

Распространенность известных и предполагаемых маркерных мутаций при доброкачественных и злокачественных новообразованиях щитовидной железы

Якушина В.Д.¹, Авдеева Т.Ф.², Казубская Т.П.^{3,4}, Кондратьева Т.Т.^{3,4}, Лернер Л.В.⁴, Лавров А.В.¹

1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1,

2 — ГБУЗ «Городская клиническая больница имени В.М. Буянова Департамента Здравоохранения города Москвы»
115516, г. Москва, ул. Бакинская, 26

3 — ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» МЗ РФ
115478, г. Москва, Каширское ш., д. 24

4 — ООО «ПреМед», Москва, Российская Федерация
119313, г. Москва, Ленинский пр., д. 95, оф. 79

Недостаточная точность дооперационной дифференциальной диагностики путём цитологического исследования материала, полученного при тонкоигольной аспирационной биопсии, и низкая доля случаев злокачественных новообразований, описываемых молекулярно-генетическими маркерами с известной диагностической значимостью, обуславливают актуальность поиска новых молекулярно-генетических маркеров и необходимость оценки их ассоциации с риском рака и клинико-морфологическими характеристиками. Целью работы явилось исследование распространенности расширенного спектра известных и новых предполагаемых драйверных и вторичных мутаций в доброкачественных и злокачественных новообразованиях щитовидной железы. Материал исследования: свежемороженый хирургический материал злокачественных (64 образца) и доброкачественных (16 образцов) новообразований щитовидной железы. Для поиска точечных вариантов, коротких инсерций/делеций, изменений копийности выполнено таргетное высокопроизводительное секвенирование ДНК по технологии AmpliSeq на платформе NextSeq 550 (Illumina). Поиск перестроек выполнен по наличию транскрипта методом таргетного высокопроизводительного секвенирования по технологии AmpliSeq на платформе MiSeq (Illumina). Мутации в генах *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *HRAS* выявлены в 62% случаев рака. В 12% случаев рака выявлены перестройки *CCDC6-RET* (3 случая) и *PAX8-PPARG* (2 случая), *TPM3-NTRK1*, *ETV6-NTRK3*, *STRN-ALK* – по одному случаю. Во всех случаях выявленные перестройки были взаимоисключающие с другими известными драйверными мутациями. При доброкачественных новообразованиях перестройки не выявлены. Мутации промотора гена *TERT* выявлены в 10% случаев рака щитовидной железы и были представлены совместно с известными драйверными мутациями. Известная миссенс мутация *EIF1AX* выявлена в одном случае доброкачественного новообразования, при злокачественных новообразованиях мутации в гене *EIF1AX* не выявлены. Предполагаемые драйверные мутации в онкогенах *PPM1D*, *PDGFRA*, *KDR* выявлены в образцах рака щитовидной железы и не выявлены при доброкачественных новообразованиях щитовидной железы. Выводы: дана характеристика распространенности драйверных мутаций с известной диагностической значимостью и мутаций в генах, описанных в литературе без установленной диагностической значимости, при доброкачественных и злокачественных новообразованиях щитовидной железы.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, мутации, перестройки, таргетное высокопроизводительное секвенирование, дифференциальная диагностика.

Для цитирования: Якушина В.Д., Авдеева Т.Ф., Казубская Т.П., Кондратьева Т.Т., Лернер Л.В., Лавров А.В. Распространенность известных и предполагаемых маркерных мутаций при доброкачественных и злокачественных новообразованиях щитовидной железы. *Медицинская генетика* 2021; 20(5): 48-54

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.05.48-54

Автор для корреспонденции: Якушина Валентина Дмитриевна; e-mail: vdyakushina@gmail.com

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-75-00053) и ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» (442ГЦ2/9119 СЗ-40846).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 23.05.2021

Prevalence of well-characterized and putative marker mutations in benign and malignant thyroid neoplasms

Yakushina V.D.¹, Avdeeva T.F.², Kazubskaya T.P.³, Kondrat'eva T.T.⁴, Lerner L.V.², Lavrov A.V.¹

