Check for updates

Возможности использования свободно циркулирующей ДНК плазмы крови в дооперационной диагностике при новообразованиях щитовидной железы

© В.А. Качко[1]*, В.Э. Ванушко[2], Н.М. Платонова[1, 2], А.Ю. Абросимов[2], Е.Н.Телышева[3], Г.П. Снигирева[3]

[1]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия
[2]Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва, Россия
[3]Российский научный центр рентгенорадиологии, Москва, Россия

Обоснование. Целесообразность использования молекулярно-генетических маркеров для диагностики новообразований щитовидной железы (ЩЖ) и прогнозирования течения рака щитовидной железы (РЩЖ) активно исследуется. Наибольший интерес представляют гены, мутации в которых ассоциированы не только с РЩЖ, но и с более агрессивным течением заболевания. Разработка и внедрение в практику методов определения молекулярно-генетических маркеров, основанных на исследовании свободно циркулирующей ДНК опухолевой ткани в плазме крови, является современным направлением медицины.
Цель: оценить встречаемость соматических мутаций в «горячих точках» генов *BRAF, NRAS, EIF1AX* и *TERT* в циркулирующей ДНК плазмы крови.
Методы. В исследование включено 153 пациента. Образцы ДНК, экстрагированной из удаленной опухолевой и неопухолевой ткани ЩЖ, тестировали на наличие соматических мутаций в «горячих точках» генов *BRAF, KRAS, NRAS, EIF1AX* и *TERT,* а далее при выявлении мутации тестировали соответствующие образцы свободно циркулирующей ДНК плазмы крови.
Результаты. Мутации в «горячих точках» гена *BRAF* (экзон 15, район кодонов 600–601) были обнаружены в 54 случаях, мутации в «горячих точках» гена *NRAS* (экзон 3, кодон 61) – в 12 случаях; мутации в горячих точках генов *KRAS, TERT* и *EIF1AX* выявлены не были. В свободно циркулирующей ДНК плазмы крови мутации гена *BRAF* были выявлены в 1 случае, мутации гена *NRAS* были выявлены в 1 случае.
Заключение. Использование свободно циркулирующей ДНК плазмы крови при тестировании исследованной выборки не показало целесообразности для диагностики новообразований щитовидной железы.

***Ключевые слова**: новообразования щитовидной железы, рак щитовидной железы, свободно циркулирующая ДНК, молекулярно-генетические исследования, мутации, горячие точки, BRAF, KRAS, NRAS, EIF1AX, TERT.*

The possibility of using freely circulating DNA blood plasma in preoperative diagnosis of thyroid tumors

© Vera A. Kachko[1]*, Vladimir E. Vanushko[2], Nadezhda M. Platonova[1, 2], Alexander Yu. Abrosimov[4], Ekaterina N. Tely`sheva[3], Galina P. Snigireva[3]

[1]I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia
[2]Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia
[3]Russian Research Center of Roentgenoradiology, Moscow, Russia

BACKGROUND. The feasibility of using molecular genetic markers for the diagnosis of thyroid tumors and the impact on the prognosis of thyroid cancer are being actively investigated. The most interesting are genes, the detection of which is associated not only with thyroid cancer, but also with a more aggressive course of the disease. The ability to diagnose the molecular profile of minimally invasive methods with the study of freely circulating DNA tumor tissue in blood plasma is a modern trend of medicine.
AIMS: to evaluate the frequency of somatic mutations in the «hot spots» of *BRAF, KRAS, KRAS, EIF1AX* and *TERT* genes in circulating DNA of blood plasma.
MATERIALS AND METHODS. Samples of DNA, extracted from the removed tumor and non-tumor thyroid tissue, were tested for the presence of somatic mutations in hot spots of the genes *BRAF, KRAS, NRAS*, *TERT,* and *EIF1AX* and then in identifying mutations and testing appropriate samples of free circulating DNA in blood plasma.
RESULTS. mutations in the» hot spots «of the *BRAF* gene (exon 15, codon area 600-601) were found in 54 patients, mutations in the» hot spots « of the *NRAS* gene (exon 3, codon 61) – in 12 patients; mutations in the hot spots of the *KRAS, TERT* and *EIF1AX* genes were not detected. In freely circulating blood plasma DNA, *BRAF* gene mutations were detected in 1 case, *NRAS* gene mutations were detected in 1 case.
CONCLUSIONS. the use of freely circulating DNA of blood plasma in the testing of the studied sample did not show the feasibility for the diagnosis of thyroid tumors.

