

# Соматические мутации в «горячих точках» генов *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* и *TERT* при новообразованиях щитовидной железы

В.А. Качко

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия  
Veraf246@gmail.com

## Аннотация

**Обоснование.** Молекулярно-генетические маркеры, обнаружение которых может быть ассоциировано с выявлением рака щитовидной железы и/или более агрессивным течением заболевания, в том числе соматические мутации генов *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* и *TERT*, широко исследуются в настоящее время. Их применение возможно как для дифференциальной диагностики, так и для прогнозирования течения заболевания, помощи лечащему врачу в принятии решений по тактике ведения пациентов, поскольку до сих пор остается ряд спорных вопросов в ведении пациентов с высокодифференцированным раком щитовидной железы низкого риска. Разработка персонализированного подхода к диагностике и лечению пациентов с новообразованиями щитовидной железы с использованием молекулярно-генетического тестирования является современным и актуальным направлением медицины.

**Цель.** Оценка частоты встречаемости соматических мутаций в «горячих точках» генов *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* и *TERT* в гистологическом, цитологическом материале и в плазме крови пациентов с новообразованиями щитовидной железы и возможности их использования для дифференциальной диагностики.

**Методы.** Проведено проспективное, одноцентровое клиническое исследование. Образцы гистологического, цитологического материала и плазмы крови тестировали на наличие соматических мутаций в «горячих точках» генов *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* и *TERT*.

**Результаты.** В гистологическом материале мутации в «горячих точках» гена *BRAF* (экзон 15, район кодонов 600–601) были обнаружены в 35,3% случаев, в цитологическом материале – в 39,2% случаев и в свободно циркулирующей ДНК плазмы крови мутации гена *BRAF* были выявлены в 1 случае. Мутации в «горячих точках» гена *NRAS* (экзон 3, кодон 61) были обнаружены в 7,8% случаев, в цитологическом материале – в 9,5% случаев и в свободно циркулирующей ДНК плазмы крови мутации гена *NRAS* были выявлены в 1 случае; мутации в горячих точках генов *KRAS*, *TERT* и *EIF1AX* выявлены не были.

**Заключение.** Определение мутации *BRAF* в цитологическом материале можно использовать как дополнительный маркер для диагностики папиллярного рака щитовидной железы. Не получено данных об информативности и целесообразности определения на дооперационном этапе в цитологическом материале мутаций генов *NRAS*, *KRAS*, *TERT*, *EIF1AX*.

**Ключевые слова:** новообразования щитовидной железы, рак щитовидной железы, молекулярно-генетические исследования, мутации в «горячих точках» генов *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* и *TERT*.

**Для цитирования:** Качко В.А. Соматические мутации в «горячих точках» генов *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* и *TERT* при новообразованиях щитовидной железы. FOCUS Эндокринология. 2020; 2: 26–33. DOI: 10.47407/ef2020.1.2.0013

## Somatic mutations in the "hot spots" of the *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* and *TERT* genes in thyroid neoplasms

Vera A. Kachko

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia  
Veraf246@gmail.com

## Abstract

**Background.** Molecular genetic markers that may be associated with the detection of thyroid cancer and/or a more aggressive course of the disease, including somatic mutations of the *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* and *TERT* genes, are currently being widely studied. Their use is possible both for differential diagnosis and for predicting the course of the disease, to help the attending physician in making decisions on patient management tactics, since there are still a number of controversial issues in the management of patients with highly differentiated low-risk thyroid cancer. The development of a personalized approach to the diagnosis and treatment of patients with thyroid neoplasms using molecular genetic testing is a modern and relevant area of medicine.

**Aims.** Evaluation of the frequency of somatic mutations in the "hot spots" of the *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* and *TERT* genes in histological, cytological material and in the blood plasma of patients with thyroid neoplasms and the possibility of their use for differential diagnosis.

**Materials and methods.** A prospective, single-center clinical trial was performed. Histological, cytological, and plasma samples were tested for somatic mutations in the "hot spots" of the *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* and *TERT* genes.

**Results.** In histological material, mutations in the "hot spots" of the *BRAF* gene (exon 15, codon region 600–601) were detected in 35.3% of cases, in cytological material in 39.2% of cases, and in freely circulating blood plasma DNA, *BRAF* gene mutations were detected in 1 case. Mutations in "hot spots" of the gene *NRAS* (exon 3, codon 61) were detected in 7.8% of cases, cytological material in 9.5% of cases and in free-circulating DNA in the blood plasma *NRAS* gene mutation was identified in 1 case; mutations in the hotspots of *KRAS*, *EIF1AX* and *TERT* genes were not identified.

**Conclusions.** Evaluation of the mutation in *BRAF* gene in the cytological material can be used as an additional marker for the diagnosis of papillary thyroid cancer. No data were obtained for the informativeness and expediency of evaluation of the mutations in *NRAS*, *KRAS*, *TERT*, and *EIF1AX* genes in the cytological material at the preoperative stage.

