

Определение химерных транскриптов и экспрессионных маркеров методом таргетного высокопроизводительного секвенирования при раке щитовидной железы

Якушина В.Д.¹, Стрельников В.В.¹, Авдеева Т.Ф.², Казубская Т.П.³, 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 – Московская городская клиническая больница им. В.М. Буянова
115516, г. Москва, ул. Бакинская, д. 26

3 – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации
115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23

4 – ООО «ПреМед»
107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 17, с. 3

Введение. Определение химерных онкогенов имеет важное значение в дооперационной дифференциальной диагностике рака щитовидной железы, а также для назначения ингибиторов тирозинкиназ. Предполагается, что оценка 5'/3' дисбаланса экспрессии, косвенно отражающая наличие перестроек и уровня экспрессии ряда генов, позволит расширить спектр маркеров и тем самым повысить чувствительность диагностики злокачественных новообразований щитовидной железы. Высокопроизводительное секвенирование РНК, позволяющее определять полный спектр перестроек в сочетании с экспрессионными маркерами, рассматривается в качестве перспективного подхода, активно внедряемого в клиническую практику. Цель: оценить точность определения генных перестроек и экспрессионных маркеров методом таргетного высокопроизводительного секвенирования РНК при раке щитовидной железы.

Методы. Исследованы 64 образца рака щитовидной железы и 16 образцов доброкачественных образований щитовидной железы с цитологическим диагнозом Бетезда III-V. Наличие транскриптов перестроек генов *RET*, *ALK*, *NTRK1*, *NTRK3*, *PPARG*, *THADA*, *LTK*, *MET*, *BRAF*, *C15orf55*, *ERBB4*, *OFD1*, *ROS1*, 5'/3' дисбаланс экспрессии данных генов и уровень экспрессионных маркеров определяли методом высокопроизводительного секвенирования с использованием технологии AmpliSeq на собственной панели праймеров.

Результаты. Перестройки найдены в 12% образцов рака, список найденных перестроек включил CCDC6-RET, ETV6-NTRK3, TPM3-NTRK1, STRN-ALK, PAX8-PPARG. Доля образцов с выявленными перестройками соответствует ожидаемой по данным литературы. В образцах доброкачественных образований перестройки не выявлены. 5'/3' дисбаланс в образцах рака был выражен для генов *RET*, *NTRK1*, *NTRK3*, *MET* и *THADA*, при этом отсутствовал в доброкачественных образованиях. Среди исследованных экспрессионных маркеров, гены *KRT7*, *KRT20*, *CHGA*, *CITED1* имели выраженную гиперэкспрессию в отдельных образцах рака при отсутствии абберантной экспрессии в доброкачественных новообразованиях.

Заключение. Таргетное высокопроизводительное секвенирование РНК на основе технологии AmpliSeq с помощью разработанной панели праймеров позволяет определять химерные гены, 5'/3' дисбаланс экспрессии генов и экспрессионные маркеры с высокой специфичностью относительно статуса злокачественности новообразования. Включение 5'/3' дисбаланса экспрессии и экспрессионных маркеров в тестирование может повысить точность дифференциальной диагностики злокачественных новообразований.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, химерные гены, 5'/3' дисбаланс экспрессии, экспрессионные маркеры, высокопроизводительное секвенирование.

Для цитирования: Якушина В.Д., Стрельников В.В., Авдеева Т.Ф., Казубская Т.П., Кондратьева Т.Т., Лернер Л.В., Лавров А.В. Определение химерных транскриптов и экспрессионных маркеров методом таргетного высокопроизводительного секвенирования при раке щитовидной железы. *Медицинская генетика* 2023; 22(11): 47-57.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ».

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 03.11.2023

Targeted high throughput RNA sequencing for detection of gene fusions and gene expression markers in thyroid cancer

Yakushina V.D.¹, Strelnikov V.V.¹, Avdeeva T.F.², Kazubskaya T.P.³, Kondratieva T.T.^{3,4}, Lerner L.V.⁴, Lavrov A.V.¹

1 – Research Centre for Medical Genetics

1, Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

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

26, Bakinskaya st., Moscow, 115516, Russian Federation

3 – N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology

23, Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation

4 – PreMed-European Technologies

17, bldg. 3, Petrovka st., Moscow, 117031, Russian Federation

Background. Detection of fusion genes is important in the preoperative differential diagnostics of thyroid cancer, as well as for tyrosine kinase inhibitors prescription. It is assumed that the assessment of the 5'/3' expression imbalance, which indirectly reflects the presence of gene rearrangements, and gene expression markers, might widen the range of markers and would thereby improve the sensitivity of the malignant thyroid tumors diagnostics. High throughput RNA sequencing, which allows determining the full range of rearrangements in combination with expression markers, is supposed to be promising application and is under active implementation into clinical practice.

Aim. To assess the detection of rearrangements and expression markers by targeted high throughput RNA sequencing in thyroid cancer.

