

Для цитирования: Дрибноходова О.П., Дунаева Е.А., Лешкина Г.В., Ярыгина Е.А., Бухарина А.Ю., Войцеховская Я.А., Борисова Э.В., Бормотова С.К., Дауд А.И., Хлявич В.Н., Миронов К.О. Выявление соматических мутаций в гене *BRAF* методом пиросеквенирования. Сибирский онкологический журнал. 2021; 20(5): 75–83. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-5-75-83

For citation: Dribnokhodova O.P., Dunaeva E.A., Leshkina G.V., Yarygina E.A., Bukharina A.Yu., Voicsehovskaya Ya.A., Borisova E.V., Bormotova S.K., Daoud A.I., Khlavich V.N., Mironov K.O. Detection of somatic mutations in the *BRAF* gene by pyrosequencing. Siberian Journal of Oncology. 2021; 20(5): 75–83. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-5-75-83

## ВЫЯВЛЕНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *BRAF* МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

О.П. Дрибноходова<sup>1</sup>, Е.А. Дунаева<sup>1</sup>, Г.В. Лешкина<sup>1</sup>, Е.А. Ярыгина<sup>1</sup>,  
А.Ю. Бухарина<sup>1</sup>, Я.А. Войцеховская<sup>1</sup>, Э.В. Борисова<sup>1</sup>, С.К. Бормотова<sup>1</sup>,  
А.И. Дауд<sup>2</sup>, В.Н. Хлявич<sup>2</sup>, К.О. Миронов<sup>1</sup>

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва, Россия<sup>1</sup>

Россия, 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а. E-mail: dribnokhodova@cmd.su<sup>1</sup>

Иностранное консультативное унитарное предприятие «МедАрт», г. Минск, Республика Беларусь<sup>2</sup>  
Республика Беларусь, 220034, г. Минск ул. Платонова, 1Б<sup>2</sup>

### Аннотация

**Введение.** Определение соматических мутаций в гене *BRAF* может применяться в клинике для уточнения диагноза, выбора терапии и оценки прогноза заболевания. Технология пиросеквенирования позволяет выявлять как уже известные, так и новые мутации, а также определять долю мутантного аллеля в образце. **Цель исследования** – разработка методики для выявления мутаций в 592–601 кодонах гена *BRAF* с помощью пиросеквенирования. **Материал и методы.** Определяли нуклеотидную последовательность с использованием системы генетического анализа «PyroMark Q24». Аналитические характеристики методики определяли на разведениях образцов плазмидной ДНК, включающих участок гена *BRAF* без мутаций или с одной из мутаций V600E, V600R, V600K, V600M, K601E. Апробацию провели на 200 образцах биологического материала из узловых образований щитовидной железы. **Результаты.** Разработанная методика позволяет определять образцы, содержащие 2 % мутантного аллеля для мутаций V600K и V600R, 3 % для V600E и V600M и 10 % для K601E. Значения сигнала для образцов без мутаций составили для разных мутаций от 0 до 19,5 %. Разработан алгоритм анализа для подтверждения наличия и дифференцировки мутаций в 600 кодоне на основе соотношения сигналов на пирограмме при низкой доле мутантного аллеля. При тестировании узловых образований щитовидной железы было обнаружено 47 образцов с мутациями, из них 45 с V600E и 1 с V600\_K601>E, для одного образца не удалось установить тип мутации в 600 кодоне. Доля мутантного аллеля составляла 3,5–45 %. Концентрация выделенной ДНК менее 10 копий/мкл была получена в 47 образцах, из них в 8 образцах была обнаружена мутация. **Заключение.** Разработана методика для выявления соматических мутаций в 592–601 кодонах гена *BRAF*. Методика обеспечивает достаточную чувствительность для выявления частых мутаций в 600 кодоне и позволяет определять редкие мутации. Выделение ДНК из образцов, полученных при тонкоигольной аспирационной биопсии, в большинстве случаев обеспечивало достаточную концентрацию ДНК, что позволяет использовать методику в комплексе с цитологическим анализом без дополнительного забора материала. Использованный подход может быть применен для определения соматических мутаций во фрагментах ДНК сопоставимой длины для других онкогенов.