**Key words:** thyroid neoplasms; differentiated thyroid cancer; molecular testing; somatic mutations in hot spots of the genes *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *TERT*, and *EIF1AX*.

**For citation:** Kachko V.A. Somatic mutations in the "hot spots" of the *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* and *TERT* genes in thyroid neoplasms. *FOCUS Endocrinology*. 2020; 2: 26–33. DOI: 10.47407/ef2020.1.2.0013

## Обоснование

Актуальность исследования определяется в первую очередь ростом выявляемости и распространенности новообразований щитовидной железы (ЩЖ) [1]. Стандартным методом дооперационной диагностики рака щитовидной железы (РЩЖ) является прицельная тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) с цитологическим исследованием. Однако данный метод имеет ряд ограничений при дифференциальной диагностике фолликулярных опухолей, отнесенных к диагностической категории III–V по классификации Bethesda [2]. РЩЖ – самая частая злокачественная опухоль эндокринной системы. Как и любая злокачественная опухоль, РЩЖ является опасным для жизни заболеванием, которое потенциально может привести к гибели больного [3]. Если заболевание диагностировано своевременно, правильно выполнено хирургическое лечение и послеоперационное ведение пациентов – прогноз благоприятный. Это, в свою очередь, требует наличия четких и обоснованных клиническим опытом рекомендаций по диагностике и лечению новообразований ЩЖ. И одним из перспективных методов является молекулярно-генетическое тестирование, но в настоящий момент отсутствуют четкие показания для его проведения, в связи с отсутствием данных долгосрочного наблюдения за пациентами, у которых выявление/отсутствие мутаций привело к изменению врачебной тактики [2, 4, 5]. Целью нашего исследования стала разработка персонализированного подхода к диагностике и лечению пациентов с новообразова-

ниями ЩЖ с использованием молекулярно-генетического тестирования посредством оценки панели соматических мутаций в горячих точках генов *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX*, *TERT*, поскольку их обнаружение ассоциировано с РЩЖ и с более агрессивным течением заболевания.

## Методы

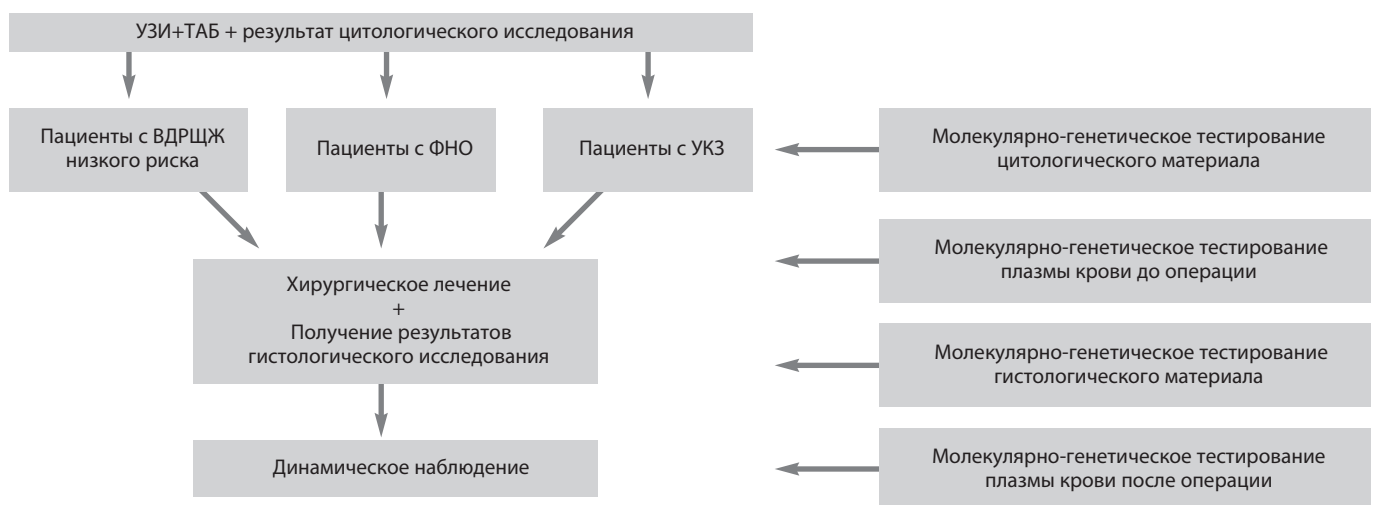
**Дизайн.** Проведено проспективное одноцентровое клиническое исследование, схема представлена на рис 1.

**Критерии соответствия.** Критерии включения: пациенты обоих полов, возрастом старше 18 лет на основании цитологического заключения. Для цитологического заключения «высокодифференцированный рак щитовидной железы» (ВДРЩЖ) – размер новообразования ЩЖ менее 2 см, отсутствие признаков метастазирования или экстратиреоидного распространения по данным ультразвукового исследования (УЗИ) ЩЖ, что соответствовало стадии T1 низкого риска (по версии TNM 2009 г.). Для цитологического заключения «новообразования щитовидной железы» (НОЩЖ) – размер образования менее 2 см. Для цитологического заключения «узловой коллоидный зоб» (УКЗ) – показание для операции, которыми были наличие синдрома компрессии органов шеи или косметический дефект.