Methods. 64 samples of thyroid cancer and 16 samples of benign thyroid lesions with a cytological diagnosis of Bethesda III-V were examined. Presence of *RET*, *ALK*, *NTRK1*, *NTRK3*, *PPARG*, *THADA*, *LTK*, *MET*, *BRAF*, *C15orf55*, *ERBB4*, *OFD1*, *ROS1* gene rearrangement transcripts, 5'/3' gene expression imbalance and expression marker levels were evaluated by high throughput sequencing using AmpliSeq technology on the custom primer panel.

Results. Fusion genes were found in 12% of cancer samples. Their list includes CCDC6-RET, ETV6-NTRK3, TPM3-NTRK1, STRN-ALK, and PAX8-PPARG. The proportion of samples with identified rearrangements meets the values expected according to the literature. No rearrangements were found in the benign samples. 5'/3' imbalance in cancer samples was detected for the *RET*, *NTRK1*, *NTRK3*, *MET*, and *THADA* genes, while it was absent in benign lesions. Among the studied expression markers, the *KRT7*, *KRT20*, *CHGA*, *CITED1* genes had significant overexpression in cancer samples, with no aberrant expression in benign neoplasms.

Conclusions. Targeted high throughput RNA sequencing based on AmpliSeq technology using the developed primer panel allows to determine gene fusions, 5'/3' expression imbalance and expression markers with high specificity regarding the malignancy of the neoplasm. Inclusion of 5'/3' expression imbalance and gene expression markers can improve the accuracy of differential diagnostics of malignant neoplasms.

Keywords: thyroid cancer, gene fusions, 5'/3' expression imbalance, gene expression markers, high throughput sequencing.

For citation: Yakushina V.D., Strelnikov V.V., Avdeeva T.F., Kazubskaya T.P., Kondratieva T.T., Lerner L.V., Lavrov A.V. Targeted high throughput RNA sequencing for detection of gene fusions and gene expression markers in thyroid cancer. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(11): 47-57. (In Russ.)

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

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

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

Accepted: 03.11.2023

Введение

Рак щитовидной железы является наиболее распространенным среди злокачественных новообразований эндокринной системы и при этом характеризуется неуклонным ростом количества вновь выявленных случаев [1, 2]. Дифференцированный рак щитовидной железы, включающий фолликулярный и папиллярный типы, имеет благоприятный прогноз с 5-летней выживаемостью на уровне 95%, однако до 10% случаев могут давать рецидивы, а до 30% случаев — метастазирование [3, 4]. Анапластический рак щитовидной железы, являющийся результатом прогрессии

дифференцированного рака, а также выявляемый *de novo*, характеризуется высокой смертностью с медианной продолжительности жизни 5 месяцев после постановки диагноза [5, 6].

Наиболее важные диагностические задачи включают дифференциальную диагностику доброкачественных и злокачественных новообразований, прогноз прогрессирования, выявление маркеров для назначения таргетной терапии, определение чувствительности к радиойодтерапии. Малоинвазивным дооперационным подходом дифференциальной диагности-

ки рака щитовидной железы является цитологическое исследование материала тонкоигольной аспирационной биопсии. При этом в 20-30% случаев цитологическое заключение формулируется как неопределенное, соответствующее III-V категориям по системе Бетезда и характеризующееся риском рака от 5% до 75% [7].

Генные перестройки в новообразованиях щитовидной железы имеют важное диагностическое значение, так как не выявляются при доброкачественных образованиях и их обнаружение свидетельствует о злокачественной форме. Кроме того, перестройки *ALK*, *RET*, *BRAF*, *NTRK1/2/3* являются таргетами для терапии ингибиторами тирозинкиназ [8, 9, 10]. Частота обнаружения перестроек при папиллярном раке, описанная в литературе, варьирует в диапазоне 6-46% [11, 12]. В исследовании TCGA перестройки выявлены в 15,3% из 484 случаев папиллярного рака [11]. Гены, наиболее часто встречающиеся в перестройках при папиллярном раке: *RET*, *BRAF*, *NTRK1*, *NTRK3*, *ALK*, *PPARG* и *THADA*. Перестройки, характерные для фолликулярного варианта папиллярного рака, включают *RET/PTCs* и *NTRK1/3* преимущественно при инфильтративном подтипе и *PAX8-PPARG* при инкапсулированном подтипе [13, 14]. При фолликулярном раке наиболее распространены перестройки *PAX8-PPARG*, выявляемые в 30-60% случаев [15, 16]. Перестройки при анапластическом раке описаны с частотой 3-5%, и представлены *RET/PTC3*, *STRN-ALK*, *NUT-BRD4* и *KIAA1549-BRAF* [17].

Перспективным подходом для определения перестроек считается высокопроизводительное секвенирование, позволяющее одновременно оценивать их полный спектр. Таргетное секвенирование РНК рассматривается как наиболее релевантный для клинической практики подход, превосходящий определение перестроек при секвенировании ДНК по чувствительности, а также минимизирующий выявление нефункциональных перестроек за счет исключения из анализа нетранскрибируемых вариантов [18, 19].

