Показатель	УКЗ	ФНО	ПРЩЖ	Значимость
Возраст, лет	34 [28,5; 55]	51 [34; 59]	52 [46; 59,5]	$p = 0,048$
Пол (м/ж)	3/14	3/26	2/27	$p = 0,521$
ТТГ, мЕд/л	1,55 [1,0; 2,52]	1,8 [1,0; 2,42]	1,6 [1,0; 2,5]	$p = 0,682$

по классификации Bethesda. Для каждого образца выбирали наиболее информативные участки мазков и оценивали их на предмет соответствия критериям для достоверного молекулярного исследования опухолевых клеток. Выделение ДНК из этих образцов, т.е. из участков окрашенных цитологических стеклопрепаратов, осуществляли с помощью набора реагентов серии AllPrep (Qiagen, Hilden, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и качество выделенной ДНК оценивали с использованием набора реагентов “aXY-Детект” (ООО НПФ “Синтол”, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Всего было отобрано 87 стеклопрепаратов от 75 пациентов. ДНК, выделенная из всех 87 образцов, по концентрации и качеству соответствовала критериям для достоверного ПЦР-анализа мутаций.

Гистологический материал был представлен в виде парафиновых блоков с операционным материалом. На основании данных морфологических исследований выбирали наиболее информативный блок и оценивали его на предмет соответствия критериям достоверного молекулярного исследования опухолевых клеток. Выделение ДНК из срезов с парафиновых блоков осуществляли с помощью набора реагентов “Экстракт ДНК FFPE” (ЗАО “Евроген”, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и качество выделенной ДНК оценивали с использованием набора реагентов “aXY-Детект” (ООО НПФ “Синтол”, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Всего было отобрано 74 блока от 74 пациентов. ДНК, выделенная из 74 образцов, по концентрации и качеству соответствовала критериям для достоверного ПЦР-анализа мутаций.

Для выделения циркулирующей ДНК производили забор периферической крови за день до и на третьи сутки после оперативного вмешательства. Кровь забирали в вакуумные пробирки с консервантом на основе EDTA. Образцы крови обрабатывали в два этапа. Вначале в срок не позднее чем через 4 ч после забора крови отделяли фракцию плазмы крови методом трехэтапного центрифугирования по стандартному протоколу.

Затем из плазмы крови выделяли циркулирующую ДНК с использованием набора реагентов QiaAmp Circulating Nucleic Acids Kit (Qiagen, Hilden, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и качество выделенной ДНК оценивали с использованием набора реагентов “aXY-Детект” (ООО НПФ “Синтол”, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Секвенирование по Сэнгеру проводили в специализированной лаборатории ЗАО “Евроген Рн” на аппарате ABI 3500 (Applied Biosystems – часть Thermo Fisher Scientific, США) с использованием рекомендованных производителем наборов реагентов и стандартных операционных процедур. Исследовали только образцы, из которых удалось выделить достаточное количество ДНК.

Поиск мутаций в “горячих точках” генов *BRAF* (экзон 15) и *NRAS* (экзон 3, район кодона 61) в ДНК образцов гистологического и цитологического материала проводили методом мутационно-специфической ПЦР в режиме реального времени с верификацией положительных и сомнительных результатов методом секвенирования продуктов ПЦР по Сэнгеру. Использовали наборы реагентов “Инсайдер *BRAF*” и “Инсайдер *NRAS*” (ЗАО “Евроген”) в соответствии с инструкцией производителя.

Поиск мутаций в других “горячих точках” гена *NRAS* (экзон 2, район кодонов 12 и 13; экзон 3, район кодона 59; экзон 4, район кодонов 117 и 146) и в “горячих точках” гена *KRAS* (экзон 2, район кодонов 12 и 13; экзон 3, район кодонов 59 и 61; экзон 4, район кодонов 117 и 146) в ДНК части образцов гистологического и цитологического материала проводили методом мутационно-специфической ПЦР в режиме реального времени с верификацией положительных и сомнительных результатов методом секвенирования продуктов ПЦР по Сэнгеру. Использовали набор реагентов “Инсайдер *PAN-RAS*” (ЗАО “Евроген”) в соответствии с инструкцией производителя.

Поиск мутаций в “горячих точках” гена *TERT* (транскрипт NM_198253.2, промоторная область) в ДНК образцов гистологического и цитологического материала проводили методом ПЦР с последующим секвени-

рованием продуктов ПЦР по Сэнгеру. Использовали набор реагентов “ГенСкан TERT” (ООО “Евроген Лаб”) в соответствии с инструкцией производителя.

Поиск мутаций в “горячих точках” гена *EIF1AX* (экзон 6) в ДНК части образцов гистологического и цитологического материала проводили методом ПЦР с последующим секвенированием продуктов ПЦР по Сэнгеру. Использовали набор реагентов “ГенСкан EIF1AX-6” (ООО “Евроген Лаб”) в соответствии с инструкцией производителя. Исследовали только образцы, в которых обнаруживались мутации в генах *NRAS* или *KRAS*.