***Keywords**: thyroid tumors, thyroid cancer, freely circulating DNA, molecular testing, somatic mutations, hot spots, BRAF, KRAS, NRAS, TERT, EIF1AX.*

Обоснование

Диагностика новообразований щитовидной железы (ЩЖ) остается актуальной проблемой, особенно когда речь идет о подгруппе фолликулярных опухолей [1]. Выбор тактики лечения пациентов с учетом индивидуальных молекулярно-генетических характеристик опухоли лежит в основе персонифицированной медицины. Возможности использования молеку-

Copyright © 2019 by the MediaSphere
Licensee: CC BY-NC-ND
doi: 10.14341/probl11311

Проблемы эндокринологии 2019. – Т. 65. – №6. – С. 400–407
Problems of Endocrinology 2019;65(6):400-407

лярно-генетического тестирования широко исследуются в настоящее время. Наиболее часто для данных тестов используют ДНК, выделенную из гистологических срезов или цитологического материала.

Анализ внеклеточной ДНК (жидкостная биопсия) – перспективное направление в современной медицине, особенно в онкологии. Такое исследование позволяет преодолеть ограничения, связанные с получением образцов опухолевой ткани и работой с ними, являясь идеальным инструментом для анализа молекулярно-генетических нарушений у пациентов [2]. Взятие пробы крови является минимально инвазивной процедурой, которая может быть осуществлена в любое время, как до начала лечения, так и в течение курса терапии, что позволяет наблюдать за молекулярными изменениями в опухоли в динамике [3, 4].

При развитии онкологических заболеваний содержание сцДНК в крови достоверно повышается, но при этом не зависит от локализации опухоли [5]. Имеются данные о связи содержания свободно циркулирующей ДНК (сцДНК) в крови с клиническим течением онкологического заболевания [6]. Более высокое по сравнению с нормой содержание сцДНК в крови часто наблюдается уже на ранних стадиях опухолевого процесса, а также может резко возрастать при метастазировании [7]. Концентрация сцДНК может сильно отличаться у разных пациентов [8]. Содержание циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) в плазме крови крайне низкое: ее количество зависит от стадии заболевания и часто составляет менее 1% от общего количества сцДНК [8, 9]. В связи с этим для обнаружения молекулярно-генетических нарушений в цоДНК необходимы высокочувствительные методы анализа, такие как секвенирование нового поколения (next generation sequencing, NGS) и цифровая полимеразная цепная реакция (ПЦР; droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR). Высокая чувствительность этих методов при анализе соматических мутаций в сцДНК плазмы крови была подтверждена неоднократно [10–12]. Однако их рутинное применение в онкологии ограничено из-за крайне высокой стоимости одного исследования. Одним из перспективных методов анализа сцДНК плазмы крови является метод усиленной аллель-специфической ПЦР, разработанный компанией «Евроген» (Россия) специально для работы с биологическими образцами, содержащими небольшое количество мутантной ДНК. Принцип метода заключается в сочетании аллель-специфической ПЦР с блокадой амплификации аллеля «дикого типа» – так же, как при использовании метода мутационно-специфической ПЦР [13, 14].

Обнаружение мутаций в горячих точках генов *BRAF, KRAS, NRAS, EIF1AX, TERT* ассоциировано с раком ЩЖ (РЩЖ) и с более агрессивным течением заболевания. В нашем исследовании мы решили оценить возможность использования панели соматических мутаций в клинической практике.

Цель

Оценить встречаемость соматических мутаций в «горячих точках» генов *BRAF, KRAS, NRAS, EIF1AX* и *TERT* в сцДНК плазмы крови, взятой до оперативного вмешательства, у пациентов с узловыми образованиями ЩЖ, у которых в гистологическом материале обнаружена соответствующая мутация.

Методы

Дизайн исследования

Проведено проспективное наблюдательное когортное выборочное одноцентровое открытое контролируемое нерандомизированное клиническое исследование, схема представлена на **рис. 1**.

Критерии соответствия

Критериями исключения для всех групп были: некомпенсированный тиреотоксикоз, проведенная

Рис. 1. **Схема исследования.**

 DOI: https://doi.org/10.14341/probl11311

ранее операция на ЩЖ, отягощенный анамнез по наследственным и семейным формам заболеваний ЩЖ, повышенная концентрация кальцитонина.