1 — Research Centre for Medical Genetics

Moskvorechye str.1, Moscow, 115522, Russian Federation

2 — Moscow City Clinical Hospital after V.M. Buyanov

Bakinskaya Str. 26,, Moscow, 115516; Russian Federation

3 — N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation

Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115478, Russian Federation

4 — PreMed-European Technologies

Leninsky ave. 93, Moscow, 119313, Russian Federation

Insufficient accuracy of preoperative differential diagnostics by cytological examination of fine-needle aspiration biopsy material and low proportion of cases of malignant neoplasms described by molecular genetic markers with known diagnostic significance determine the relevance of the search for new molecular genetic markers with an assessment of their association with cancer risk and clinical and morphological characteristics. The aim of the work was to study the prevalence of an expanded spectrum of known and new putative driver and secondary mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. Material: fresh frozen surgical material of malignant (64 samples) and benign (16 samples) thyroid neoplasms. Methods: search for point variants, short insertions/deletions, and copy number variations was performed via targeted high-throughput sequencing using AmpliSeq technology on the Illumina NextSeq platform. Fusions were by the presence of fused transcript by targeted high-throughput sequencing using AmpliSeq technology on the Illumina MiSeq platform. Results: mutations in genes *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *HRAS* were detected in 62% of cancer cases. In 12% of cancers we detected rearrangements of *CCDC6-RET* (3 cases) and *PAX8-PPARG* (2 cases), *TPM3-NTRK1*, *ETV6-NTRK3*, *STRN-ALK* - one case each. In all cases, the identified rearrangements were mutually exclusive with other known driver mutations. In benign neoplasms, no rearrangements were found. Mutations in the *TERT* gene promoter have been identified in 10% of thyroid cancers and have been associated with known driver mutations. The well-known missense mutation *EIF1AX* was detected in one case of a benign neoplasm of the thyroid gland; in malignant neoplasms, no *EIF1AX* mutation were detected. Putative driver mutations in the *PPM1D*, *PDGFRA*, *KDR* oncogenes were detected in thyroid cancer samples and were not detected in benign thyroid neoplasms. Conclusions: the work characterizes the prevalence of driver mutations with a known diagnostic significance and mutations in genes described in the literature without a known diagnostic significance in benign and malignant thyroid neoplasms.

Keywords: thyroid cancer, mutations, rearrangements, targeted high-throughput sequencing, differential diagnostics

For citation: Yakushina V.D., Avdeeva T.F., Kazubskaya T.P., Kondrat'eva T.T., Lerner L.V., Lavrov A.V. Prevalence of well-characterized and putative marker mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. *Meditinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(5): 48-54. (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.05.48-54

Corresponding author. Yakushina Valentina; e-mail: vdyakushina@gmail.com

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation grant (project No. 19-75-00053) and the Fund for Assistance to the Development of Small Forms of Enterprises in the Scientific and Technical Sphere (442GS2/9119 C3-40846).

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Accepted: 23.05.2021

Рак щитовидной железы (РЩЖ) лидирует по частоте среди злокачественных новообразований эндокринной системы [1], при этом карциномы составляют 7%–15% всех случаев узловых образований щитовидной железы [2]. В связи с широкой распространенностью узловых новообразований и низкой долей злокачественных новообразований в их структуре важную роль играет дооперационная малоинвазивная дифференциальная диагностика. В настоящее время доступна малоинвазивная дооперационная диагностика РЩЖ, основанная на цитологическом исследовании материала, полученного при тонкоигольной аспирационной биопсии. Согласно системе Бетезда приняты 6 диагностических категорий результатов цитологического исследования: I — недиагностический (не пригодный для

исследования, ND/UNS); II — доброкачественный (включает аденоматозный узел, коллоидный узел, лимфоцитарный тиреоидит Хашимото и гранулематозный тиреоидит); III — атипия неопределенного значения или фолликулярные изменения неопределенного значения (AUS/FLUS); IV- фолликулярная неоплазия или подозрение на фолликулярную неоплазию (FN/SFN); V — подозрение на рак (SUS); VI — рак [3]. Суммарная частота «неопределенных» цитологических заключений категорий III-IV составляет 20-30%. Риск рака (при условии, что неинвазивная фолликулярная неоплазия с папиллярно-подобными ядерными признаками (NIF-TP) не считается раком) в данных группах составляет 6–18% для категории III, 10–40% для категории IV, 45–60% для категории V. При неопределенных цитологи-

ческих заключениях рекомендовано молекулярное исследование и гемитиреоидэктомия (при категориях III и IV, и в ряде случаев категории V) или тиреоидэктомия (в ряде случаев категории V). Повышение точности дифференциальной диагностики необходимо для своевременного назначения эффективного лечения, снижения частоты необоснованного чрезмерного хирургического вмешательства, улучшения качества жизни пациентов [4]. Предполагается, что эффективность диагностического этапа может быть повышена в результате внедрения исследований молекулярно-генетических маркеров [5].