Поиск мутаций в “горячих точках” экзона 15 гена *BRAF* и экзона 3 гена *NRAS* в образцах циркулирующей ДНК плазмы крови проводили методом высокочувствительной мутационно-специфической ПЦР-РВ в модификации усиленной аллель-специфической ПЦР-РВ с одновременным подавлением амплификации аллелей “дикого типа”. Использовали наборы реагентов серии “СуперИнсайдер” (ООО “Евроген Лаб”, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Этическая экспертиза

Протокол исследования был одобрен Межвузовским комитетом по этике (протокол № 02-12 от 16.02.2012). Все пациенты до включения в исследование добровольно подписывали форму информированного согласия.

Статистический анализ

Размер выборки был рассчитан для уровня статистической значимости не менее 95% с ДИ $\pm 5\%$, вероятностью ошибки не более 20%. Учитывая небольшие объемы выборок и распределения, отличающиеся от нормального, были использованы непараметрические методы анализа данных. Для оценки значимости различий данных в группах применялся метод Манна–Уитни (для двух независимых групп), для сравнения более двух независимых выборок использовался тест Крускала–Уоллиса (критерий H). Для сравнения относительных показателей использовался критерий χ^2 (хи-квадрат). Статис-

тическая обработка результатов исследования выполнена с использованием пакета прикладных программ Statistica v 10.0 for Windows (Dell, США). Данные в тексте и в таблицах представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты

Объекты (участники) исследования

Из 75 вошедших в исследование пациентов 74 были прооперированы. В одном случае УКЗ было принято решение продолжить наблюдение. Пациентам в зависимости от клинической ситуации были выполнены гемитиреоидэктомия, тиреоидэктомия или тиреоидэктомия, дополненная удалением лимфоузлов центральной зоны шеи (VI уровень), при подозрении на наличие метастазов в регионарные лимфатические узлы. Пациентам с фолликулярным новообразованием выполняли диагностическую гемитиреоидэктомию и по результатам срочного интраоперационного морфологического исследования принимали решение о дальнейшем объеме оперативного вмешательства.

Для молекулярно-генетического исследования использован цитологический материал 75 пациентов.

После получения результатов гистологического исследования количественное соотношение в группах изменилось за счет увеличения доли пациентов в группе ПРЩЖ (с 39 до 53%) и УКЗ (с 23 до 28%). Из 17 пациентов, исходно вошедших в группу УКЗ, на основании гистологического исследования был диагностирован ПРЩЖ в 1 случае и фолликулярная аденома (ФА) в 1 случае, в остальных случаях диагноз УКЗ был подтвержден. Из 29 пациентов, включенных в группу ФНО, по результатам гистологического исследования в 10 случаях был выявлен ПРЩЖ, в 13 – ФА, в 5 – УКЗ и в 1 – хронический аутоиммунный тиреоидит (ХАИТ). В группе пациентов с ПРЩЖ диагноз был подтвержден во всех случаях. Данные по распределению пациентов по группам на основании цитологического заключения и рас-

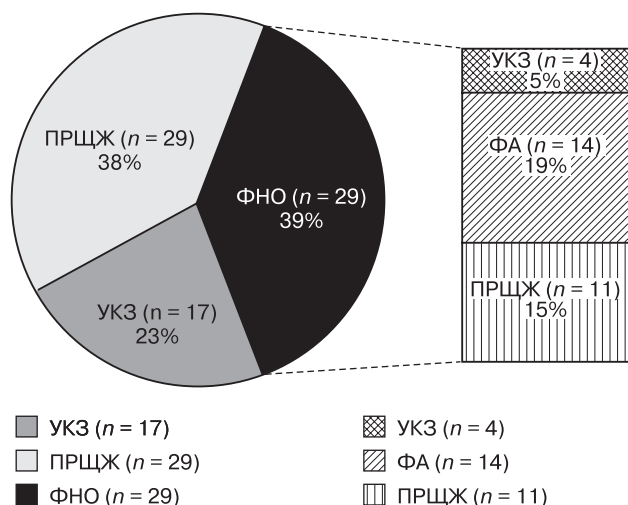


Рис. 2. Распределение пациентов по группам на основании цитологического заключения ($n = 75$, %) и распределение гистологических заключений в группе ФНО: УКЗ – узловой коллоидный зоб, ПРЩЖ – папиллярный рак щитовидной железы, ФНО – фолликулярное новообразование, ФА – фолликулярная аденома.

пределение гистологических заключений в группе ФНО представлены на рис. 2. Итоговое распределение пациентов по группам на основании гистологического заключения представлено на рис. 3.

Основные результаты исследования

Молекулярное тестирование цитологического материала

BRAF. Поиск мутаций в “горячих точках” гена *BRAF* (экзон 15, район кодонов 600–601) выполнен в образцах ДНК, выделенной из цитологического материала 75 пациентов.