Условия проведения

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

Продолжительность исследования

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

Описание медицинского вмешательства

Все пациенты до включения в исследование получали «Информацию для пациента и информированное согласие для участия в клиническом исследовании». Участие было добровольным. Всем пациентам проводили лабораторно-инструментальный комплекс для подготовки, проведения и послеоперационного наблюдения. Всем пациентам проводили молекулярно-генетическое исследование гистологического материала, парафиновых блоков с операционным материалом и плазмы крови до и после операции. Гистологический материал был предоставлен в виде парафиновых блоков с операционным материалом. Для выделения сцДНК проводили 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.

Основной исход исследования

Конечной точкой исследования был показатель встречаемости соматических мутаций в «горячих точках» генов *BRAF, KRAS, NRAS, EIF1AX* и *TERT* в сцДНК плазмы крови.

Дополнительный исход исследования

Дополнительной конечной точкой была встречаемость соматических мутаций в «горячих точках» генов *BRAF, KRAS, NRAS, EIF1AX* и *TERT* в гистологическом материале.

Методы регистрации исходов

Выделение ДНК из срезов с парафиновых блоков осуществляли с помощью набора реагентов «Экстракт ДНК FFPE» (ЗАО «Евроген», Москва, РФ) 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. ДНК, выделенная из образцов, по концентрации и качеству соответствовала критериям для достоверного ПЦР-анализа мутаций.

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.

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

Поиск мутаций в «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 других «горячих точках» гена *NRAS* (экзон 2, район кодонов 12 и 13; экзон 3, район кодона 59; экзон 4, район кодонов 117 и 146) и в «горячих точках» гена *KRAS* (экзон 2, район кодонов 12 и 13; экзон 3, район кодонов 59 и 61; экзон 4, район кодонов 117 и 146) в ДНК части образцов 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 *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*.

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 сцДНК 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 сцДНК плазмы крови проводили методом высокочувствительной мутационно-специфической ПЦР-РВ в модификации усиленной аллель-специфической ПЦР-РВ с

одновременным подавлением амплификации аллелей «дикого типа». Использовали наборы реагентов серии «СуперИнсайдер» (ООО «Евроген Лаб», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Этическая экспертиза

Протокол исследования был одобрен Межвузовским Комитетом по Этике. Выписка из протокола №02-12 от 16.02.12.

Статистический анализ

Размер выборки был рассчитан для уровня статистической значимости не менее 95% с ДИ±5%. Расчетный минимальный размер выборки составил 83 пациента. Учитывая небольшие объемы выборок и распределения, отличающиеся от нормального, были использованы непараметрические методы анализа данных. Статистическая обработка результатов исследования выполнена с использованием пакета прикладных программ Statistica v 10.0 for Windows (Dell, США). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. Встречаемость выражена в абсолютных и относительных числах (доли, проценты). Значимость молекулярных тестов оценивалась на основе отрицательной и положительной прогностической ценности каждого теста.

Результаты

Объекты (участники) исследования

В исследование включено 153 пациента. Распределение пациентов по группам на основании гистологического заключения представлено на **рис. 2**.

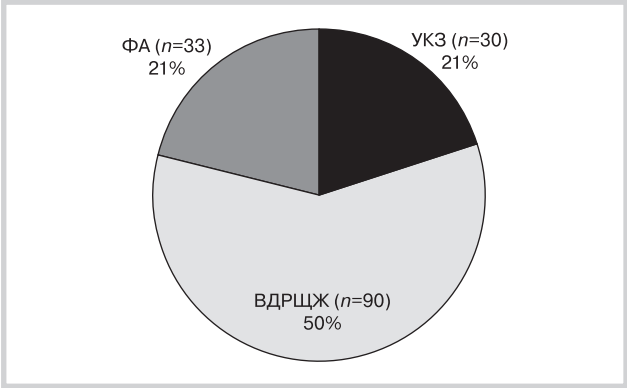

Рис. 2. **Распределение пациентов по группам на основании гистологического заключения (*n*=153, %).**

Основные результаты исследования

Молекулярное тестирование гистологического материала

BRAF, NRAS. Поиск мутаций в «горячих точках» гена *BRAF* (экзон 15, район кодонов 600–601) выполнен на образцах ДНК, выделенной из гистологического материала 153 пациентов. Мутации обнаружены в 54 случаях. Поиск мутаций в «горячих точках» гена *NRAS (*экзон 3, район кодона 61) выполнен на образцах ДНК, выделенной из гистологического материала 153 пациентов. Мутации обнаружены в 12 случаях.