Рекомендуемый спектр маркеров (точковые мутации генов *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *RET/PTC1*, *RET/PTC3*, *PAX8-PPARG*) позволяет охарактеризовать не более 60-70% случаев злокачественных новообразований щитовидной железы фолликулярно-клеточного происхождения, что недостаточно для уверенного использования в диагностике и обуславливает активный поиск новых молекулярно-генетических маркеров. В результате исследований в рамках проектов The Cancer Genome Atlas, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, а также ряда других работ описан широкий спектр новых мутаций, сделана попытка предложить новые маркеры злокачественных новообразований щитовидной железы [6-12]. Однако к настоящему моменту не накоплено достаточно данных о распространенности таких маркеров при доброкачественных новообразованиях, не оценена ассоциация с клинико-морфологическими характеристиками, не дана оценка диагностической значимости.

В данной работе выполнено исследование методом таргетного высокопроизводительного секвенирования расширенного спектра известных маркерных мутаций и описанных в литературе новых предполагаемых драйверных мутаций с целью оценки распространенности при доброкачественных и злокачественных новообразованиях щитовидной железы.

Материалы и методы

Исследование выполнено на свежемороженом материале узловых образований щитовидной железы. Гистологические диагнозы исследованных узловых образований включили: 1. рак — 64 образца (40 - с цитологическими диагнозами Бетезда III-V; 24 - с цитологическим диагнозом Бетезда VI); 2. доброкачественный узел/опухоль — 16 образцов (все с цитологическими диагнозами Бетезда III-V). Распределение образцов по цитологическим диагнозам Бетезда III-V: III — 2 образца; IV — 47 образцов; V — 7 образцов. В исследование также включены 6 образцов нормальной ткани щитовидной железы для использования пула нормальной ткани

в процессе определения точковых вариантов, коротких инсерций/делеций и изменения копийности (CNV).

Выделение нуклеиновых кислот, обратная транскрипция

Точковые варианты, короткие инсерции/делеции, CNV определяли в последовательности ДНК. Для определения наличия химерных транскриптов использована мРНК.

ДНК и РНК выделены с использованием набора Norgen Biotek RNA/DNA Purification Micro Kit. Количество ДНК определено на флуориметре Qubit с помощью набора Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), количество РНК определено на спектрофотометре NanoPhotometer IMPLN. Синтез первой цепи кДНК выполнен с использованием набора реактивов MMLV RT kit (Евроген). Пригодность полученной кДНК проверена методом ПЦР в реальном времени на участок транскрипта гена *B2M*, соответствующий длине анализируемых регионов таргетных транскриптов.

Подготовка библиотек фрагментов ДНК для высокопроизводительного секвенирования

Из ДНК и кДНК подготовлены библиотеки таргетных фрагментов с использованием двух панелей праймеров Ion AmpliSeq™ Custom panels (Thermo Fisher Scientific) и набора GenSeq™ Library Kit v1.1 (Анпро).

Панель на точковые мутации, инсерции/делеции и CNV содержит праймеры на 461 регион, длина вставки составляет 226 п.н. (77-235) (мода (минимум, максимум)). Анализируемые регионы включают участки с описанными ранее точковыми мутациями в генах с известной диагностической значимостью при фолликулярно-клеточном РЩЖ (*BRAF*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *TERT*, *EIF1AX*, *PTEN*, *GNAS*, *TSHR*) и в генах без известной диагностической и прогностической значимости (*AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *CTNNB1*, *PIK3CA*, *CCNE*, *SOS1*, *ALK*, *IDH1*, *IDH2*, *NTRK3*, *MET*, *RAC1*, *FGFR2*, *RET*, *PDGFRA*, *KIT*, *KDR*, *PPM1D*, *EZH1*, *JAK2*, *DICER1*, *MEN1*, *ATM*, *KMT2A*, *APC*, *ATR*, *TSC2*, *ZFHX3*, *ARID1B*, *NF2*, *TSC1*, *NF1*, *SPOP*, *KMT2C*, *CDKN2C*, *STK11*, *CHEK2*, *EP300*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *RBI*), а также регионы длинных плеч хромосом 1, 9, 22 для анализа CNV.