Мутации обнаружены в 29 случаях из 75, в том числе: с.1799T>A, р.(Val600Glu, V600E) [COSMIC ID 476] – у 27 пациентов; с.1799_1800TG>AT, р.(Val600Asp, V600D) [COSMIC ID 477] – у 1 пациента; с.1794_1796delTAC, р.(Thr599del, T599del) [COSMIC ID 1169497] – также у 1 пациента (табл. 2). По результатам гистологического исследования операционного материала у всех 29 пациентов с мутациями в гене *BRAF* был выявлен ПРЩЖ. Среди 46 пациентов без мутации в гене *BRAF* злокачественные опухоли были выявлены еще у 11 пациентов. Таким образом, прогностическая ценность

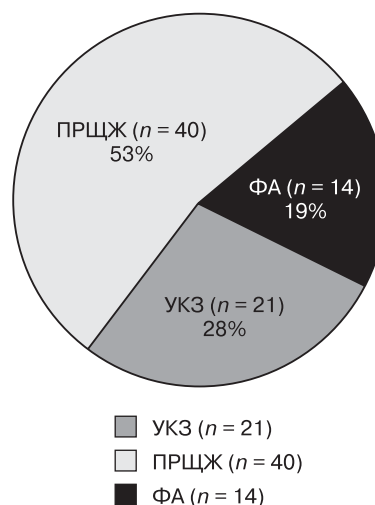


Рис. 3. Распределение пациентов по группам на основании гистологического заключения ($n = 75$, %): УКЗ – узловой коллоидный зоб, ПРЩЖ – папиллярный рак щитовидной железы, ФА – фолликулярная аденома.

мутационного теста, выполняемого на цитологическом материале, в отношении злокачественного характера опухоли составила $PPV = (29/29) 100\%$. А прогностическая значимость отрицательного результата этого теста в отношении доброкачественного характера опухоли $NPV = (35/46) 76,0\%$. Чувствительность, специфичность и точность теста составили $(29/40) 72,5\%$, $(35/35) 100\%$ и $((29+35)/75) 85,3\%$ соответственно.

NRAS. Поиск мутаций в “горячих точках” гена *NRAS* (экзон 3, район кодона 61) выполнен в образцах ДНК, выделенной из цитологического материала 75 пациентов. Мутации обнаружены в 8 случаях, в том числе: с.182A>G, р.(Gln61Arg, Q61R) [COSMIC ID 584] – у 6 пациентов; с.181C>A, р.(Gln61Lys, Q61K) [COSMIC ID 580] – у 2 пациентов (табл. 3). По результатам гистологического исследования операционного материала злокачественные опухоли ЩЖ не были обнаружены ни у одного из 8 пациентов с мутациями в гене *NRAS* (в 4 случаях был выявлен УКЗ, в 3 – ФА и в 1 случае – ХАИТ); среди 67 пациентов без мутации в гене *NRAS* злокачественные опухоли ЩЖ были выявлены в 37 случаях. Таким образом, прогностическая ценность мутационного теста, выполняемого на цитологическом материале,

Таблица 2. Частота встречаемости мутаций в “горячих точках” гена BRAF (экзон 15, район кодонов 600–601) в цитологическом и гистологическом материале

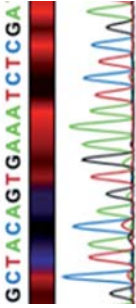
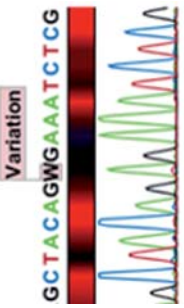
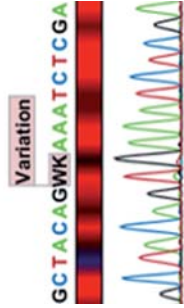
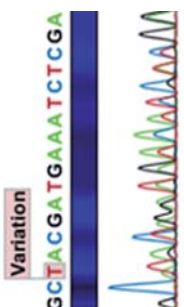
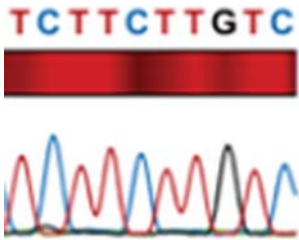
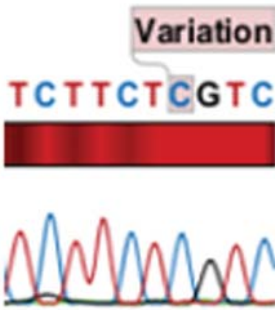
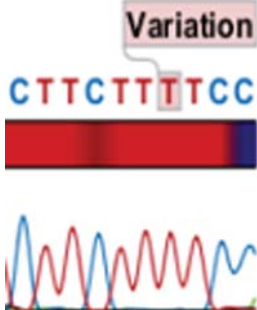
Вариант мутации	Нет мутации (дикий тип)	с.1799T>A, р.(Val600Glu, V600E) [COSMIC ID 476]	с.1799_1800TG>AT, р.(Val600Asp, V600D) [COSMIC ID 477]	с.1794_1796delTAC, р.(Thr599del, T599del) [COSMIC ID 1169497]
Секвенограмма				
Мутации в цитологическом материале (n = 75, n BRAF+ = 29 (38,6%))				
УКЗ (n = 17)	17, в том числе 14 УКЗ, 1 ПРЦЖ, 1 ФА и 1 без операции			
ФНО (n = 29)	22, из них 3 ПРЦЖ, 13 ФА, 6 УКЗ	5, по гистологии все ПРЦЖ	1, по гистологии ПРЦЖ	1, по гистологии ПРЦЖ
ПРЦЖ (n = 29)	7	22		
Мутации в гистологическом материале (n = 74, n BRAF+ = 29 (39,2%))				
УКЗ (n = 20)	19	1	0	0
ФА (n = 14)	14	0	0	0
ПРЦЖ (n = 40)	11	27	1	1