Критериями исключения для всех групп были: некомпенсированный тиреотоксикоз, проведенная ранее операция на ЩЖ, отягощенный анамнез по наследственным и семейным формам заболеваний ЩЖ, повышенный уровень кальцитонина.

Рис. 1. Схема исследования.

Fig. 1. Study design.



Примечание. Здесь и далее на рисунках и таблицах: ВДРЩЖ – высокодифференцированный РЩЖ, УКЗ – узловой коллоидный зоб, ФНО или НОЩЖ – фолликулярные новообразования, отнесенные к диагностической категории III–V по классификации Bethesda, ФА – фолликулярная аденома.

**Условия проведения и продолжительность.** В исследование включали пациентов, находившихся на лечении в хирургическом отделении ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. Набор пациентов в группы продолжался в течение трех лет – с 2012 по 2014 г.

**Описание медицинского вмешательства.** Все пациенты до включения в исследование получали «Информацию для пациента и информированное согласие для участия в клиническом исследовании». Участие было добровольным. Всем пациентам, включенным в исследование, проводили лабораторно-инструментальный комплекс для подготовки, проведения и послеоперационного наблюдения, все были прооперированы и всем проводили молекулярно-генетическое исследование гистологического материала, части пациентов – цитологического материала и плазмы крови.

Секвенирование по Сэнгеру проводили в специализированной лаборатории ЗАО «Евроген Ру» 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.

В гистологическом и цитологическом материале поиск мутаций в «горячих точках» генов *BRAF* (экзон 15) и *NRAS* (экзон 3, район кодона 61) в ДНК образцов проводили методом мутационно-специфической полимеразной цепной реакции (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) 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 проводили методом ПЦР с последующим секвенированием 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 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*.

Для выделения циркулирующей ДНК производили забор периферической крови за день до и на 3–5-е 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, РФ) в соответствии с инструкцией производителя.

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 «Супер-Инсайдер» (ООО «Евроген Лаб», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

**Этическая экспертиза.** Протокол исследования был одобрен Межвузовским Комитетом по Этике. Выписка из протокола №02-12 Межвузовского комитета по Этике от 16.02.2012.

## Результаты

**Определение частоты встречаемости соматических мутаций в «горячих точках» генов *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* и *TERT* в гистологическом материале (n=153)** [6]. В исследование включены 153 пациента. Все группы были сопоставимы по полу, возрасту, уровню тиреотропного гормона (табл. 1). В исследовании, согласно цитологическим заключениям, группа НОЩЖ была представлена 58 пациентами, после получения результатов гистологического исследования она распределилась на УКЗ – 8 случаев, фолликулярная аденома (ФА) – 30 случаев и ВДРЩЖ – 20 случаев (рис. 2).

Частота обнаружения мутации *BRAF* в общей когорте составила 35,3% (табл. 2), а в группе ВДРЩЖ – 59%. Мутации *BRAF* в гистологическом материале обнаружены в 54 случаях из 153, в том числе наиболее распространенная мутация *V600E* – у 51 пациента; и еще 3 более редкие мутации. Чувствительность теста составила 58,9%, спе-

Таблица 1. Характеристика пациентов (n=153)  
Table 1. Patient profiles (n=153)

Показатель	УКЗ (n=24)	НОЩЖ (n=58)	ВДРЩЖ (n=71)	Значимость
Возраст, лет	41 [29; 58,2]	46 [36; 59]	51,5 [40,5; 58]	p=0,262
Пол (муж./жен.)	4/20	7/51	11/60	p=0,809

Рис. 2. Когорты для определения частоты встречаемости соматических мутаций в «горячих точках» генов *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* и *TERT* в гистологическом материале (n=153), а – цитологический материал, б – гистологический материал.

Fig. 2. Cohorts for assessment of somatic *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* and *TERT* hotspot mutations frequency in histology specimens (n=153), a – cytology specimen b – histology specimen.