Панель на генные перестройки содержит праймеры на следующие гены-акцепторы: *RET* (экзоны 7,8,10,11,12); *ALK* (экзоны 17,18,19,20); *NTRK1* (экзоны 9,10,11,12); *NTRK3* (экзоны 12,15,14); *PPARG* (экзоны 1,2,3); *THADA* (экзоны 28,30); *LTK* (экзоны 10,11); *MET* (экзоны 11,15); *BRAF* (экзоны 8,9,10,11); *C15orf55* (экзоны 1,2); *ERBB4* (экзон 18); *OFD1* (экзон 3); *SLC5A11* (экзон 17). Донорные ге-

ны перестроек, покрываемые панелью праймеров: *AFAP1L2* (экзон 2); *AGK* (экзон 2); *AKAP13* (экзон 36); *AKAP9* (экзон 8); *AP3B1* (экзон 22); *BANP* (экзон 4); *BRD4* (экзон 11); *CCDC149* (экзон 10); *CCDC6* (экзон 1,2,8); *CCNY* (экзон 1); *CREB3L2* (экзон 2); *EML4* (экзон 2,6,7,13,14,17,18,20); *ERC1* (экзон 5,6,7,11,12,17); *ETV6* (экзон 4,5); *EZR* (экзон 11); *FAM114A2* (экзон 8,9); *FGFR2* (экзон 17); *FKBP15* (экзон 25); *GFPT1* (экзон 17); *GOLGA5* (экзон 7); *GTF2IRD1* (экзон 7); *HOOK3* (экзон 11); *IRF2BP2* (экзон 1,2); *KIF5B* (экзон 15,16,17,22,23,24); *KTN1* (экзон 29); *MACF1* (экзон 42); *MALAT1* (экзон 1,2,3); *MKRN1* (экзон 4); *MYH13* (экзон 3); *NCOA4* (экзон 6,7,8); *PAX8* (экзон 7,8,9,10); *PCMI* (экзон 29,31); *PICALM* (экзон 19); *POR* (экзон 3); *PPFIBP2* (экзон 9); *PRKARIA* (экзон 7,8); *RBPM5* (экзон 4); *SND1* (экзон 16); *SPECCIL* (экзон 9,10); *SQSTM1* (экзон 5,6); *SS18* (экзон 5); *SSBP2* (экзон 12); *STRN* (экзон 3); *TBL1XR1* (экзон 9); *TFG* (экзон 5, 6); *TPM3* (экзон 7); *TPR* (экзон 4,21); *TRIM24* (экзон 9,10); *TRIM27* (экзон 3,6); *TRIM33* (экзон 14,16); *UACA* (экзон 17); *ZBTB8A* (экзон 4); *ZC3HAV1* (экзон 7).

Высокопроизводительное секвенирование библиотек

Секвенирование 86 библиотек на точковые мутации и CNV выполнено на платформе NextSeq 550 (Illumina) с использованием набора NextSeq 550 System Mid-Output Kit (300 циклов). Секвенирование 86 библиотек на генные перестройки и экспрессионные маркеры выполнено на платформе MiSeq (Illumina) с использованием набора MiSeq Reagent Micro Kit v2.

Анализ данных секвенирования

Прочтения, полученные для библиотек на точковые мутации и CNV, выравнены с помощью BWA-MEM на референсный геном hg19 [13]. Варианты определялись с помощью gatk Mutect2 версия 4.1.2.0 против пула образцов нормальной ткани [14]. Особенности настройки инструмента включили снятие ограничения количества ридов с одинаковыми координатами начала (--max-reads-per-alignment-start 0) и использование списка таргетных вариантов для оценки вероятность потери данных вариантов по техническим причинам. Аннотация найденных вариантов выполнена с помощью инструмента ANNOVAR.

CNV определены по покрытию таргетных регионов с помощью инструмента ONCOCNV, учитывали только изменение копийности, определяемое инструментом как уверенное [15].

Прочтения, полученные в результате секвенирования библиотек на генные перестройки выравне-

ны с помощью TMAP для парноконцевых прочтений на специальный референс, содержащий покрываемые панелью праймеров последовательности транскриптов химерных генов, экспрессионных маркеров и 3', 5' концов тирозинкиназ.

Перестройки считались положительными при условии наличия более одной пары прочтений на перестройку.