Таблица 3. Частота встречаемости мутаций в “горячих точках” гена *NRAS* (экзон 3, район кодона 61) в цитологическом и гистологическом материале

Вариант мутации	Нет мутации (дикий тип)	с. 182A>G, p.(Gln61Arg, Q61R) [COSMIC ID 584]	с. 181C>A, p.(Gln61Lys, Q61K) [COSMIC ID 580]
Секвенограмма			
Мутации в цитологическом материале (n = 75, n NRAS+ = 8 (10,7%))			
УКЗ (n = 17)	14, в том числе 1 ПРЦЖ и 1 ФА	2, из них по гистологии 1 УКЗ и 1 без операции	1, по гистологии УКЗ
ФНО (n = 29)	24, из них 10 ПРЦЖ, 10 ФА, 6 УКЗ	4, из них по гистологии 3 ФА, 1 УКЗ	1, по гистологии УКЗ
ПРЦЖ (n = 29)	29		
Мутации в гистологическом материале (n = 74, n NRAS+ = 5 (6,8%))			
УКЗ (n = 20)	18	2	0
ФА (n = 14)	11	3	0
ПРЦЖ (n = 40)	40	0	0

в отношении злокачественного характера опухоли ЩЖ составила PPV = 0%, а прогностическая ценность отрицательного результата данного теста в отношении доброкачественного характера опухоли ЩЖ составила NPV = (30/67) 44,8%. Чувствительность, специфичность, точность теста составили (0/40) 0%, (27/35) 77% и ((0+27)/75) 36% соответственно. Мутации в других “горячих точках” гена *NRAS* (экзон 2, район кодонов 12 и 13; экзон 3, район кодона 59; экзон 4, район кодонов 117 и 146), а также в “горячих точках” гена *KRAS* (экзон 2, район кодонов 12 и 13; экзон 3, район кодонов 59 и 61; экзон 4, район кодонов 117 и 146), *EIF1AX* (экзоны 1, 2 и 6) и *TERT* (транскрипт NM_198253.2, промоторная область, район позиций с.1-146 – с.1-124) не обнаружены ни в одном образце.

Молекулярное тестирование плазмы крови

***BRAF* и *NRAS*.** Поиск мутаций в “горячих точках” гена *BRAF* (экзон 15, район кодонов 600–601) и *NRAS* (экзон 3, район кодона 61)

в образцах ДНК, выделенной из плазмы крови до операции, выполнен у 36 пациентов, из плазмы крови после операции – у 19 пациентов. Поиск мутаций производился только в образцах крови пациентов, у которых по данным молекулярно-генетического тестирования гистологического/цитологического материала были выявлены таргетные мутации генов *BRAF* и *NRAS*. Мутации в “горячих точках” гена *BRAF* (экзон 15, район кодонов 600–601) не выявлены ни в одном случае. Мутация *NRAS* с.181C>A, p.(Gln61Lys, Q61K) [COSMIC ID 580] обнаружена в 1 случае в плазме крови пациента как до, так и после операции. По результатам гистологического исследования операционного материала был выявлен УКЗ. Таким образом, прогностическая ценность мутационного теста по гену *BRAF*, выполняемого на плазме крови, в отношении злокачественного характера опухоли ЩЖ составила PPV = 0%. Прогностическая ценность мутационного теста по гену *NRAS*, выполняемого на плазме крови, в отношении злокачественного харак-

тера опухоли ЩЖ составила PPV = 0%. Прогностическая ценность отрицательного результата данного теста по гену *NRAS* в отношении доброкачественного характера опухоли ЩЖ составила NPV = (7/35) 20%.

Молекулярное тестирование гистологического материала

BRAF. Поиск мутаций в “горячих точках” гена *BRAF* (экзон 15, район кодонов 600–601) выполнен в образцах ДНК, выделенной из гистологического материала 74 пациентов.

Мутации обнаружены в 29 случаях из 74, в том числе: с.1799T>A, р.(Val600Glu, V600E) [COSMIC ID 476] – у 27 пациентов; с.1799_1800TG>AT, р.(Val600Asp, V600D) [COSMIC ID 477] – у 1 пациента; с.1794_1796delTAC, р.(Thr599del, T599del) [COSMIC ID 1169497] – у 1 пациента (табл. 2). При сопоставлении данных молекулярно-генетического тестирования гистологического материала с данными гистологического исследования в 28 случаях *BRAF*+ был выявлен ПРЩЖ и в 1 случае УКЗ. Среди 45 пациентов без мутации в гене *BRAF* злокачественные опухоли были выявлены еще у 12 пациентов. Таким образом, прогностическая ценность мутационного теста, выполняемого на гистологическом материале, в отношении злокачественного характера опухоли ЩЖ составила PPV = (28/29) 96,6%. Прогностическая ценность отрицательного результата мутационного теста в отношении доброкачественного характера опухоли ЩЖ составила NPV = (33/45) 73,3%. Чувствительность, специфичность, точность теста составили (28/40) 70%, (33/34) 97,1% и ((28+33)/74) 82,4% соответственно.