В данной работе было выполнено исследование перестроек с образованием химерных генов в образцах злокачественных и доброкачественных новообразований щитовидной железы методом таргетного высокопроизводительного секвенирования РНК с помощью технологии AmpliSeq с использованием собственной панели праймеров, покрывающих описанные в литературе перестройки генов *RET*, *ALK*, *NTRK1*, *NTRK3*, *PPARG*, *THADA*, *LTK*, *MET*, *BRAF*, *C15orf55*, *ERBB4*, *OFD1*, *ROS1*. Дополнительно оценен 5'/3' дисбаланс экспрессии данных генов, что может служить косвен-

ным маркером наличия перестройки, позволяющим повысить чувствительность за счет детекции новых вариантов. Кроме того, проанализирована экспрессия ряда предполагаемых маркеров злокачественности новообразований щитовидной железы (*KRT7*, *KRT20*, *CALCA*, *PGK1*, *PTH*, *SLC5A5*, *SYN2*, *CHGA*, *CITED1*, *KLK1*, *VHL*, *JUN*, *SUGCT*, *TRIM61*, *NKX2-1*).

Методы

Биологический материал

Исследовано 80 образцов узловых образований щитовидной железы. Согласно гистологическому диагнозу, исследованные узловые образования включили 64 образца рака щитовидной железы (в том числе фолликулярный рак – 3 образца, фолликулярный вариант папиллярного рака – 6 образцов, и папиллярный рак – 55 образцов) и 16 образцов доброкачественных новообразований. Цитологические диагнозы образцов рака щитовидной железы соответствовали категориям Бетезда III-V (40 образцов) и Бетезда VI (24 образца). Все исследованные доброкачественные образования получили цитологический диагноз Бетезда III-V.

Для определения базовых значений 5'/3' дисбаланса экспрессии тирозинкиназ и экспрессионных маркеров в исследование включены 6 образцов нормальной ткани.

Материалом исследования явилась свежемороженая ткань.

Получение кДНК

Выделение РНК выполнено с помощью набора Norgen Biotek RNA/DNA Purification Micro Kit. Количество РНК определено на спектрофотометре NanoPhotometer IMPLN. кДНК синтезирована с помощью набора реактивов MMLV RT kit (Евроген). Пригодность полученной кДНК проверена методом ПЦР в реальном времени с праймерами на участок транскрипта на стыке экзон-экзон гена *B2M*, соответствующий длине таргетных регионов, анализируемых в панели.

Подготовка библиотек таргетных фрагментов ДНК

Библиотеки фрагментов получены из кДНК по технологии AmpliSeq с помощью наборов GenSeq™ Library Kit v1.1 (Анпро) и кастомной панели праймеров Ion AmpliSeq™ Custom panels (Thermo Fisher Scientific).

Используемая панель праймеров обеспечивает таргетную амплификацию перестроек генов *RET*, *ALK*,

NTRK1, NTRK3, PPARG, THADA, LTK, MET, BRAF, C15orf55, ERBB4, OFD1, ROS1; 5' и 3' регионов генов *LTK, MET, NTRK1/3, RET, ALK, BRAF, ERBB4, FGFR2, RAF1, ROS1, THADA* для оценки дисбаланса экспрессии; транскриптов экспрессионных маркеров *CALCA, KRT20, KRT7, PGK1, PTH, SLC5A5, SYN2, CHGA, CITED1, KLK1, VHL, JUN, SUGCT, TRIM61, NKX2-1*.

Контроль амплификации библиотек таргетных фрагментов обеспечен включением в панель праймеров на транскрипты генов *TBP, TTF1, MRPL13, HMBS, LMNA, LRP1*.

Секвенирование

Секвенирование библиотек выполнено на платформе MiSeq (Illumina) с использованием набора MiSeq Reagent Micro Kit v2.

Биоинформатическая обработка данных высокопроизводительного секвенирования и статистический анализ

Полученные прочтения выравнены с помощью TMAP для парноконцевых прочтений на кастомный референс, содержащий покрываемые панелью праймеров последовательности.

Генные перестройки определяли по наличию химерного транскрипта. Перестройки считались положительными при условии наличия более одной пары прочтений на перестройку.

5'/3' дисбаланс экспрессии *LTK, MET, NTRK1/3, RET, ALK, BRAF, ERBB4, FGFR2, RAF1, ROS1* и *THADA* определяли по разнице между количеством прочтений на 3' и 5' концы, нормализованным на сумму прочтений на контрольные гены (*TBP, TTF1, MRPL13, HMBS, LRP1*).

Экспрессию генов *KRT7, KRT20, CALCA, PGK1, PTH, SLC5A5, SYN2, CHGA, CITED1, KLK1, VHL, JUN, SUGCT, TRIM61, NKX2-1* определяли как количество прочтений на ген, нормализованное на сумму прочтений на контрольные гены (*TBP, TTF1, MRPL13, HMBS, LMNA, LRP1*).