Найденные варианты были разделены по диагностической значимости на группы согласно рекомендациям Ассоциации молекулярной патологии (Association for Molecular Pathology), Американского общества клинической онкологии (American Society of Clinical Oncology) и Коллегии американских патологов (College of American Pathologists) 2017 года [16]. Группы включили:

А — Маркеры с установленным значением риска рака, включенные в рекомендации NCCN, Европейского общества тиреоидологов [17], Американского общества тиреоидологов [2];

В — Маркеры с диагностической значимостью, описанной при РЩЖ в многочисленных релевантных исследованиях, признаваемые специалистами, но не включенные в рекомендации;

Д — Предполагаемые маркеры без установленной диагностической значимости, описанные в литературе при РЩЖ.

Результаты

1. Варианты с известной диагностической значимостью, указанные в рекомендациях (Уровень А)

1.1. Драйверные мутации с известным высоким риском рака

Мутации гена *BRAF* p.V600E выявлены в 59% образцов с гистологическим диагнозом РЩЖ (в 70% образцов с цитологическим диагнозом Bethesda VI и в 52% образцов с цитологическими диагнозами Bethesda III-V). В доброкачественных образцах мутация гена *BRAF* выявлена в 1 образце. Во всех случаях мутации гена *BRAF* представлены заменой p.V600E. Других известных мутаций (в том числе в кодонах 464-601) не выявлено. Доля мутантного аллеля *BRAF* p.V600E в образцах составила 0,32(0,24-0,40) — Q2(Q1-Q3), минимальная частота — 0,6, максимальная — 0,48.

Перестройки выявлены в 12% образцов с гистологическим диагнозом РЩЖ: *CCDC6-RET.C1R12* (3 случая), *ETV6-NTRK3.E4N14*, *TPM3-NTRK1.T7N10*, *STRN-ALK.S3A20*, *PAX8-PPARG.P8P2*, *PAX8-PPARG.P9P2* (по одному случаю).

1.2. Драйверные мутации с известным низким риском рака (RAS)

Мутации в генах системы RAS выявлены в 3% образцов рака (гены *KRAS* и *NRAS*) и в 12,5% доброкачественных образцов (гены *HRAS* и *NRAS*). Цитологический диагноз образцов с мутациями RAS соответствовал Bethesda III-IV. Во всех случаях мутации представлены заменой p.Q61R. Доля мутантного аллеля в генах системы RAS составила 0,43-0,51.

1.3. Вторичные варианты с известной диагностической/прогностической значимостью

Мутации промоторного региона гена *TERT* выявлены в 10% образцов рака и были со-представлены с мутациями *BRAF*. Цитологические диагнозы образцов с мутациями гена *TERT* был как Bethesda III-IV, так и Bethesda VI. Доля мутантного аллеля составила 0,5-0,17. В доброкачественных образцах мутации гена *TERT* выявлены в 2 случаях. Других известных драйверных мутаций в этих образцах не выявлено.

2. Гены с известной диагностической значимостью, не входящие в рекомендации (Уровень В)

2.1. Гены, ассоциированные с неблагоприятным прогнозом

Замена в гене *PIK3CA* выявлена в одном случае рака и представлена заменой p.N497S (NM_006218) в регионе между хеликазным и C2 доменами. Выявленный вариант нельзя считать диагностически значимым. Других мутаций в гене *PIK3CA* не выявлено.

Мутации в гене *AKT1* не выявлены ни в образцах рака, ни в доброкачественных образцах.

Мутации в опухолевом супрессоре *TP53* выявлены в 10% РЩЖ, все мутации представлены заменой в 5'-нетранслируемом регионе. В 5 случаях мутации гена *TP53* были представлены совместно с мутациями в гене *BRAF*, в 2 случаях мутаций в известных драйверных генах не выявлено. В доброкачественных образцах мутация гена *TP53* выявлена в 1 случае и представлена заменой p.R248W (NM_001126114).

Делеции в регионах 9q и 22q выявлены в 15,6% случаев рака и были представлены совместно с другими известными драйверными мутациями. При доброкачественных новообразованиях выявлено 2 случая делеции 22q. CNV в регионе 1q не выявлены.

2.2. Гены, ассоциированные с доброкачественным характером

Мутация *EIF1AX* p.G9R выявлена в 1 доброкачественном образце и была представлена совместно с мутацией в гене *BRAF*.

Варианты в гене *TSHR* выявлены в образце рака (1 случай) и в доброкачественных образцах — 3 случая.

Мутации в генах *GNAS* и *PTEN* не выявлены.