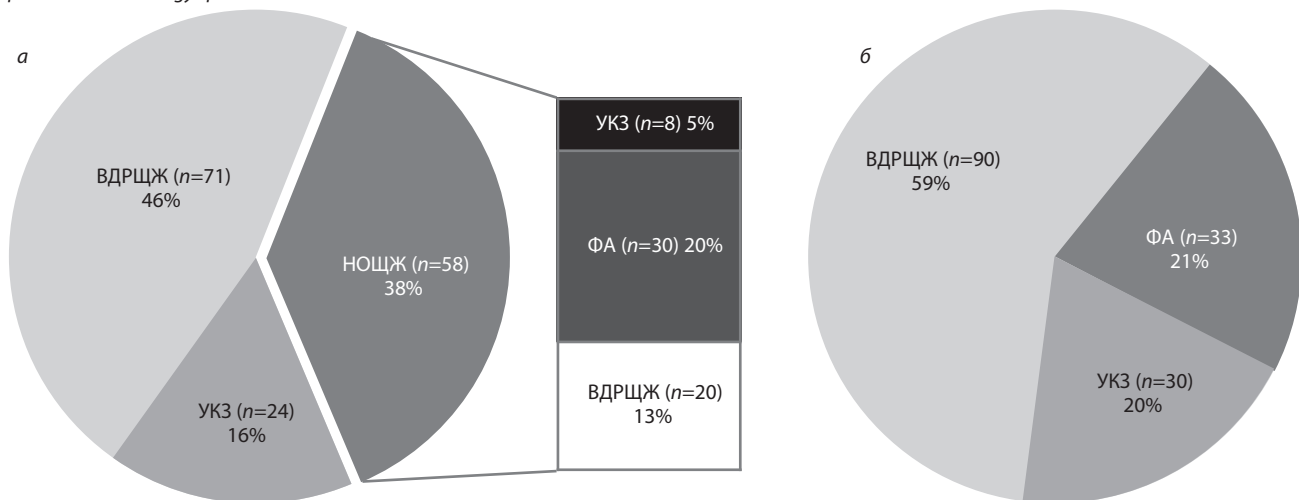


Таблица 2. Результаты определения частоты встречаемости соматических мутаций в «горячих точках» генов *BRAF* в гистологическом материале (n=153)

Table 2. Somatic *BRAF* hotspot mutations frequency in histology specimens (n=153)

Вариант мутации	Мутации в гистологическом материале (n=153), n <i>BRAF</i> + =54 (35,3%)		
	УКЗ (n=30)	ФА (n=33)	ВДРЩЖ (n=90)
Нет мутации	29	33	37
c.1799T>A, p.(Val600Glu, V600E)	1	-	50
c.1799_1800TG>AT, p.(Val600Asp, V600D)	-	-	1
c.1801A>G, p.(Lys601Glu, K601E)	-	-	1
c.1794_1796delTAC, p.(Thr599del, T599del)	-	-	1

Таблица 3. Результаты определения частоты встречаемости соматических мутаций в «горячих точках» генов *NRAS* в гистологическом материале (n=153)

Table 3. Somatic *NRAS* hotspot mutations frequency in histology specimens (n=153)

Вариант мутации	Мутации в гистологическом материале (n=153), n <i>NRAS</i> + =12 (7,8%)		
	УКЗ (n=30)	ФА (n=33)	ВДРЩЖ (n=90)
Нет мутации (дикий тип)	28	27	86
c.182A>G, p.(Gln61Arg, Q61R)	2	5	4
c.181C>A, p.(Gln61Lys, Q61K)	-	1	-

Таблица 4. Характеристика пациентов (n=74)

Table 4. Patient profiles (n=74)

Показатель	УКЗ	НОЩЖ	ВДРЩЖ	Значимость
Возраст, лет	34 [28,5; 55]	51 [34; 59]	52 [46; 59,5]	p=0,048
Пол (муж./жен.)	3/14	3/26	2/27	p=0,521

цифичность – 98,4%, точность – 75,2%, PPV в отношении злокачественного характера опухоли – 65,6% и NPV в отношении доброкачественного характера опухоли – 94,9%.

По результатам гистологического исследования операционного материала у 53 пациентов с мутациями в гене *BRAF* был выявлен папиллярный РЩЖ (ПРЩЖ) и в 1 случае выявлен УКЗ.

Выявление мутации в гене *BRAF* у пациента с УКЗ является уникальным, не вполне обычным сочетанием клинических и молекулярных параметров. В литературе

подобные данные не описаны. В нашем исследовании данный факт не может быть объяснен техническими и методическими артефактами. Весьма вероятно, что у данного пациента имела место папиллярная микрокарцинома, которая не вошла в срез гистологического стеклопрепарата.

Мутации *NRAS* в гистологическом материале обнаружены в 12 случаях (табл. 3). Частота обнаружения мутации *NRAS* в общей когорте составила 7,8%. Обе мутации являются наиболее распространенными. Чувствительность теста составила 4,4%, специфичность – 39,0%,

Рис. 3. Когорты для определения частоты встречаемости соматических мутаций в «горячих точках» генов *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* и *TERT* в цитологическом материале (n=74); а – цитологический материал, б – гистологический материал.  
 Fig. 3. Cohorts for assessment of somatic *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* and *TERT* hotspot mutations frequency in cytology specimens (n=74); a – cytology specimen, b – histology specimen.