NRAS. Поиск мутаций в “горячих точках” гена *NRAS* (экзон 3, район кодона 61) выполнен в образцах ДНК, выделенной из гистологического материала 74 пациентов. Мутация *NRAS* с.182A>G, р.(Gln61Arg, Q61R) [COSMIC ID 584] обнаружена в 5 случаях (табл. 3).

По результатам гистологического исследования операционного материала злокачественные опухоли ЩЖ не были обнаружены ни у одного из 5 пациентов с мутациями в гене *NRAS* (в 1 случае был выявлен УКЗ, в 4 – ФА); среди 69 пациентов без мутации в гене *NRAS* злокачественные опухоли ЩЖ

были выявлены в 40 случаях. Таким образом, прогностическая ценность мутационного теста, выполняемого на гистологическом материале, в отношении злокачественного характера опухоли ЩЖ составила PPV = 0%, а прогностическая ценность отрицательного результата данного теста в отношении доброкачественного характера опухоли ЩЖ составила NPV = (29/69) 42%. Чувствительность, специфичность, точность теста составили (0/40) 0%, (29/34) 85,2% и ((0+29)/74) 39,2% соответственно. Мутации в других “горячих точках” гена *NRAS* (экзон 2, район кодонов 12 и 13; экзон 3, район кодона 59; экзон 4, район кодонов 117 и 146), а также в “горячих точках” гена *KRAS* (экзон 2, район кодонов 12 и 13; экзон 3, район кодонов 59 и 61; экзон 4, район кодонов 117 и 146), *EIF1AX* (экзоны 1, 2 и 6) и *TERT* (транскрипт NM_198253.2, промоторная область, район позиций с.1-146 – с.1-124) не обнаружены ни в одном образце. Частота обнаружения мутации *BRAF* и в цитологическом материале, и в гистологическом материале была значимо выше в группе ПРЩЖ по сравнению с группами УКЗ и ФНО ($p < 0,001$).

Совпадение мутантного статуса между разными образцами одного и того же пациента (цитология – гистология, плазма – гистология)

При сопоставлении данных молекулярно-генетического тестирования цитологического материала с данными молекулярно-генетического тестирования гистологического материала из 74 пар было отобрано 72 парных образца (два цитологических образца по результатам сравнительного молекулярного тестирования методом мультиплексного STR-анализа были идентифицированы как не принадлежащие одним и тем же пациентам). Из них в 6 парах были обнаружены расхождения (8%):

- мутация *BRAF* с.1799T>A, р.(Val600Glu, V600E) [COSMIC ID 476] обнаружена в двух образцах цитологии, но не выявлена в соответствующих образцах гистологии;

- мутация *BRAF* с.1799T>A, р.(Val600Glu, V600E) [COSMIC ID 476] обнаружена в двух образцах гистологии, но не выявлена в соответствующих образцах цитологии;

- мутация *NRAS* с.182A>G, р.(Gln61Arg, Q61R) [COSMIC ID 584] обнаружена в одном образце цитологии, но не выявлена в соответствующем образце гистологии;

- мутация *NRAS* с.181C>A, р.(Gln61Lys, Q61K) [COSMIC ID 580] обнаружена в одном образце цитологии, но не выявлена в соответствующем образце гистологии.

Кроме того, мы сопоставили данные молекулярно-генетического тестирования цитологического материала 12 случаев пар цитологических стеклопрепаратов одного и того же пациента. По результатам молекулярного тестирования парных образцов были обнаружены расхождения в 5 из 12 случаев, а именно мутация *BRAF* с.1799T>A, р.(Val600Glu, V600E) [COSMIC ID 476] обнаружена в образцах, но не обнаружена в парных. Выявленная мутация *NRAS* с.181C>A, р.(Gln61Lys, Q61K) [COSMIC ID 580] плазмы крови была подтверждена молекулярным профилем гистологического материала.

Нежелательные явления

У части пациентов после оперативного вмешательства отмечались клинические и лабораторные признаки гипокальциемии, которые быстро купировались приемом препаратов кальция и витамина D.

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

По результатам исследования цитологических, гистологических и образцов плазмы крови пациентов с малыми опухолями щитовидной железы можно сделать следующие выводы.

1. Частота встречаемости мутаций в цитологическом материале:

- частота обнаружения мутации *BRAF* в цитологическом материале составила 38,6% и была значимо выше в группе ПРЩЖ по сравнению с группами УКЗ и ФНО ($p < 0,001$);
- частота обнаружения мутации *NRAS* в цитологическом материале составила 10,7%. Значимых отличий по частоте выявления мутации *NRAS* между группами не было.