Результаты

Методом таргетного высокопроизводительного секвенирования исследованы генные перестройки, 5'/3' дисбаланс экспрессии и экспрессионные маркеры в образцах рака и доброкачественных новообразований щитовидной железы.

Перестройки выявлены в 12% образцов с гистологическим диагнозом рак щитовидной железы: CCDC6-

RET.C1R12 (3 случая), ETV6-NTRK3.E4N14, TPM3-NTRK1.T7N10, STRN-ALK.S3A20, PAX8-PPARG.P8P2, PAX8-PPARG.P9P2 (по одному случаю). Все образцы, несущие перестройки, соответствовали папиллярному раку (фолликулярному или классическому вариантам), в образцах фолликулярного рака перестройки не выявлены.

5'/3' дисбаланс экспрессии

Результаты оценки дисбаланса экспрессии приведены на **рис. 1**. Выраженное смещение паттерна экспрессии в сторону преобладания 3'-экспрессии в образцах рака наблюдалось для генов *RET, NTRK1, NTRK3, MET* и *THADA*. В единичных образцах рака зафиксированы значения 5'/3' дисбаланса экспрессии, находящиеся далеко за пределами большинства наблюдений. В ряде образцов с 5'/3' дисбалансом экспрессии *RET*, а также в образцах с выраженным 5'/3' дисбалансом экспрессии *NTRK1* и *NTRK3* выявлены соответствующие перестройки (CCDC6-RET.C1R12, TPM3-NTRK1.T7N10 и ETV6-NTRK3.E4N14). Образцы с выраженным дисбалансом не несли других известных драйверных мутаций, что соответствует представлению о взаимоисключающем характере присутствия драйверных мутаций. Более высокий процент образцов с дисбалансом экспрессии гена *RET* на фоне единичных образцов с дисбалансом экспрессии генов *NTRK1, NTRK3* и *MET* соответствует данным литературы о более высокой частоте перестроек *RET* и относительно низкой частоте перестроек *NTRK1* и *MET*. 5'/3' дисбаланс экспрессии генов *RET, NTRK1, NTRK3, MET* и *THADA* не наблюдался в доброкачественных новообразованиях.

Результаты, полученные для генов *ALK, ROS1, FGFR2, RAF1, ERBB4, LTK, BRAF*, не позволяют установить ассоциацию 5'/3' дисбаланса экспрессии и наличия перестроек.

Полученные данные говорят о сильной ассоциации наличия перестроек и 5'/3' дисбаланса экспрессии для генов *RET, NTRK1, NTRK3* и *MET*. 5'/3' дисбаланс экспрессии генов *RET, NTRK1, NTRK3* и *MET*, оцененный в разработанной панели праймеров для таргетного высокопроизводительного секвенирования, может рассматриваться как новый дополнительный маркер злокачественных новообразований щитовидной железы.

Экспрессионные маркеры

Результаты оценки уровня экспрессионных маркеров по данным высокопроизводительного секвенирования представлены на **рис. 2**. Для генов *KRT7,*