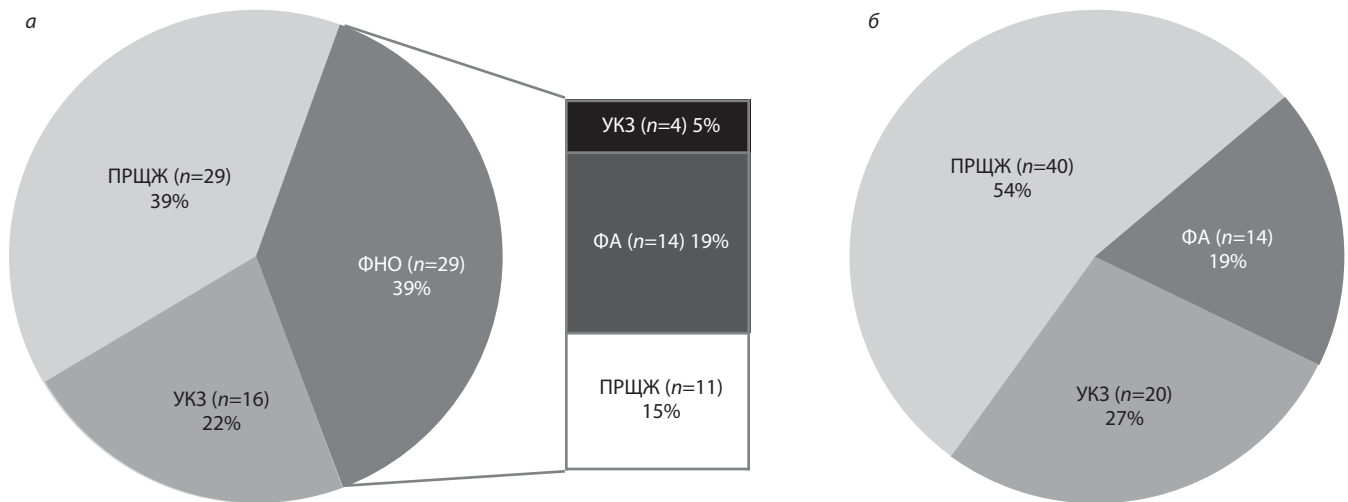


Таблица 5. Результаты определения частоты встречаемости соматических мутаций в «горячих точках» генов *BRAF* в цитологическом материале (n=74)  
 Table 5. Somatic *BRAF* hotspot mutations frequency in cytology specimens (n=74)

Вариант мутации	Мутации в цитологическом материале (n=74), n <i>BRAF</i> + = 29 (39,2%)		
	УКЗ (n=16)	ФНО (n=29)	ВДРЩЖ (n=29)
Нет мутации	16	22	7
c.1799T>A, p.(Val600Glu, V600E)	–	5	22
c.1799_1800TG>AT, p.(Val600Asp, V600D)	–	1	–
c.1794_1796delTAC, p.(Thr599del, T599del)	–	1	–

Таблица 6. Результаты определения частоты встречаемости соматических мутаций в «горячих точках» генов *BRAF* в группе ФНО (n=29)  
 Table 6. Somatic *BRAF* hotspot mutations frequency in the TNF group (n=29)

Вариант мутации	Мутации в цитологическом материале в группе ФНО (n=29), n <i>BRAF</i> + = 7 (24,1%)
Нет мутации	22
c.1799T>A, p.(Val600Glu, V600E)	5
c.1799_1800TG>AT, p.(Val600Asp, V600D)	1
c.1794_1796delTAC, p.(Thr599del, T599del)	1

Таблица 7. Результаты определения частоты встречаемости соматических мутаций в «горячих точках» генов *NRAS* в цитологическом материале (n=74)  
 Table 7. Somatic *NRAS* hotspot mutations frequency in cytology specimens (n=74)

Вариант мутации	Мутации в гистологическом материале (n=74), n <i>NRAS</i> + = 7 (9,5%)		
	УКЗ (n=16)	ФНО (n=29)	ВДРЩЖ (n=29)
Нет мутации	14	24	29
c.182A>G, p.(Gln61Arg, Q61R)	1	4	–
c.181C>A, p.(Gln61Lys, Q61K)	1	1	–

точность – 38,6%, PPV в отношении злокачественного характера опухоли – 0,38% и NPV в отношении доброкачественного характера опухоли – 88,1%.

По результатам гистологического исследования операционного материала злокачественные опухоли ЩЖ, а именно ПРЩЖ, были обнаружены у 4 пациентов с мутациями в гене *NRAS*, ФА – у 6 и УКЗ – у 2 пациентов.

Мутации в других «горячих точках» гена *NRAS*, а также в генах *KRAS*, *EIF1AX*, *TERT* не обнаружены ни в одном образце.

**Определение частоты встречаемости соматических мутаций в «горячих точках» генов *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* и *TERT* в цитологическом материале (n=74) [7].** В исследование включили 74 пациента. Все группы были

сопоставимы по полу, уровню тиреотропного гормона, несколько моложе были пациенты группы контроля с УКЗ (табл. 4).