KRAS, EIF1AX, TERT. Мутации в других «горячих точках» гена *NRAS* (экзон 2, район кодонов 12 и 13; экзон 3, район кодона 59; экзон 4, район кодонов 117 и 146), а также в «горячих точках» гена *KRAS* (экзон 2, район кодонов 12 и 13; экзон 3, район кодонов 59 и 61; экзон 4, район кодонов 117 и 146), *EIF1AX* (экзоны1, 2 и 6) и *TERT* (транскрипт NM_198253.2, промоторная область, район позиций c.1-146 – c.1-124) не обнаружены ни в одном образце.

Молекулярное тестирование плазмы крови

BRAF, NRAS. Поиск мутаций в «горячих точках» гена *BRAF* (экзон 15, район кодонов 600–601) и *NRAS* (экзон 3, район кодона 61) на образцах ДНК, выделенной из плазмы крови до операции, выполнен у 66 пациентов. Поиск мутаций производился только в образцах крови пациентов, у которых по данным молекулярно-генетического тестирования гистологического материала были выявлены таргетные мутации генов *BRAF* и *NRAS*.

Мутация *BRAF* c.1799T>A, p.(Val600Glu, V600E) [COSMIC ID 476] обнаружена в 1 случае. Данные представлены в **табл. 1**. По результатам гистологического исследования операционного материала у этого пациента с мутацией в гене *BRAF* был выявлен ПРЩЖ.

Таблица 1. **Частота встречаемости мутаций в «горячих точках» гена *BRAF* (экзона 15, район кодонов 600–601) в плазме крови**

Вариант мутации	Мутации в плазме крови (*n*=54, n *Braf*+=1 (1,8%))
Нет мутации (дикий тип)	53
c.1799T>A, p.(Val600Glu, V600E) [COSMIC ID 476]	1

Таблица 2. **Частота встречаемости мутаций в «горячих точках» гена *NRAS* (экзон 3, район кодона 61) в плазме крови**

Вариант мутации	Мутации в плазме крови (*n*=12, n *Nras*+=1 (8,3%))
Нет мутации (дикий тип)	11
c.182A>G, p. (Gln61Arg, Q61R) [COSMIC ID 584]	1

 DOI: https://doi.org/10.14341/probl11311

Мутация *NRAS* c.181C>A, p.(Gln61Lys, Q61K) [COSMIC ID 580] обнаружена в 1 случае. Данные представлены в **табл. 2**. По результатам гистологического исследования операционного материала был выявлен УКЗ.

Таким образом, позитивная прогностическая ценность мутационного теста по гену *BRAF,* выполняемого в плазме крови, в отношении злокачественного характера опухоли ЩЖ составила PPV=(1/54)=1,8%. Прогностическая ценность мутационного теста по гену *NRAS,* выполняемого в плазме крови, в отношении злокачественного характера опухоли ЩЖ составила PPV=0%. Прогностическая ценность отрицательного результата данного теста по гену *NRAS* в отношении доброкачественного характера опухоли ЩЖ составила NPV=(1/12)=8,3%.

Нежелательные явления

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

Обсуждение

Резюме результатов исследования

По результатам молекулярно-генетического исследования плазмы крови можно сделать следующие выводы:

– частота обнаружения мутации BRAF в общей когорте составила 1,8%;

– частота обнаружения мутации NRAS в общей когорте составила 8,3%;

– встречаемость мутаций в сцДНК плазмы крови при новообразованиях ЩЖ крайне мала и имеет низкую предсказательную силу как в отношении доброкачественного, так и злокачественного характера опухоли.

По результатам молекулярно-генетического исследования гистологического материала можно сделать следующие выводы:

– частота обнаружения мутации BRAF в общей когорте составила 35,3%;

– частота обнаружения мутации NRAS в общей когорте составила 7,8%;

– не были обнаружены мутации в других «горячих точках» гена NRAS и генов KRAS, TERT, EIF1AX;

Обсуждение результатов исследования

Исследованные нами мутации в горячих точках генов *BRAF, KRAS, NRAS, EIF1AX, TERT*, согласно данным литературы, ассоциированы с РЩЖ и с более агрессивным течением заболевания [15].