2. Частота встречаемости мутаций в гистологическом материале:

- частота обнаружения мутации *BRAF* в гистологическом материале составила 39,2% и была значимо выше в группе ПРЩЖ по сравнению с группами УКЗ и ФНО ($p < 0,001$);
- частота обнаружения мутации *NRAS* в гистологическом материале составила 6,8%, значимых отличий по частоте выявления мутации *NRAS* между группами не было ($p = 0,06$);
- в исследованных образцах пациентов с малыми опухолями ЩЖ не были обнаружены мутации в других “горячих точках” гена *NRAS* и генов *KRAS*, *TERT*, *EIF1AX*.

3. Совпадение мутантного статуса между разными образцами одного и того же пациента (цитология – гистология, плазма – гистология). Молекулярный профиль цитологического материала в большинстве случаев совпадает с молекулярным профилем гистологического материала (92%). Выявленные мутации плазмы крови были подтверждены молекулярным профилем гистологического материала.

4. Предсказательная сила мутационного теста по цитологическому материалу и/или по плазме крови в отношении типа опухоли на дооперационном этапе:

- для цитологического материала обнаружение мутаций в “горячих точках” экзона 15 гена *BRAF* (район кодонов 600–601) показало высокую предсказательную силу в отношении ПРЩЖ, PPV = (29/29) 100%;
- для цитологического материала обнаружение мутаций в “горячих точках” экзона 3 гена *NRAS* (район кодона 61) имеет низкую предсказательную силу в отношении злокачественного характера опухоли, PPV = 0%;
- для плазмы крови обнаружение мутаций в “горячих точках” экзона 15 гена *BRAF* (район кодонов 600–601) показало низкую предсказательную силу в отношении ПРЩЖ, PPV = 0%;
- для плазмы крови обнаружение мутаций в “горячих точках” экзона 3 гена *NRAS* (район кодона 61) имеет низкую предсказательную силу в отношении добро-

качественного характера опухоли, PPV = (1/14) 7%.

5. Предсказательная сила мутационного теста по гистологическому материалу в отношении типа опухоли:

- для гистологического материала обнаружение мутаций в «горячих точках» экзона 15 гена *BRAF* (район кодонов 600–601) показало высокую предсказательную силу в отношении ПРЦЖ, PPV = (28/29) 96,6%;
- для гистологического материала обнаружение мутаций в «горячих точках» экзона 3 гена *NRAS* (район кодона 61) имеет низкую предсказательную силу в отношении злокачественного характера опухоли, PPV = 0%.

Обсуждение основного результата исследования

Основной задачей нашего исследования было оценить возможность использования молекулярно-генетических маркеров для дифференциальной диагностики новообразований ЩЖ на дооперационном этапе. По данным нашего исследования, мутации в «горячих точках» экзона 15 гена *BRAF* (район кодонов 600–601) в цитологическом материале показали высокую предсказательную силу в отношении ПРЦЖ. Использование данного маркера для дифференциальной диагностики опухолей ЩЖ менее 2 см низкого риска представляется целесообразным: положительный тест на мутации в «горячих точках» экзона 15 гена *BRAF* фактически подтверждает диагноз папиллярного рака ЩЖ.

Обнаружение мутаций в «горячих точках» экзона 3 гена *NRAS* (район кодона 61) в цитологическом материале показало низкую предсказательную силу в отношении злокачественного характера опухоли и более высокую предсказательную силу в отношении ФА. Таким образом, использование данного маркера для дифференциальной диагностики малых опухолей ЩЖ не показало целесообразности, так как положительный тест на мутации в «горячих точках» экзона 3 гена *NRAS* не исключает ни диагноз УКЗ, ни диагноз ПРЦЖ, хотя и чаще встречается при ФА. Можно отметить, что обнаружение *RAS*-

мутации в ЩЖ не устанавливает степень злокачественности, однако мутации *RAS* часто являются маркером фолликулярного варианта папиллярного рака, который трудно диагностировать на основании ТАБ.

Мутации в гене *BRAF* в образцах плазмы крови не были выявлены ни в одном случае, мутации в гене *NRAS* в образцах плазмы крови были выявлены только в одном случае, что показало низкую предсказательную силу в отношении ПРЦЖ для *BRAF* и низкую предсказательную силу в отношении доброкачественного характера опухоли для *NRAS*, несмотря на использование метода высокочувствительной мутационно-специфической ПЦР-РВ с одновременным подавлением амплификации аллелей «дикого типа». Полученные нами результаты соответствуют данным литературы для ПРЦЖ низкого риска. Следует учитывать, что этот вопрос у пациентов высокого риска требует дополнительных исследований: данные литературы неоднозначны в случаях опухолей большого размера и/или при метастатическом поражении.

Частота выявленных мутаций *BRAF* в нашем исследовании составила в группе ПРЦЖ 76% в цитологическом материале и 70% в гистологическом материале, что соответствует литературным данным.

Почти во всех случаях (98–99%) точечная мутация *BRAF* связана с нуклеотидом 1799 и приводит к замене валина на глутамат в 600-м кодоне V600E. Всего в 1–2% случаев *BRAF* обнаруживаются замены K601E за счет вставки или делеции в 600-м кодоне и AKAP9/ *BRAF*. Согласно полученным нами результатам, в подавляющем большинстве случаев выявлена мутация *BRAF V600E* (94,4%) и в трех случаях выявлены точечные мутации *BRAF K601E*, *T599del*, *V600D*.