В исследовании, согласно цитологическим заключениям, группа с фолликулярными новообразованиями (ФНО) была представлена 29 пациентами, после получения результатов гистологического исследования: УКЗ – 4 случая, ФА – 14 случаев и ПРЦЖ – 11 случаев (рис. 3).

Мутации *BRAF* в цитологическом материале обнаружены в 29 случаях из 74 (табл. 5), в том числе наиболее распространенная мутация *V600E* – у 27 пациентов; и еще 2 более редкие мутации. По результатам гистологического исследования операционного материала у всех 29 пациентов с мутациями в гене *BRAF* был выявлен ПРЦЖ. Чувствительность теста составила 72,5%, специфичность – 100%, точность теста – 85,0%. С учетом распространенности РЦЖ в популяции, прогностическая ценность мутационного теста, выполняемого на цитологическом материале, в отношении злокачественного характера опухоли составила PPV=100%. А прогностическая значимость отрицательного результата этого теста в отношении доброкачественного характера опухоли NPV=95%.

Для группы фолликулярных опухолей мутация в гене *BRAF* была выявлена в 7 случаях из 29 (табл. 6). По результатам гистологического исследования операционного материала у всех 7 пациентов *BRAF*+ был подтвержден ПРЦЖ. Чувствительность, специфичность и точность теста для группы ФНО были достаточно высокими и составили 64%, 100% и 86% соответственно. Обнаружение мутации в «горячих точках» экзона 15 гена *BRAF* (район кодонов 600–601) показало высокую предсказательную силу в отношении злокачественного характера опухоли (PPV=100%). Отсутствие мутаций показало высокую предсказательную силу в отношении доброкачественного характера опухоли (с учетом распространенности РЦЖ в группе ФНО 10–15%) NPV=96,0–93,9%.

Мутации *NRAS* в цитологическом материале обнаружены в 7 случаях (табл. 7). Обе мутации являются наиболее распространенными. По результатам гистологического исследования операционного материала злокачественные опухоли ЩЖ не были обнаружены ни у одного из 7 пациентов с мутациями в гене *NRAS* (в 4 случаях был выявлен УКЗ, в 3 – ФА). Таким образом, чувствительность, специфичность, точность теста были достаточно низкими и составили 0%, 79,4%, 36,5% соответственно.

С учетом распространенности РЦЖ в популяции прогностическая ценность мутационного теста, выполняемого на цитологическом 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=93,8%.

Мутации в других «горячих точках» гена *NRAS*, а также в генах *KRAS*, *EIF1AX*, *TERT* не обнаружены ни в одном образце.

**Определение частоты встречаемости соматических мутаций в «горячих точках» генов *BRAF* и *NRAS* в плазме крови (n=66) [8].** В исследование были включены

66 пациентов, у всех пациентов, по данным молекулярного тестирования гистологического материала, была выявлена мутация *BRAF* (n=54) или *NRAS* (n=12).

Мутация *BRAF* с.1799T>A, p.(Val600Glu, V600E) обнаружена в 1 случае в плазме крови до операции. PPV *BRAF* в отношении злокачественного характера опухоли составила PPV 1,8%. По результатам гистологического исследования операционного материала у этого пациента с мутацией в гене *BRAF* был выявлен ПРЦЖ.

Мутация *NRAS* с.182A>G, p.(Gln61Arg, Q61R) не обнаружена ни в одном образце. Мутация *NRAS* с.181C>A, p.(Gln61Lys, Q61K) обнаружена в 1 случае в плазме крови пациента как до, так и после операции. PPV *NRAS* в отношении доброкачественного характера опухоли NPV – 8,3%. По результатам гистологического исследования операционного материала был выявлен УКЗ.

### Обсуждение

Молекулярно-генетические исследования, выбранные для анализа в нашем исследовании, были представлены наиболее изученными мутациями.

Точечные мутации *BRAF* выявляются в 30–70% случаев ПРЦЖ. И данная мутация практически не выявляется при доброкачественных новообразованиях. Наиболее частый вариант мутации в гене *BRAF* – это мутация *BRAF* V600E (p.Val600Glu или V600E). Реже встречающиеся мутации в гене *BRAF* – это мутации Glu586Lys, Val600Asp, Val600Lys, Val600Arg, Lys601Glu и др. [9–12].

Мутации семейства *RAS* (H, N, K) – выявляют и в доброкачественных и в злокачественных новообразованиях. Обнаружение *RAS* мутации в ЩЖ не устанавливает степень злокачественности, однако часто является маркером фолликулярного варианта папиллярного рака, который наиболее трудно диагностируется при ТАБ. Чаше мутации *RAS* локализируются в экзоне 3 (кодоны 59 и 61), реже в экзоне 2 (кодоны 12 и 13) или в экзоне 4 (кодоны 117 и 146) [9, 10]. Мутация в экзоне 3 кодона 61 *NRAS* – это вторая по частоте распространенности точечная мутация, после мутации *BRAF* V600E с частотой встречаемости 8,5%, выявлялась в фолликулярных опухолях в четыре раза чаще, чем при ПРЦЖ [13].