3. Гены, описанные в литературе без известной диагностической/прогностической значимости (Уровень D)

3.1. Онкогены

Мутации в генах *PPM1D* (2 случая), *KIT* (1 случай), *KDR* (3 случая) и *PDGFRA* (3 случая) выявлены в образцах рака, в большинстве случаев представлены совместно с известными драйверными мутациями в гене *BRAF* или генах семейства RAS, при доброкачественных новообразованиях не выявлены.

Варианты неопределенного значения в гене *RAC1* выявлены в 7 случаях рака и в 2 случаях доброкачественных новообразований, во всех случаях, исключая два случая рака и один случай доброкачественного новообразования, представлены совместно с мутациями в гене *BRAF*.

Мутация неопределенного значения в гене *CTN-NB1* выявлена в 1 случае доброкачественного новообразования.

Точковые варианты в генах *AKT2*, *AKT3*, *SOS1*, *IDH1*, *MET*, *JAK2*, *IDH2*, *ALK*, *EZH1* не выявлены.

3.2. Опухолевые супрессоры

Однонуклеотидные замены в генах *APC* (6 случаев), *KMT2A* (4 случая), *KMT2C* (2 случая) и *ATM* (1 случай) выявлены в образцах рака, в большинстве случаев представлены совместно с мутациями в гене *BRAF*, не выявлены в доброкачественных новообразованиях.

В гене *TSC2* выявлены варианты в 6% случаев рака и в 1 случае доброкачественного новообразования. При раке варианты были представлены как совместно с другими драйверами, так и без других драйверных мутаций.

Варианты в генах *ZFHX3*, *ARID1B*, *CDKN2B*, *DICER1*, *CHEK2* выявлены как в образцах рака, так и в доброкачественных образцах либо с равной частотой, либо чаще в доброкачественных образцах.

В гене *EP300* мутации выявлены в доброкачественном новообразовании, 1 случай.

В генах *ATR*, *TSC1*, *NF1*, *SPOP*, *STK11*, *NF2*, *MEN1*, *RB1*, *CDKN2A*, *CDKN2C* мутации не выявлены.

Суммарно распространенность мутаций по всем образцам представлена на рисунке.

Обсуждение

Высокая распространенность неопределенных цитологических заключений (категории III-V по системе Бетезда), когда нет возможности уверенно диагностировать злокачественный характер новообразований щитовидной железы, определяет необходимость внедрения в клиническую практику молекулярно-ге-

нетических методов исследований [4, 5]. На данный момент известные молекулярно-генетические маркеры не позволяют обеспечить высокую эффективность дифференциальной диагностики. Для расширения спектра анализируемых маркеров и повышения точности диагностики необходимы исследования распространенности известных драйверных мутаций и новых предполагаемых маркерных мутаций при доброкачественных и злокачественных новообразованиях щитовидной железы с последующей оценкой диагностической значимости (риск рака, прогноз скорости прогрессии, рецидивирования, метастазирования).

В работе выполнено исследование методом таргетного высокопроизводительного секвенирования расширенного спектра генетических изменений в свежемороженом материале доброкачественных и злокачественных новообразованиях щитовидной железы. Исследованные генетические изменения включили точечные мутации, короткие инсерции/делеции, изменения копийности, перестройки в генах с известной диагностической значимостью и в генах, описанных в отдельных исследованиях без оценки ассоциации со злокачественностью и клинико-морфологическими характеристиками.