**Ключевые слова:** пиросеквенирование, *BRAF*, онкогенетика, тонкоигольная аспирационная биопсия, рак щитовидной железы.



## DETECTION OF SOMATIC MUTATIONS IN THE *BRAF* GENE BY PYROSEQUENCING

O.P. Dribnokhodova<sup>1</sup>, E.A. Dunaeva<sup>1</sup>, G.V. Leshkina<sup>1</sup>, E.A. Yarygina<sup>1</sup>,  
A.Yu. Bukharina<sup>1</sup>, Ya.A. Voiciehovskaya<sup>1</sup>, E.V. Borisova<sup>1</sup>, S.K. Bormotova<sup>1</sup>,  
A.I. Daoud<sup>2</sup>, V.N. Khlavich<sup>2</sup>, K.O. Mironov<sup>1</sup>

Central Research Institute of Epidemiology of The Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, Moscow, Russia<sup>1</sup>

3a, Novogireevskaya Street, 111123, Moscow, Russia. E-mail: dribnokhodova@cmd.su<sup>1</sup>

Foreign unitary consultancy enterprise «MedArt», Minsk, Republic of Belarus<sup>2</sup>

1B, Platonov Street, 220034, Minsk, Republic of Belarus<sup>2</sup>

### Abstract

**Introduction.** Detection of somatic mutations in the *BRAF* gene can be used in clinical oncology to clarify the diagnosis, select therapy and assess the prognosis of the disease. Pyrosequencing technology makes it possible to identify both already known and new mutations, as well as to determine the mutant allele ratio in the sample. **The aim of the study** was to develop the pyrosequencing-based method for detecting mutations in 592–601 codons of the *BRAF* gene. **Material and Methods.** The nucleotide sequences were obtained using «PyroMark Q24» instrument. The sensitivity and specificity of the method were estimated using dilutions of plasmid DNA samples containing the intact *BRAF* gene fragment mixed with sequence containing one of the mutations V600E, V600R, V600K, V600M, and K601E. The clinical testing was performed on 200 samples from thyroid nodules. **Results.** The developed method makes it possible to determine samples containing 2 % of the mutant allele for mutations V600K and V600R, 3 % for V600E and V600M, and 10 % for K601E. The pyrogram signal values for samples without mutations ranged from 0 to 19.5 % for different mutations. An analysis algorithm was developed to confirm the presence and differentiation of mutations in the 600 codon at a low proportion of the mutant allele based on the signals ratio on the pyrogram. The 47 clinical samples with mutations were found, 45 with V600E and 1 with V600\_K601>E, for one sample, the type of mutation in the 600 codon could not be determined. The proportion of the mutant allele was 3.5–45 %. The concentration of extracted DNA less than 10 copies per mkl was obtained in 47 samples, of which 8 samples were found to have the mutations. **Conclusion.** The pyrosequencing-based method was developed for the detection of somatic mutations in 592–601 codons of the *BRAF* gene. The technique provided sufficient sensitivity to detect frequent mutations in the 600 codon and allowed the detection of rare mutations. Extraction of DNA from clinical samples obtained by fine-needle aspiration biopsy in most cases provided a sufficient concentration of DNA, which made it possible to use the technique in combination with cytological analysis without additional sampling. This approach can be applied to determine somatic mutations in DNA fragments of same length for other oncogenes.

**Key words:** pyrosequencing, *BRAF*, oncogenetics, fine-needle aspiration biopsy, thyroid cancer.

### Введение

Определение герминальных и соматических мутаций, ассоциированных с развитием онкологических заболеваний, широко используется для подтверждения и уточнения диагноза, выбора и предсказания эффективности лекарств, мониторинга лечения, прогнозирования течения заболевания и риска рецидива. Ген *BRAF* (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B) кодирует серин-треониновую протеинкиназу, входящую в сигнальный путь MAPK/ERK. Активирующие соматические мутации в гене *BRAF* способствуют активации этого сигнального пути, что приводит к злокачественному изменению клеток [1]. Мутации в гене *BRAF* выявляются при различных онкологических заболеваниях: меланоме (в 44 % опухолей), раке щитовидной железы (от 1,7 до 90 % в зависимости от гистологического типа), краинофарингиоме (34 %), аденокарциноме толстой