По результатам нашего исследования частота встречаемости в гистологическом материале мутаций в «горячих точках» генов *BRAF* и *NRAS* в набранной группе соответствует данным литературы. По данным исследований, от 15 до 39% образцов с неясной цитологической картиной ТАБ оказываются *BRAF*-позитивными. Соответственно, полученные нами результаты также подтверждаются данными литературы. Наше исследование показало, что для дифференциальной диагностики опухолей ЩЖ достаточно изучения мутации в гене *BRAF*, которая была выявлена в 24% ФНО. Во всех этих наблюдениях был подтвержден РЦЖ. Молекулярное тестирование на *BRAF* V600E ЩЖ при ТАБ образцов значительно улучшает точность цитологической диагностики новообразований ЩЖ, и определение мутации *BRAF* в цитологическом материале можно использовать как дополнительный маркер для диагностики ПРЦЖ.

Мутации *TERT* имеют высокую специфичность, они не были найдены при доброкачественных узловых образованиях, были выявлены только при злокачественных новообразованиях и во всех исследованиях показали связь с более агрессивным течением и неблагоприятным прогнозом. Наиболее часто встречающейся мутацией *TERT* является C228T, реже C250T [14, 15].

Мутации *EIF1AX* выявляют и в доброкачественных, и в злокачественных новообразованиях. Однако именно в сочетании с мутациями семейства *RAS* с высокой вероятностью говорят о злокачественном процессе, и показали связь с более агрессивным течением РЩЖ и неблагоприятным прогнозом. Наиболее часто мутации *EIF1AX* встречаются во 2, 5 и 6 экзонах [16].

Отсутствие выявления генов *KRAS*, *EIF1AX* и *TERT* в гистологическом материале, возможно, указывает на благоприятный прогноз пациентов набранной группы, поскольку данные гены или их комбинации чаще определяют при более агрессивном течении заболевания.

По результатам нашего исследования, не было получено данных за дополнительную информативность использования на дооперационном этапе в цитологическом материале мутаций генов *NRAS*, *KRAS*, *TERT*, *EIF1AX*, а использование всей молекулярно-генетической панели не показало преимуществ перед изолированным определением мутации в гене *BRAF*. Из этого можно заключить, что применение молекулярно-генетических панелей у пациентов ФНО не совсем оправдано, так как малоинформативно и обладает большой стоимостью. Данный подход позволит значительно снизить стоимость предоперационного молекулярно-генетического тестирования пациентов с ФНО при его относительно высоких показателях чувствительности и специфичности.

По полученным нами данным, частота встречаемости мутаций в свободно циркулирующей ДНК плазмы крови при новообразованиях ЩЖ крайне мала и имеет низкую предсказательную силу как в отношении доброкачественного, так и злокачественного характера опухоли, в связи с чем использование свободно циркулирующей ДНК плазмы крови при тестировании исследованной выборки не показало целесообразности для диагностики в группе ВДРЩЖ низкого риска.

## Литература / References

1. Brito JP, Yarus AJ, Prokop LJ et al. Prevalence of Thyroid Cancer in Multinodular Goiter vs. Single Nodule: A Systematic Review and Meta-analysis. *Thyroid* 2013; 23 (4): 449–55. DOI: 10.1089/thy.2012.0156
2. 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; 11 (1): 6–27. DOI: 10.14341/serg201716-27. [Beltsevich D.G., Vanushko V.E., Rumyantsev P.O. et al. 2017 Russian clinical practice guidelines for differentiated thyroid cancer diagnosis and treatment. *Endocrine Surgery*. 2017; 11 (1): 6–27. DOI: 10.14341/serg201716-27 (in Russian).]
3. Goodarzi E, Moslem A, Feizhadad H et al. Epidemiology, Incidence and Mortality of Thyroid Cancer and their Relationship with the Human Development Index in the World: An Ecology Study in 2018. *Adv Hum Biol* 2019; 9: 162–7.
4. 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: 1–133. DOI: 10.1089/thy.2015.0020
5. Hsiao SJ, Nikiforov YE. Molecular Approaches to Thyroid Cancer Diagnosis. *Endocr Relat Cancer* 2014; 21 (5): T301–T313. DOI: 10.1530/ERC-14-0166
6. Качко В.А., Ванушко В.Э., Платонова Н.М. и др. Соматические мутации в генах *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* и *TERT*: диагностическая значимость при новообразованиях щитовидной железы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020; 169 (5): 600–3. [Kachko V.A., Vanushko V.E., Platonova N.M. et al. Somaticheskie mutatsii v genakh *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* i *TERT*: diagnosticheskaja znachimost' pri novoobrazovaniiah shchitovidnoi zhelezy. *Biulleten'*

## Ограничения исследования

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

## Заключение

Выявление мутаций в «горячих точках» гена *BRAF* позволяет поставить на дооперационном этапе диагноз папиллярного РЩЖ у пациентов с цитологическим заключением III–V категории (Bethesda Thyroid Classification, 2009, 2017), поэтому определение мутации *BRAF* в цитологическом материале можно использовать как дополнительный маркер для диагностики папиллярного РЩЖ. Использование всей молекулярно-генетической панели (*BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EIF1AX* и *TERT*) не показало преимуществ перед изолированным определением мутации в гене *BRAF*. Полученные в ходе исследования результаты позволяют улучшить подходы к персонализированному ведению пациентов и дают направления для дальнейших проспективных исследований.