Частота выявленных мутаций *NRAS* в нашем исследовании составила 10,7% в цитологическом материале, 6,8% в гистологическом материале. В нашем исследовании были выявлены наиболее часто встречающиеся варианты мутации.

При тестировании исследованной выборки не получено данных за информативность использования для дифференциальной диагностики малых опухолей щитовидной желе-

зы мутаций в “горячих точках” генов *NRAS* (экзон 2, район кодонов 12 и 13; экзон 3, район кодона 59; экзон 4, район кодонов 117 и 146); *KRAS* (экзон 2, район кодонов 12 и 13; экзон 3, район кодонов 59 и 61; экзон 4, район кодонов 117 и 146), *TERT* (транскрипт NM_198253.2, промоторная область, район позиций с.1-146 – с.1-124), *EIF1AX*.

Отсутствие выявления мутаций в генах *TERT* и *EIF1AX*, возможно, связано с характером набранных групп пациентов, включенных в исследование, поскольку в исследование исходно набирались пациенты с ПРЩЖ низкого риска, для которых не характерно агрессивное течение заболевания, с которым связывают выявление данных маркеров [10–15]. Исследование мутаций в генах *TERT* и *EIF1AX* заслуживает дальнейших исследований в группе пациентов с ПРЩЖ высокого риска.

Молекулярный профиль цитологического материала в большинстве случаев совпадает с молекулярным профилем гистологического материала. Часть случаев несовпадения молекулярного профиля цитологического и гистологического материала объясняется неоднородностью распределения материала на цитологических стеклопрепаратах. Для предотвращения такой неоднородности представляется целесообразным использование техники жидкостной цитологии. Другая часть случаев несовпадения молекулярного профиля цитологического и гистологического материала не может быть объяснена техническими и методическими артефактами и, по всей видимости, является следствием молекулярной гетерогенности опухолевых клеток. Клиническое значение подобной гетерогенности в настоящее время неизвестно. Для разрешения данной проблемы представляется целесообразным параллельное тестирование цитологического и гистологического материала и проведение проспективного наблюдательного исследования.

Ограничения исследования

Из-за небольшой выборки не представляется возможным полностью оценить клиническую значимость выявленных мутаций *NRAS* (район кодона 61). Кроме того, по-

скольку в исследование были включены только пациенты с ПРЩЖ низкого риска, то, возможно, включение пациентов с ПРЩЖ высокого риска могло бы значительно повлиять на результаты.

Заключение

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что определение мутации *BRAF* в цитологическом материале можно использовать как дополнительный маркер на дооперационном этапе для диагностики ПРЩЖ.

Не получено данных за информативность использования для дифференциальной диагностики мутаций генов *NRAS*, *KRAS*, *TERT*, *EIF1AX*. Также не получено данных за информативность использования циркулирующей ДНК плазмы крови для дифференциальной диагностики в группе ПРЩЖ низкого риска. Вопрос о потенциальной информативности данных тестов в группе пациентов с ПРЩЖ высокого риска в настоящем исследовании не ставился.

Полученные в ходе исследования результаты позволяют улучшить подходы к персонализированному ведению пациентов и дают направления для дальнейших проспективных исследований.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 14-35-00105).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Благодарности. Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам отдела молекулярной онкологии ООО “Евроген Лаб” О.В. Дрозду, Л.В. Чудаковой и Д.С. Стоклицкой за помощь в проведении исследования.

Информация о вкладе каждого автора: Качко В.А. – проведение исследования, сбор и обработка материалов, анализ полученных данных и написание текста; Зарецкий А.Р. – концепция и дизайн исследования, помощь в анализе полученных данных и написании текста; Ванушко В.Э. – концепция и дизайн исследова-

ния, помощь в анализе полученных данных и написании текста; Платонова Н.М. – помощь в анализе полученных данных и написании текста; Абросимов Ю.А. – помощь в анализе полученных данных и написании текста; Семкина Г.В. – помощь в сборе и обработке материалов. Все авторы внесли значимый вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Список литературы (References)

1. Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *J Am Soc Cytopathol.* 2017;6(6): 217-222. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jasc.2017.09.002>.
2. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016;26(1):1-133. doi: <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>.
3. Hsiao SJ, Nikiforov YE. Molecular approaches to thyroid cancer diagnosis. *Endocr Relat Cancer.* 2014;21(5):T301-313. doi: <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0166>.
4. Wei X, Li Y, Zhang S, Gao M. Meta-analysis of thyroid imaging reporting and data system in the ultrasonographic diagnosis of 10,437 thyroid nodules. *Head Neck.* 2016;38(2):309-315. doi: <https://doi.org/10.1002/hed.23878>.
5. Бельцевич Д.Г., Ванушко В.Э., Румянцев П.О. и др. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению высокодифференцированного рака щитовидной железы у взрослых, 2017 год. // Эндокринная хирургия. – 2017. – Т. 11. – №1. – С. 6-27. [Beltsevich DG, Vanushko VE, Rumyantsev PO, et al. Russian clinical practice guidelines for differentiated thyroid cancer diagnosis and treatment. *Endocrine surgery.* 2017;11(1):6-27. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.14341/serg201716-27>.
6. Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, et al. Exomic sequencing of medullary thyroid cancer reveals dominant and mutually exclusive oncogenic mutations in RET and RAS. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(2):E364-369. doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2703>.
7. Rossi M, Buratto M, Tagliati F, et al. Relevance of BRAF(V600E) mutation testing versus RAS point mutations and RET/PTC rearrangements evaluation in the diagnosis of thyroid cancer. *Thyroid.* 2015;25(2):221-228. doi: <https://doi.org/10.1089/thv.2014.0338>.
8. Seo JY, Kim EK, Kwak JY. Additional BRAF mutation analysis may have additional diagnostic value in thyroid nodules with “suspicious for malignant” cytology alone even when the nodules do not show suspicious US features. *Endocrine.* 2014;47(1):283-289. doi: <https://doi.org/10.1007/s12020-013-0150-5>.
9. Koh J, Choi JR, Han KH, et al. Proper indication of BRAF(V600E) mutation testing in fine-needle aspirates of thyroid nodules. *PLoS One.* 2013;8(5):e64505. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064505>.
10. Gandolfi G, Ragazzi M, Frasoldati A, et al. TERT promoter mutations are associated with distant metastases in papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2015;172(4):403-413. doi: <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0837>.
11. Liu X, Qu S, Liu R, et al. TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(6):E1130-1136. doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2013-4048>.
12. Liu T, Yuan X, Xu D. Cancer-Specific Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) promoter mutations: biological and clinical implications. *Genes (Basel).* 2016;7(7). doi: <https://doi.org/10.3390/genes7070038>.
13. Karunamurthy A, Panebianco F, S JH, et al. Prevalence and phenotypic correlations of EIF1AX mutations in thyroid nodules. *Endocr Relat Cancer.* 2016;23(4):295-301. doi: <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0043>.
14. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(3):184-199. doi: <https://doi.org/10.1038/nrc3431>.
15. Younis E. Oncogenesis of thyroid cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(5):1191-1199. doi: <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.5.1191>.
16. Черников Р.А., Павлова И.Е., Воробьев С.Л., и др. Прогностическая ценность BRAFV600E у пациентов с папиллярной карциномой щитовидной железы, 2014 г. // Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина. – 2014. – №2. – С. 146-153. [Chernikov RA, Pavlova IE, Vorobjev SL. Prognostic value of BRAFV600E in papillary thyroid cancer. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Seriya 11, Meditsina.* 2014;(2):146-153. (In Russ.)]
17. Cancer.sanger.ac.uk [Internet]. COSMIC v89, released 15-MAY-19 [cited 2018 Dec 12]. Available from: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.
18. Ensembl.org [Internet]. Genome browser [cited 2018 Dec 12]. Available from: <http://www.ensembl.org/index.html>.

Информация об авторах (Authors info)

***Качко Вера Александровна**, аспирант [**Vera A. Kachko**, MD]; адрес: Россия, 117036, Москва, ул. Дм. Ульянова, д. 11 [address: 11 Dm. Ulyanova street, 117036 Moscow, Russia]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0617-7312>; eLibrary SPIN: 5869-7470; e-mail: Veraf246@gmail.com

Зарецкий Андрей Ростиславович [**Andrew R. Zaretsky**, MD]; e-mail: a-zaretsky@yandex.ru

Ванушко Владимир Эдуардович, д.м.н. [**Vladimir E. Vanushko**, MD, PhD]; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6338-7490>; eLibrary SPIN: 6097-8990; e-mail: vanushko@gmail.com

Платонова Надежда Михайловна, д.м.н. [**Nadezhda M. Platonova**, MD, PhD]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6388-1544>; eLibrary SPIN: 4053-3033; e-mail: doc-platonova@inbox.ru

Абросимов Александр Юрьевич, д.м.н., профессор [**Aleksandr Yu. Abrosimov**, MD, PhD]; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8284-9996>; eLibrary SPIN: 4089-9502; e-mail: nikitarusskikh@mail.ru

Семкина Галина Викторовна, аспирант [**Galina V. Semkina**, MD]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2135-4372>; eLibrary SPIN: 3483-5837; e-mail: stefana86@mail.ru

Как цитировать

Качко В.А., Зарецкий А.Р., Ванушко В.Э., Платонова Н.М., Абросимов А.Ю., Семкина Г.В. Тестирование соматических мутаций: роль в дифференциальной диагностике новообразований щитовидной железы. // Эндокринная хирургия. – 2019. – Т. 13. – №1. – С. 26–41. doi: <https://doi.org/10.14341/serg10181>

To cite this article

Kachko VA, Zaretsky AR, Vanushko VE, Platonova NM, Abrosimov AY, Semkina GV Somatic mutation testing: the role in differential diagnosis of thyroid neoplasms. *Endocrine Surgery*. 2019;13(1):26-41. doi: <https://doi.org/10.14341/serg10181>

Рукопись получена: 16.04.2019. **Рукопись одобрена:** 27.05.2019. **Опубликована online:** 07.06.2019.

Received: 16.04.2019.

Accepted: 27.05.2019.

Published online: 07.06.2019.