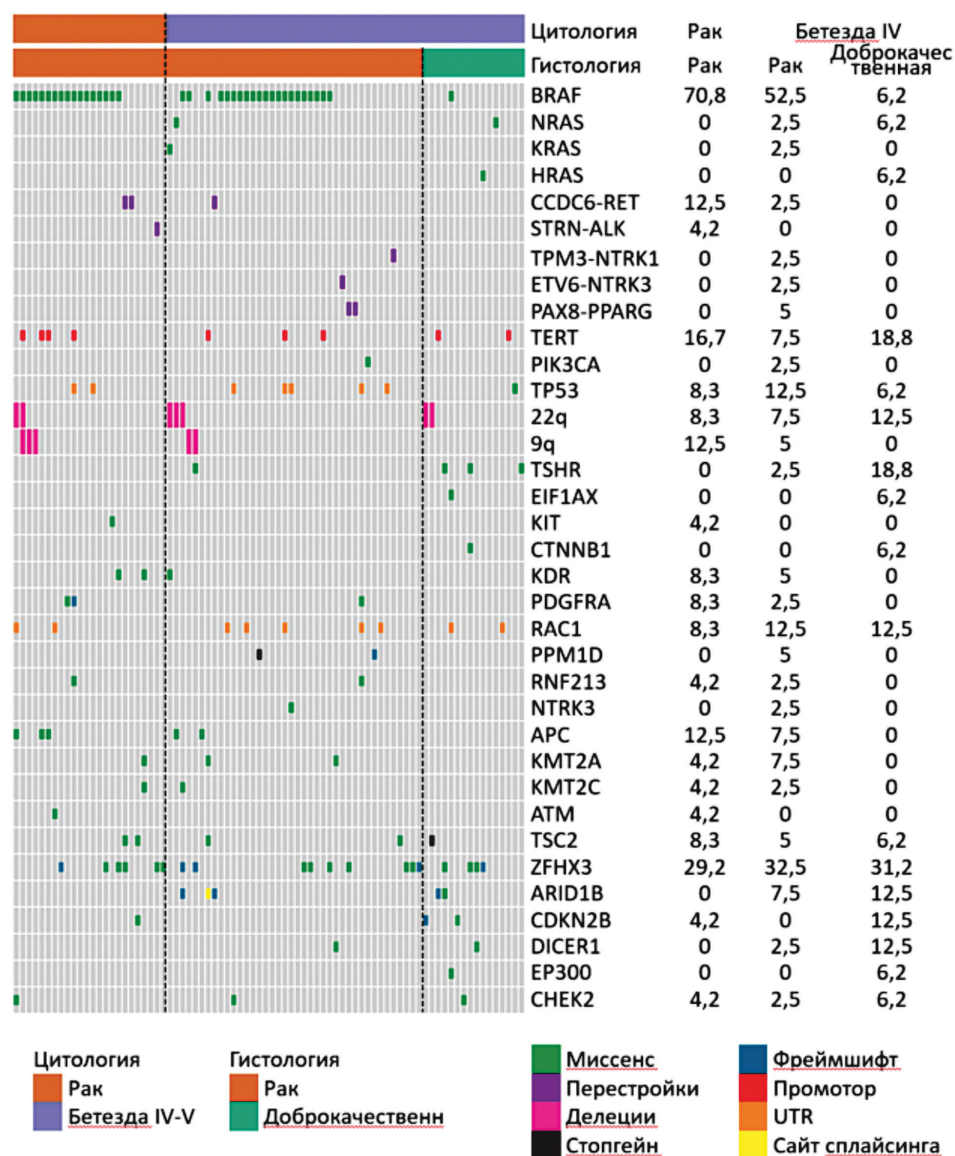


Рисунок. Распределение выявленных мутаций по образцам.

Выявленные нами частоты мутаций гена *BRAF* в образцах РЩЖ составляют 59,4%, что соответствует верхней границе частот по данным литературы [6, 9]. Мутации генов системы RAS выявлены в одинаковом количестве при доброкачественных и злокачественных новообразованиях (по 2 образца), небольшой объем выборки не позволяет дать достоверную оценку частоты. Частота выявленных перестроек при РЩЖ (12,5%), преобладание *CCDC6-RET* (3 случая), отсутствие перестроек при доброкачественных новообразованиях соответствуют данным литературы [6, 9]. Выявление перестроек генов *ALK*, *NTRK1*, *NTRK3* в сумме в трех случаях рака, а также ассоциация со злокачественностью новообразования подтверждает важность включения широкого спектра перестроек, помимо перестройки *RET*, в диагностическую практику.

Важное значение в диагностике и прогнозировании течения заболевания имеет определение мутаций в промоторном регионе гена *TERT*, ассоциированных с неблагоприятным прогнозом [18, 19]. Нами выявлены мутации в гене *TERT* в 10,9% случаев РЩЖ, во всех случаях мутации гена *TERT* были представлены совместно с мутациями в гене *BRAF*. В доброкачественных новообразованиях мутации в гене *TERT* выявлены в двух случаях при отсутствии других драйверных мутаций. Так как, не смотря на строгую ассоциацию с неблагоприятным прогнозом, мутации в гене *TERT* не инициируют злокачественную трансформацию клеток, их обнаружение при отсутствии других драйверных мутаций не является достаточным критерием для диагностики образцов как злокачественные.

Выявлена известная миссенс мутация гена *EIF1AX* в одном случае доброкачественного новообразования. Наблюдаемая нами частота и преобладание при доброкачественных новообразованиях соответствует данным Karunamurthy A с соавт. и подтверждает ассоциацию мутаций *EIF1AX* с доброкачественными новообразованиями [20].