Ген *BRAF* кодирует цитоплазматический белок, участвующий во внутриклеточной передаче сигнала от рецепторов факторов роста. Мутации гена *BRAF* чаще всего локализуются в 15-м экзоне гена *BRAF* (кодоны 600-601), реже встречаются «неклассические» мутации в 11-м и 15-м экзонах гена *BRAF* (в районе кодонов 469, 570-598, 603-605) [16, 17]. Данные исследований прогностической значимости мутаций гена *BRAF* свидетельствуют о том, что в целом *BRAF V600E*-позитивные опухоли имеют более высокий риск агрессивного течения заболевания, рецидива и смертности [18, 19]. В нашем исследовании частота выявления мутаций сходна с данными литературы, и наиболее частым вариантом мутации была c.1799T>A, p.(Val600Glu, V600E) [COSMIC ID 476], которая и выявлена в 1 случае в сцДНК плазмы крови.

Согласно данным обзора G. Howell 2013 г. [20], мутации *RAS* являются вторыми по распространенности после *BRAF,* однако их роль до конца не понятна, поскольку они встречаются при всех патоморфологических типах новообразований ЩЖ – от доброкачественных до анапластического рака. Гены *NRAS* и *KRAS* кодируют цитоплазматические белки, участвующие во внутриклеточной передаче сигнала от рецепторов факторов роста.

Ген *NRAS* относится к протоонкогенам; примерно в 15% случаев злокачественных опухолей человека обнаруживаются активирующие соматические мутации в этом гене, которые чаще всего локализуются в экзоне 3 (кодоны 59 и 61) и реже в экзоне 2 (кодоны 12 и 13) или в экзоне 4 (кодоны 117 и 146). В нашем исследовании частота выявления мутаций сходна с данными литертуры, и наиболее частым вариантом мутации была c.182A>G, p. (Gln61Arg, Q61R) [COSMIC ID 584], которая выявлена в 1 случае в сцДНК плазмы крови.

Ген *KRAS* относится к протоонкогенам; примерно в 30–40% случаев злокачественных опухолей человека обнаруживаются активирующие соматические мутации в этом гене, которые чаще всего локализуются в экзоне 2 (кодоны 12 и 13) и реже в экзоне 3 (кодоны 59 и 61) или в экзоне 4 (кодоны 117 и 146) [16, 17, 20].

Ген *TERT* кодирует каталитическую субъединицу теломеразной обратной транскриптазы – ядерный белок, выполняющий ключевую роль в реакции поддержания длины теломер.

Мутации в гене *TERT* ассоциированы с более агрессивным течением РЩЖ, а в сочетании с мутацией *BRAF V600E* или другими генетическими маркерами (например, мутациями *RAS*) оказываются еще более клинически значимыми при РЩЖ [21–23]. Сосуществующие мутации промотора *TERT* и мутация *V600E* гена *BRAF* оказывают сильное синергетическое влияние на агрессивность ПРЩЖ, включая увеличение риска рецидива и смертности пациентов, в то время как любая мутация сама по себе оказывает «скромное» влияние [24–27].

Ген *EIF1AX* кодирует цитоплазматический белок, участвующий в трансляции (синтезе белка на матри-

це мРНК). Мутации гена *EIF1AX* были обнаружены ранее только при ПРЩЖ и анапластическом РЩЖ. Распространенность этих мутаций при других видах рака щитовидной железы и в доброкачественных новообразованиях была неизвестна. Однако в исследовании A. Karunamurthy 2016 г. [28] было показано, что мутации *EIF1AX* обнаруживаются не только при раке щитовидной железы, но и при доброкачественных новообразованиях. Кроме того, в нескольких случаях РЩЖ было обнаружено сочетание мутаций в генах *EIF1AX* и *RAS*. Так, при фолликулярных опухолях щитовидной железы одновременное обнаружение мутаций в генах *EIF1AX* и *RAS* однозначно говорит о злокачественном характере опухоли. При анапластическом раке щитовидной железы наличие мутации в гене *EIF1AX* является предиктором особенно агрессивного течения заболевания [28].

В нашем исследовании отсутствие мутаций в «горячих точках» генов *NRAS, KRAS*, *TERT* и *EIF1AX,* возможно, связано с выбором пациентов, включенных в исследование, поскольку исходно набирали пациентов с ВДРЩЖ низкого риска [29, 30], а также пациентов с НОЩЖ или УКЗ, для которых не характерно агрессивное течение заболевания, с которым связывают выявление данных маркеров.