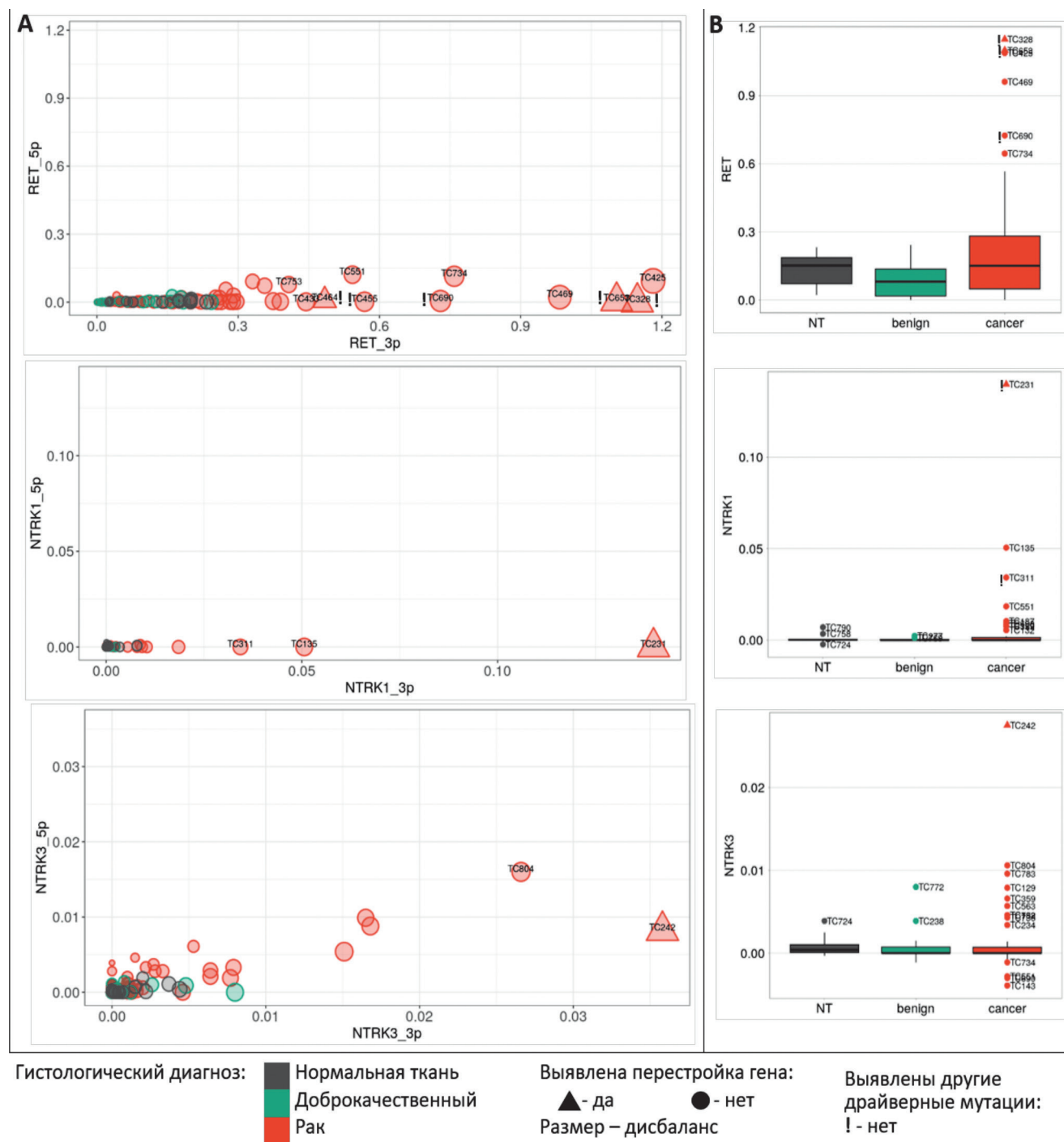


Рис. 1. 5'/3' дисбаланс экспрессии генов *RET*, *NTRK1* и *NTRK3*. А - количество прочтений на 3' (ось абсцисс) и 5' (ось ординат) регионы в каждом образце; В – 5'/3' дисбаланс экспрессии, посчитанный как разница количества прочтений на 5' и 3' регионы. Количество прочтений на анализируемые регионы нормализовалось на сумму прочтений на контрольные гены.

Fig. 1. 5'/3' imbalance in the expression of *RET*, *NTRK1* and *NTRK3* genes. А - number of reads in 3' (x-axis) and 5' (y-axis) regions in each sample; В – 5'/3' expression imbalance, calculated as the difference in the number of reads in the 5' and 3' regions. The number of reads per analyzed regions was normalized by the sum of reads per control genes.