Отсутствие в нашем исследовании выявленных мутаций онкогенов *PIK3CA*, *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *SOS1*, *IDH1*, *MET*, *JAK2*, *IDH2*, *ALK*, *EZH1* может свидетельствовать об их низкой распространенности при РЩЖ.

Одинаковая распространенность вариантов в опухолевых супрессорах *ZFHX3*, *ARID1B*, *CDKN2B*, *DICER1*, *CHEK2* при раке и доброкачественных новообразованиях щитовидной железы может говорить о низкой диагностической точности таких вариантов.

Литература/References

- Sanabria A., Kowalski L.P., Shah J.P., et al. Growing incidence of thyroid carcinoma in recent years: Factors underlying overdiagnosis. *Head Neck* 2018;40:855–66. doi:10.1002/hed.25029
- Haugen B.R., Alexander E.K., Bible K.C., 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:10.1089/thy.2015.0020
- Cibas E.S., Ali S.Z. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid*. 2017;27(11):1341-1346. doi:10.1089/thy.2017.0500
- Rogers W.A., Craig W.L., Entwistle V.A. Ethical issues raised by thyroid cancer overdiagnosis: A matter for public health?. *Bioethics*. 2017;31(8):590-598. doi:10.1111/bioe.12383
- Rahman S.T., McLeod D.S.A., Pandeya N., et al. Understanding Pathways to the Diagnosis of Thyroid Cancer: Are There Ways We Can Reduce Over-Diagnosis?. *Thyroid*. 2019;29(3):341-348. doi:10.1089/thy.2018.0570
- Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014;159(3):676-690. doi:10.1016/j.cell.2014.09.050
- Kasaian K., Wiseman S.M., Walker B.A. et al. The genomic and transcriptomic landscape of anaplastic thyroid cancer: implications for therapy. *BMC Cancer*. 2015;15:984. Published 2015 Dec 18. doi:10.1186/s12885-015-1955-9
- Kunstan J.W., Juhlin C.C., Goh G., et al. Characterization of the mutational landscape of anaplastic thyroid cancer via whole-exome sequencing. *Hum Mol Genet*. 2015;24(8):2318-2329. doi:10.1093/hmg/ddu749
- Landa I., Ibrahimipasic T., Boucai L., et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J Clin Invest*. 2016;126(3):1052-1066. doi:10.1172/JCI85271
- Swierniak M., Pfeifer A., Stokowy T., et al. Somatic mutation profiling of follicular thyroid cancer by next generation sequencing. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;433:130-137. doi:10.1016/j.mce.2016.06.007
- Yoo S.K., Lee S., Kim S.J., et al. Comprehensive Analysis of the Transcriptional and Mutational Landscape of Follicular and Papillary Thyroid Cancers. *PLoS Genet*. 2016;12(8):e1006239. Published 2016 Aug 5. doi:10.1371/journal.pgen.1006239
- Pozdnyev N., Gay L.M., Sokol E.S., et al. Genetic Analysis of 779 Advanced Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancers. *Clin Cancer Res*. 2018;24(13):3059-3068. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0373
- Li H., Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010; 26: 589-595.
- Van der Auwera G.A., Carneiro M.O., Hartl C., et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2013;43(1110):11.10.1-11.10.33. doi:10.1002/0471250953.bi1110s43
- Boeva V., Popova T., Lienard M., et al. Multi-factor data normalization enables the detection of copy number aberrations in amplicon sequencing data. *Bioinformatics*. 2014;30(24):3443-3450. doi:10.1093/bioinformatics/btu436
- Li M.M., Datto M., Duncavage E.J., et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017;19(1):4-23. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.10.002
- Paschke R., Cantara S., Crescenzi A., et al. European Thyroid Association Guidelines regarding Thyroid Nodule Molecular Fine-Needle Aspiration Cytology Diagnostics. *Eur Thyroid J*. 2017;6(3):115-129. doi:10.1159/000468519
- Melo M., da Rocha A.G., Vinagre J., et al. TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E754-65. doi:10.1210/jc.2013-3734
- Bournaud C., Descotes F., Decaussin-Petrucci M., et al. TERT promoter mutations identify a high-risk group in metastasis-free advanced thyroid carcinoma. *Eur J Cancer*. 2019;108:41-49. doi:10.1016/j.ejca.2018.12.003
- Karunamurthy A., Panebianco F., Hsiao S.J., 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