В нашем исследовании частота выявленных мутаций в гене *BRAF* и в гене *NRAS* в сцДНК плазмы крови составило всего по 1 случаю каждой мутации. Может существовать несколько причин такой низкой частоты выявленных мутаций. Согласно данным литературы, наиболее часто выявление опухолевой сцДНК плазмы крови ассоциировано с более агрессивными формами рака: колоректальный рак, немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, рак яичников. Данные по исследованию сцДНК при РЩЖ в литературе практически не встречаются. Кроме того, выявлены ассоциации между более агрессивным течением заболевания с рецидивирующим течением, метастазированием и выявлением мутаций в сцДНК опухолевой ткани. Поэтому, возможно, низкая частота выявления мутаций в нашем исследовании связана с тем, что в исследование были включены пациенты с ВДРЩЖ низкого риска, НОЩЖ и УКЗ, что предполагает благоприятный прогноз у данных пациентов.

Во-вторых, возможно, метод, использованный для выявления мутаций и применением сочетания аллель-специфической ПЦР с блокадой амплификации аллеля «дикого типа» имеет недостаточную чувствительность.

Для решения данного вопроса необходимы дополнительные исследования, поскольку неинвазивный мониторинг течения заболевания с использованием молекулярно-генетических исследований – одно из перспективных направлений при персонализированном подходе к лечению пациента, который возможно применять не только для диагностики заболевания, но и для наблюдения за пациентом в динамике.

Ограничения исследования

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

Заключение

Использование свободно циркулирующей ДНК плазмы крови при тестировании исследованной выборки не показало целесообразности для диагностики малых опухолей щитовидной железы.

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

Дополнительная информация

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

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

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

Информация о вкладе каждого автора: В.А. Качко – проведение исследования, сбор и обработка материалов, анализ полученных данных и написание текста; В.Э. Ванушко – концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных и написание текста; Н.М. Платонова – анализ полученных данных и написание текста; Ю.А. Абросимов – анализ полученных данных и написание текста; Г.П. Снегирева – анализ полученных данных и написание текста; Е.Н. Телышева – обработка материала, анализ полученных данных и написание текста. Все авторы внесли значимый вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. 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 г. *Эндокринная хирургия*. 2017;11:1:6-27.

Beltsevich DG, Vanushko VE, Rumyantsev PO i dr. 2017 Russian clinical practice guidelines for differentiated thyroid cancer diagnosis and treatment. *Endocrine Surgery*. 2017;11(1):6-27. (In Russ.). doi: https://doi.org/10.14341/serg201716-27