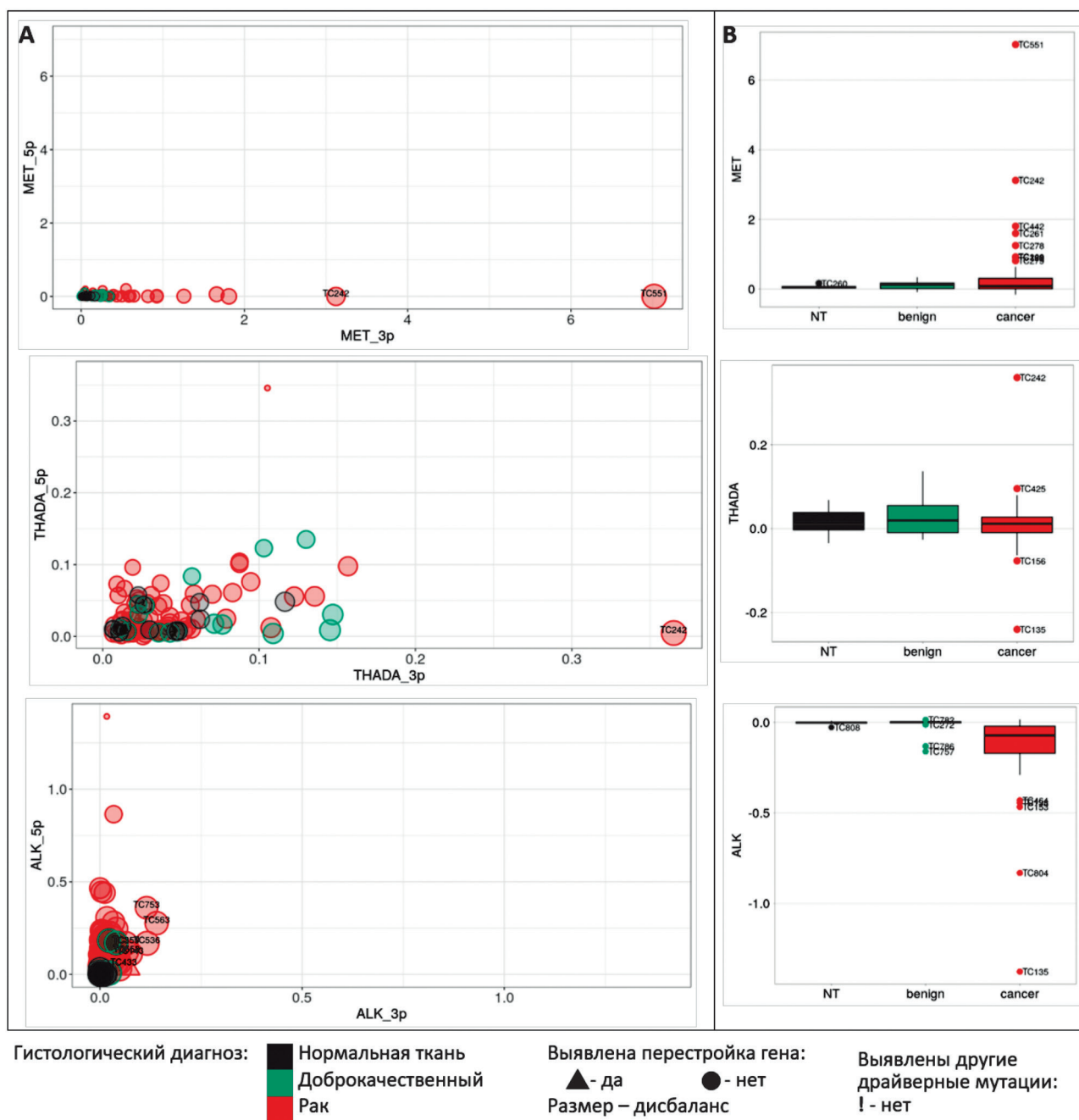


Рис. 1 (продолжение). 5'/3' дисбаланс экспрессии генов *MET*, *THADA* и *ALK*. А – количество прочтений на 3' (ось абсцисс) и 5' (ось ординат) регионы в каждом образце; В – 5'/3' дисбаланс экспрессии, посчитанный как разница количества прочтений на 5' и 3' регионы. Количество прочтений на анализируемые регионы нормализовалось на сумму прочтений на контрольные гены.

Fig. 1 (continued). 5'/3' imbalance in the expression of *MET*, *THADA* and *ALK* genes. А – number of reads in 3' (x-axis) and 5' (y-axis) regions in each sample; В – 5'/3' expression imbalance, calculated as the difference in the number of reads in the 5' and 3' regions. The number of reads per analyzed regions was normalized by the sum of reads per control genes.