## Источник финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке Гранта Российского научного фонда (РНФ): проект №14-35-00105 «Комплексное исследование молекулярной эволюции злокачественных опухолей для разработки персонализированных подходов к ведению онкологических больных».

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests.** The author declares that there is not conflict of interests.

## Благодарности

Автор выражает благодарность сотрудникам ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России В.Э. Ванушко, Н.М. Платоновой, а также сотрудникам отдела молекулярной онкологии ООО «Евроген Лаб» А.Р. Зарецкому, О.В. Дрозду, Л.В. Чудаковой и Д.С. Стоклицкой за помощь в проведении исследования.

## Информация о вкладе автора

В.А. Качко – проведение исследования, сбор и обработка материалов, анализ полученных данных и написание текста.

- eksperimental'noi biologii i meditsiny. 2020; 169 (5): 600–3 (in Russian).]
7. Качко В.А., Зарецкий А.Р., Ванушко В.Э. и др. Тестирование соматических мутаций: роль в дифференциальной диагностике новообразований щитовидной железы. *Эндокринная хирургия*. 2019; 13 (1): 26–41. [Kachko V.A., Zaretskii A.R., Vanushko V.E. et al. Testirovanie somaticheskikh mutatsii: rol' v differentsial'noi diagnostike novoobrazovaniy shchitovidnoi zhelezy. *Endokrinnaiia khirurgiia*. 2019; 13 (1): 26–41 (in Russian).]
  8. Качко В.А., Зарецкий А.Р., Ванушко В.Э. и др. Тестирование соматических мутаций: роль в дифференциальной диагностике новообразований щитовидной железы. *Эндокринная хирургия* 2019; 13 (1): 5–19. DOI: <https://doi.org/10.14341/serg10181> [Kachko V.A., Zaretskii A.R., Vanushko V.E. et al. Testirovanie somaticheskikh mutatsii: rol' v differentsial'noi diagnostike novoobrazovaniy shchitovidnoi zhelezy. *Endokrinnaiia khirurgiia* 2019; 13 (1): 5–19. DOI: <https://doi.org/10.14341/serg10181> (in Russian).]
  9. Luzón-Toro B, Fernández RM, Villalba-Benito L et al. Influencers on Thyroid Cancer Onset: Molecular Genetic Basis. *Genes (Basel)* 2019, 10 (11): 913. DOI: 10.3390/genes10110913
  10. Tirrò E, Martorana F, Romano C et al. Molecular Alterations in Thyroid Cancer: From Bench to Clinical Practice. *Genes (Basel)* 2019; 10 (9): 709. DOI: 10.3390/genes10090709
  11. Tufano RP, Teixeira GV, Bishop J et al. BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis. *Med (Baltimore)* 2012; 91: 274–86.
  12. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *Jama* 2013; 309: 1493–501.
  13. Howell GM, Hodak SP, Yip L. RAS mutations in thyroid cancer. *Oncologist* 2013; 18 (8): 926–32.
  14. Liu R, Xing M. TERT Promoter Mutations in Thyroid Cancer. *Endocr Relat Cancer* 2016; 23 (3): R143–R155. DOI: 10.1530/ERC-15-0533
  15. Jin A, Xu J, Wang Y. The role of TERT promoter mutations in postoperative and preoperative diagnosis and prognosis in thyroid cancer. *Med (Baltimore)* 2018; 97 (29): e11548. DOI: 10.1097/MD.00000000000011548
  16. Karunamurthy A, Panebianco F, J Hsiao S et al. Prevalence and phenotypic correlations of EIF1AX mutations in thyroid nodules. *Endocr Relat Cancer* 2016; 23 (4): 295–301. DOI: 10.1530/ERC-16-0043
  17. COSMIC [Internet]. Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer [cited 2018 Dec 12]. Available from: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
  18. Ensembl [Internet]. Genome browser [cited 2018 Dec 12]. Available from: <http://www.ensembl.org>

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ / Information about the author

**Качко Вера Александровна** – канд., мед. наук, аспирант, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова». E-mail: Veraf246@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0617-7312>; eLibrary SPIN: 5869-7470

**Vera A. Kachko** – Cand. Sci. (Med.), Pirogov Russian National Research Medical University. E-mail: Veraf246@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0617-7312>; eLibrary SPIN: 5869-7470

Статья поступила в редакцию / The article received: 13.11.2020

Статья принята к печати / The article approved for publication: 14.12.2020