2. Ma M, Zhu H, Zhang C, et al. «Liquid biopsy» – ctDNA detection with great potential and challenges. *Ann Transl Med.* 2015;3(16):235. doi: https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.09.29
3. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol.* 2014;32(6):579-586. doi: https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2011
4. Beije N, Helmijr JC, Weerts MJ, et al. Somatic mutation detection using various targeted detection assays in paired samples of circulating tumor DNA, primary tumor and metastases from patients undergoing resection of colorectal liver metastases. *Mol Oncol.* 2016;10(10):1575-1584. doi: https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.10.001
5. Захаренко А.А., Зайцев Д.А., Беляев М.А. и др. Возможности жидкой биопсии при раке желудка. *Вопросы онкологии.* 2016;62:4:379-385. Zakharenko AA, Zaitsev DA, Belyaev MA i dr. Possibilities of liquid biopsy in gastric cancer. *Problems in oncology.* 2016;62(4):379-385. (In Russ.).
6. Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. Циркулирующие ДНК крови и их использование в медицинской диагностике. *Молекулярная биология.* 2008;42:1:12-23. Tamkovich SN, Vlassov VV, Laktionov PP. Circulating DNA in the blood and its application in medical diagnosis. *Molekuliarnaia biologiia.* 2008;42(1):12-23. (In Russ.).
7. Васильева И.Н., Беспалов В.Г. Роль внеклеточной ДНК в возникновении и развитии злокачественных опухолей и возможности ее использования в диагностике и лечении онкологических заболеваний. *Вопросы онкологии.* 2013;59:6:673-681. Vasilyeva IN, Bespalov VG. Role of extracellular DNA in the appearance and development of malignant tumors and possibilities of its use in the diagnosis and treatment of cancer. *Problems in oncology.* 2013;59(6):673-681. (In Russ.).
8. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008;14(9):985-990. doi: https://doi.org/10.1038/nm.1789
9. Holdhoff M, Schmidt K, Donehower R, Diaz LA. Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic KRAS mutations. *J Natl Canc Inst.* 2009;101(18):1284-1285. doi: https://doi.org/10.1093/jnci/djp240
10. Chen KZ, Lou F, Yang F, et al. Circulating tumor DNA detection in early-stage non-small cell lung cancer patients by targeted sequencing. *Sci Rep.* 2016;6:31985. doi: https://doi.org/10.1038/srep31985
11. Rachiglio AM, Esposito Abate R, Sacco A, et al. Limits and potential of targeted sequencing analysis of liquid biopsy in patients with lung and colon carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(41):66595-66605. doi: https://doi.org/10.18632/oncotarget.10704
12. Tu M, Chia D, Wei F, Wong D. Liquid biopsy for etection of actionable oncogenic mutations in human cancers and electric field induced release and measurement liquid biopsy (eLB). *Analyst.* 2016;141(2):393-402. doi: https://doi.org/10.1039/c5an01863c
13. Белоусова А.В., Дрозд О.В., Зарецкий А.Р. *Мутационно-специфическая полимеразная цепная реакция для анализа мутаций в «горячих точках» генов K-Ras и B-Raf в биологических образцах онкологических больных.* Сборник тезисов конференции «Современные принципы диагностики и лечения колоректального рака», посвященной памяти проф. В.И. Кныша; Москва, 26–27 мая 2011 г. М. 2011;16. Belousova AV, Drozd OV, Zaretskii AR. *Mutatsionno-spetsificheskaya polimeraznaya tsepnaya reaktsiya dlya analiza mutatsii v «goryachikh tochkakh» genov K-Ras i B-Raf v biologicheskikh obraztsakh onkologicheskikh bol'nykh.* In: Proceedings of the conference «Sovremennye printsipy diagnostiki i lecheniya kolorektal'nogo raka», posvyashchennoi pamyati prof. V.I. Knysha; Moscow, 26–27 May 2011. M. 2011;16. (In Russ.).
14. Телышева Е.Н., Снигирева Г.П. Анализ соматических мутаций в генах Ras- каскада свободно циркулирующей ДНК плазмы крови пациентов с колоректальным раком методом усиленной аллель-специфической ПЦР в «реальном времени». *Вестник Российского государственного медицинского университета.* 2017;4:14-20. Teplysheva EN, Snigireva GP. The use of wild-type blocking allele-specific real-time polymerase chain reaction for the analysis of somatic mutations in RAS genes of circulating free DNA isolated from the blood plasma of patients with colorectal cancer. *Bulletin of RSMU.* 2017;4:14-20. (In Russ.).
15. Качко В.А., Семкина Г.В., Платонова Н.М. и др. Диагностика новообразований щитовидной железы. *Эндокринная хирургия.* 2018;12:3:109-127. Kachko VA, Semkina GV, Platonova NM, et al. Diagnosis of thyroid neoplasms: state of the art on 2018. *Endocrine Surgery.* 2018;12(3):109-127. (In Russ.). doi: https://doi.org/10.14341/serg9977
16. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(3):184-199. doi: https://doi.org/10.1038/nrc3431
17. Younis E. Oncogenesis of thyroid cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(5):1191-1199. doi: https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.5.1191
18. 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. *Medicine (Baltimore).* 2012;91(5):274-286. doi: https://doi.org/10.1097/MD.0b013e31826a9c71
19. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA.* 2013;309(14):1493-1501. doi: https://doi.org/10.1001/jama.2013.3190
20. Howell GM, Hodak SP, Yip L. RAS mutations in thyroid cancer. *Oncologist.* 2013;18(8):926-932. doi: https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0072
21. Gandolfi G, Ragazzi M, Frasoldati A, et al. TERT promoter mutations are associated with distant metastases in papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2015;172(4):403-413. doi: https://doi.org/10.1530/EJE-14-0837
22. Liu X, Qu S, Liu R, et al. TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(6):1130-1136. doi: https://doi.org/10.1210/jc.2013-4048
23. Liu T, Yuan X, Xu D. Cancer-specific telomerase reverse transcriptase (TERT) promoter mutations: biological and clinical implications. *Genes (Basel).* 2016;7(7):38. doi: https://doi.org/10.3390/genes7070038
24. Liu X, Bishop J, Shan Y, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(4):603-610. doi: https://doi.org/10.1530/ERC-13-0210
25. Liu R, Xing M. TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2016;23(3):143-155. doi: https://doi.org/10.1530/ERC-15-0533
26. Jin A, Xu J, Wang Y. The role of TERT promoter mutations in postoperative and preoperative diagnosis and prognosis in thyroid cancer. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(29):11548. doi: https://doi.org/10.1097/MD.0000000000011548
27. Abdullah MI, Junit SM, Ng KL, et al. Papillary thyroid cancer: genetic alterations and molecular biomarker investigations. *Int J Med Sci.* 2019;16(3):450-460. doi: https://doi.org/10.7150/ijms.29935
28. 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: https://doi.org/10.1530/ERC-16-0043