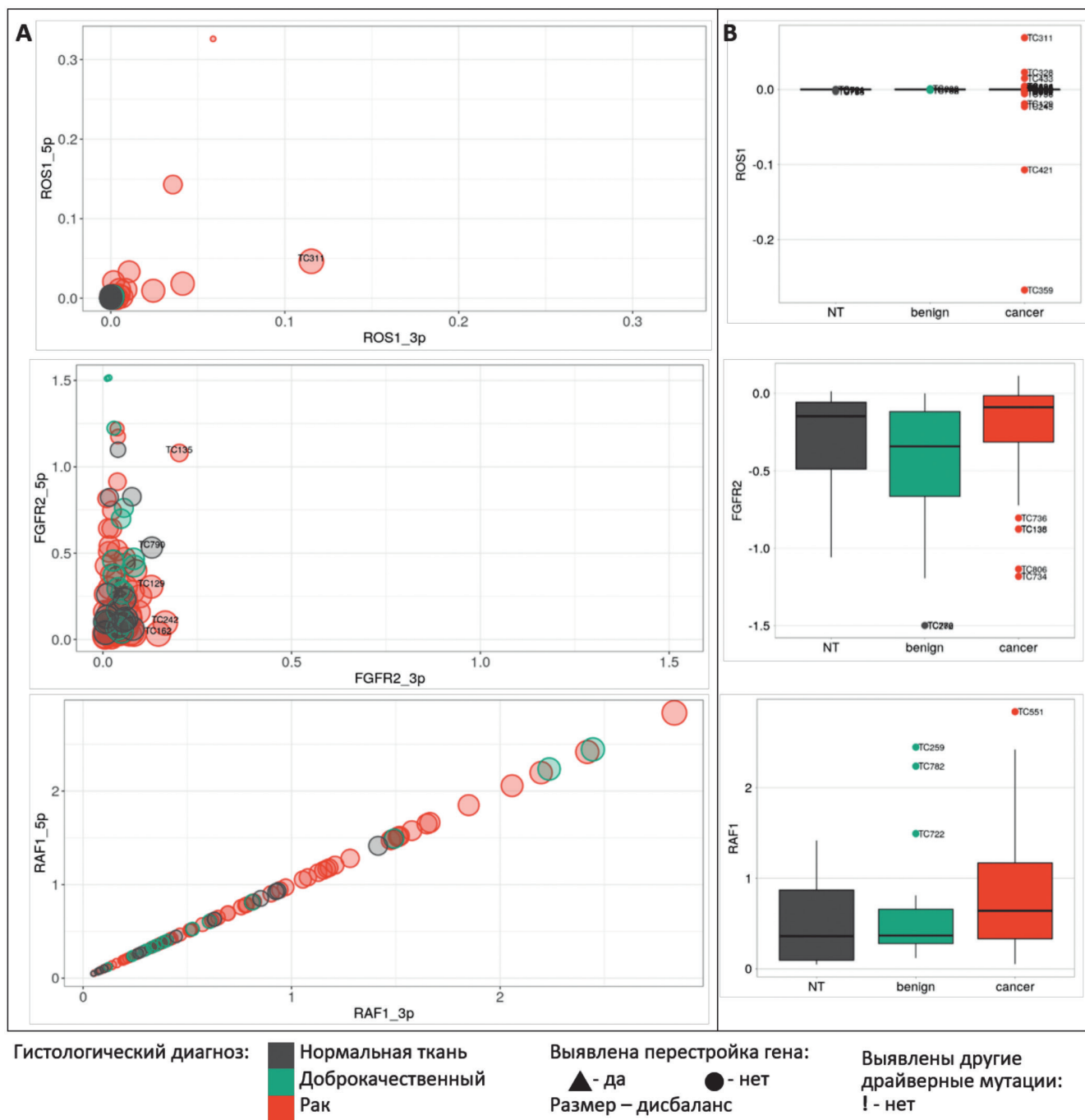


Рис. 1 (продолжение). 5'/3' дисбаланс экспрессии генов *ROS1*, *FGFR2* и *RAF1*. А – количество прочтений на 3' (ось абсцисс) и 5' (ось ординат) регионы в каждом образце; В – 5'/3' дисбаланс экспрессии, посчитанный как разница количества прочтений на 5' и 3' регионы. Количество прочтений на анализируемые регионы нормализовалось на сумму прочтений на контрольные гены.

Fig. 1 (continued). 5'/3' imbalance in the expression of *ROS1*, *FGFR2* and *RAF1* genes. А – number of reads in 3' (x-axis) and 5' (y-axis) regions in each sample; В – 5'/3' expression imbalance, calculated as the difference in the number of reads in the 5' and 3' regions. The number of reads per analyzed regions was normalized by the sum of reads per control genes.



Рис. 2. Уровни экспрессии генов в исследованных образцах. Количество прочтений на анализируемые регионы нормализовалось на сумму прочтений на контрольные гены.

Fig. 2. Gene expression levels in the studied samples. The number of reads per analyzed regions was normalized by the sum of reads per control genes.



Рис. 2. Уровни экспрессии генов в исследованных образцах. Количество прочтений на анализируемые регионы нормализовалось на сумму прочтений на контрольные гены.

Fig. 2. Gene expression levels in the studied samples. The number of reads per analyzed regions was normalized by the sum of reads per control genes.

KRT20, *CHGA*, *CITED1* наблюдается выраженная гиперэкспрессия в отдельных образцах рака щитовидной железы, данные гены могут рассматриваться в качестве потенциальных маркеров злокачественных новообразований. Гены *KLK1*, *PGK1*, *SUGCT*, *TRIM61*, *SLCSA5*, *NKX2.1* имеют менее выраженную тенденцию к гиперэкспрессии при раке щитовидной железы. Для генов *CALCA*, *JUN*, *SYN2*, *VHL*, *PTH* не наблюдается ассоциации гиперэкспрессии, оцененной с использованием разработанной панели, с раком щитовидной железы.

Обсуждение

Генные перестройки являются важными диагностическими маркерами рака щитовидной железы, а также мишенями для терапии ингибиторами соответствующих тирозинкиназ.

Методом таргетного высокопроизводительного секвенирования РНК проведено исследование перестроек генов *RET*, *ALK*, *NTRK1*, *NTRK3*, *PPARG*, *THADA*, *LTK*, *MET*, *BRAF*, *C15orf55*, *ERBB4*, *OFD1*, *ROS1*, 5'/3' дисбаланса экспрессии данных генов и экспрессионных маркеров в доброкачественных (16 образцов) и злокачественных (64 образца) новообразованиях щитовидной железы.

Перестройки выявлены в 12% исследованных случаев рака и включили *CCDC6-RET*, *ETV6-NTRK3*, *TPM3-NTRK1*, *STRN-ALK*, *PAX8-PPARG*. Наибольшая частота встречаемости наблюдалась для *CCDC6-RET* (3 образца) и *PAX8-PPARG* (2 образца), в то время как остальные перестройки выявлены по одному случаю. Все образцы с найденными перестройками были представлены папиллярным раком щитовидной железы, в образцах фолликулярного рака перестройки не выявлены. Преобладание перестроек *CCDC6-RET* и *PAX8-PPARG* соответствует данным литературы.

Выраженный 5'/3' дисбаланс в образцах рака определен для генов *RET*, *NTRK1*, *NTRK3*, *MET* и *THADA*. Совпадение 5'/3' дисбаланса экспрессии и перестроек соответствующих генов наблюдалось для гена *RET* в ряде образцов, *NTRK1* и *NTRK3*. Отсутствие детектирования перестроек при обнаружении 5'/3' дисбаланса может свидетельствовать о наличии в образцах новых перестроек, не покрываемых праймерами панели. Отсутствие 5'/3' дисбаланса экспрессии в доброкачественных образцах подтверждает специфичность данного косвенного подхода и потенциальную возможность его включения в тест для повышения эффективности

диагностики рака щитовидной железы с драйверными мутациями в виде химерных генов.

Среди исследованных экспрессионных маркеров гиперэкспрессия, ассоциированная со злокачественностью, наблюдалась для генов *KRT7*, *KRT20*, *CHGA*, *CITED1* при отсутствии абберантной экспрессии в доброкачественных новообразованиях. Включение данных маркеров в диагностическое тестирование может позволить повысить выявляемость злокачественных новообразований и предиктивную точность дооперационной дифференциальной диагностики, однако требует расширения исследуемой выборки и дополнительных валидационных исследований.

Благодарности. Высокопроизводительное секвенирование ДНК выполнено на оборудовании Центра коллективного пользования (ЦКП) «Геном» ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

Acknowledgments. High-throughput DNA sequencing was performed on the equipment of the Center for Collective Use (CPC) "Genome" of the Federal State Budgetary Institution "Medical Genetic Research Center named after Academician N.P. Bochkova".

Литература/References

1. Pellegriti G., Frasca F., Regalbuto C., et al. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol.* 2013;2013:965212. doi: 10.1155/2013/965212.
2. Vigneri R., Malandrino P., Vigneri P. The changing epidemiology of thyroid cancer: why is incidence increasing? *Curr Opin Oncol.* 2015;27(1):1-7. doi: 10.1097/CCO.0000000000000148.
3. Cooper D.S., Doherty G.M., Haugen B.R., et al. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19:1167–214.
4. Pacini F., Castagna M.G., Brilli L., Pentheroudakis G., ESMO Guidelines Working Group. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2012;23(Suppl.7):vii110–9.
5. Kebebew E., Greenspan F.S., Clark O.H., et al. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer.* 2005;103(7):1330-5.
6. Wendler J., Kroiss M., Gast K., et al. Clinical presentation, treatment and outcome of anaplastic thyroid carcinoma: results of a multicenter study in Germany. *Eur J Endocrinol.* 2016;175(6):521–529.
7. Bongiovanni M., Spitale A., Faquin W.C., et al. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: A meta-analysis. *Acta Cytol.* 2012;56(4):333–339. doi:10.1159/000339959.
8. Panebianco F., Nikitski A.V., Nikiforova M.N., et al. Characterization of thyroid cancer driven by known and novel ALK fusions. *Endocr Relat Cancer.* 2019;26(11):803–814. doi:10.1530/ERC-19-0325.
9. Doebele R.C., Drilon A., Paz-Ares L., et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours:

- integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol* 2020;21:271-282
10. National Comprehensive Cancer Network. Thyroid Carcinoma (Version 1.2023). http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/bone.pdf.
 11. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014; 159(3):676-690.
 12. Zehir A., Benayed R., Shah R.H., et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nature Medicine*. 2017; 23(6): 703–713.
 13. Rivera M., Ricarte-Filho J., Knauf J., et al. Molecular genotyping of papillary thyroid carcinoma follicular variant according to its histological subtypes (encapsulated vs infiltrative) reveals distinct BRAF and RAS mutation patterns. *Mod Pathol*. 2010; 23(9):1191–200.
 14. Armstrong M.J., Yang H., Yip L., Ohori N.P., et al. PAX8/PPAR γ rearrangement in thyroid nodules predicts follicular-pattern carcinomas, in particular the encapsulated follicular variant of papillary carcinoma. *Thyroid*. 2014; 24:1369–74.
 15. Nikiforova M.N., Biddinger P.W., Caudill C.M., et al. PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol*. 2002; 26(8):1016-23.
 16. Ohori N.P., Wolfe J., Hodak S.P., et al. “Colloid-rich” follicular neoplasm/suspicious for follicular neoplasm thyroid fine-needle aspiration specimens: cytologic, histologic, and molecular basis for considering an alternate view. *Cancer Cytopathol*. 2013; 121(12):718-28.
 17. Landa I., Ibrahimasic T., Boucai L., et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J Clin Invest*. 2016; 126(3):1052-66.
 18. Michuda J., Park B.H., Cummings A.L., et al. Use of clinical RNA-sequencing in the detection of actionable fusions compared to DNA-sequencing alone. *Journal of Clinical Oncology* 2022; 40:16(suppl): 3077.
 19. Marchiò C., Scaltriti M., Ladanyi M., et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol*. 2019;30(9):1417-1427. doi: 10.1093/annonc/mdz204.