29. 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 VA, Zaretsky AR, Vanushko VE, et al. Somatic mutation testing: the role in differential diagnosis of thyroid neoplasms. *Endocrine Surgery.* 2019;13(1):26-41. (In Russ.).
doi: https://doi.org/10.14341/serg10181
30. Качко В.А., Ванушко В.Э., Платонова Н.М. Прогностическое значение тестирования соматических мутаций и различных методов лечения при высокодифференцированном раке щитовидной железы низкого риска. *Эндокринная хирургия*. 2019;13:2:75-88.
Kachko VA, Vanushko VE, Platonova NM. Prognostic value of somatic mutation testing and different methods of treatment of low risk differentiated thyroid cancer. *Endocrine surgery.* 2019;13(2):75-88. (In Russ.).
doi: https://doi.org/10.14341/serg10220
31. cancer.sanger.ac.uk [Internet]. COSMIC, the Catalogue of Somatic Mutations In Cancer [cited 2018 Dec 12]. Available from: https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
32. ensembl.org [Internet]. Genome browser [cited 2018 Dec 12]. Available from: http://www.ensembl.org

Рукопись получена: 01.10.2019
Одобрена к публикации: 29.01.2020
Опубликована online: 31.01.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

***Качко Вера Александровна** [**Vera A. Kachko**, MD]; адрес: Россия, 117036, Москва, улица Дм. Ульянова, д. 11 [address: 11 Dm. Ulyanova street, 117036 Moscow, Russia]; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0617-7312; eLibrary SPIN: 5869-7470; e-mail: Veraf246@gmail.com
Ванушко Владимир Эдуардович, д.м.н. [**Vladimir E. Vanushko**, MD, PhD]; ORCID: http://orcid.org/0000-0001-6338-7490; eLibrary SPIN: 6097-8990; e-mail: vanushko@gmail.com
Платонова **Надежда Михайловна**, д.м.н. [**Nadezhda M. Platonova**, MD, PhD]; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6388-1544; eLibrary SPIN: 4053-3033; e-mail: doc-platonova@inbox.ru
Абросимов Александр Юрьевич, д.м.н., профессор [**Aleksandr Yu. Abrosimov,** MD, PhD]; ORCID: http://orcid.org/0000-0001-8284-9996; eLibrary SPIN: 4089-9502; e-mail: nikitarusskikh@mail.ru
Снигирева Галина Петровна, д.б.н., профессор [**Galina. P. Snigireva**, Dr, PhD]; ORCID: http://orcid.org/0000-0002-2584-802X; eLibrary SPIN: 4247-0600; e-mail: sni_gal@mail.ru
Телышева Екатерина Николаевна, к.б.н. [**Ekaterina N. Tely'sheva**, researcher]; ORCID: http://orcid.org/ 0000-0002-0370-8667; eLibrary SPIN: 8700-1335; e-mail: telisheva_k@mail.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Качко В.А., Ванушко В.Э., Платонова Н.М., Абросимов А.Ю., Снигирева Г.П., Телышева Е.Н. Возможности использования свободно циркулирующей ДНК плазмы крови в дооперационной диагностике при новообразованиях щитовидной железы. *Проблемы эндокринологии*. 2019;65:6:400-407. doi: https://doi.org/10.14341/probl11311

TO CITE THIS ARTICLE:

Kachko VA, Vanushko VE, Platonova NM, Abrosimov AY, Snigireva GP, Tely`sheva EN. The possibility of using freely circulating DNA blood plasma in preoperative diagnosis of thyroid tumors. *Problems of Endocrinology.* 2019;65(6):400-407. doi: https://doi.org/10.14341/probl11311