кишки (10 %) и многих других [1–3]. Наличие активирующих мутаций ассоциировано с чувствительностью опухоли к таргетным препаратам, специфически ингибирующим мутантные варианты белка BRAF, и комбинированной терапии ингибиторами BRAF и MEK, а также с резистентностью к препаратам, направленным на ингибирование предшествующих BRAF компонентов сигнального пути MAPK/ERK (например, ингибиторам EGFR при раке легкого и толстой кишки) [1, 4].

В связи с этим выявление мутаций в гене *BRAF* имеет клиническое значение, например, для уточнения диагноза при цитологических заключениях «атипия неясного значения» и «фолликулярная опухоль/подозрение на фолликулярную опухоль» (категории 3 и 4-й классификации Bethesda, 2017 г. [5]) при узловых образованиях щитовидной железы, для выбора тактики лечения как прогностический маркер, ассоциированный с более агрессивным



фенотипом опухоли [6–9]. Самой частой мутацией в гене *BRAF* является p.V600E (с.1799 T>A), ее доля при некоторых опухолях может достигать 90–95 %. Вторая по частоте мутация – p.V600K (с.1798\_1799 GT>AA), обнаруживаемая примерно в 5 %. Реже встречаются мутации в 600, 601, 597 и 594 кодонах (V600R, K601E, V600M, D594G, D594N, L597R), мутации в других кодонах описываются спорадически [1–3].

Ввиду большого количества описанных клинически значимых мутаций оптимальным способом их определения является секвенирование участков гена, а необходимость выявлять соматические мутации в присутствии интактной ДНК повышает требования к чувствительности используемых методов. Пиросеквенирование позволяет выявлять уже известные мутации в анализируемом участке нуклеотидной последовательности, проводить поиск новых мутаций и при необходимости определять долю мутантного аллеля в количественном формате с высокой, по сравнению с некоторыми другими методами секвенирования, чувствительностью [10, 11].

**Целью исследования** является разработка и определение аналитических характеристик методики для выявления соматических мутаций в 592–601 кодонах гена *BRAF* с помощью пиросеквенирования.

### Материал и методы

Для выявления мутаций и количественного анализа был использован метод определения нуклеотидной последовательности с помощью пиросеквенирования на приборе «PyroMark Q24» («Qiagen», Германия) с праймерами для амплификации: 5'-biotin-gCT-TgC-TCT-gAT-Agg-AAA-ATg-AgA-TC3' и 5'-CCA-CAA-AAT-ggA-TCC-AgA-CAA-CT3' (длина фрагмента 172 пары оснований), праймером для секвенирования: 5'-gAC-CCA-CTC-CAT-CgA3'. Для анализа результатов применяли программное обеспечение к прибору версии 2.0.6.

Выделение ДНК, амплификацию, пробоподготовку и пиросеквенирование проводили согласно протоколу, описанному ранее [12, 13], с использованием реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии («АмплиСенс®», Россия) и «Qiagen» (Германия). Методика позволяет определять нуклеотидную последовательность 590–602 кодонов, секвенирование проводится в обратном направлении, детектируемый фрагмент соответствует нуклеотидам 1805–1769 (по референсной последовательности NC\_000007.14).

Использована следующая последовательность добавления нуклеотидов в реакцию пиросеквенирующего синтеза: TGATTACTATGCTGTAGC-TACGACGAACCTCGACTA, последовательность подобрана с учетом мутаций, описанных в базе данных COSMIC [2] (табл. 1). Редкие мутации, для

выявления которых требовалось добавление дополнительных нуклеотидов (например, с.1803A>G p.K601K, описана в COSMIC один раз), при подборе последовательности не учитывались, при необходимости такие мутации можно детектировать, изменив порядок добавления нуклеотидов.

При анализе результатов пиросеквенирования тип и долю мутантного аллеля определяли по соотношению высот пиков на пирограмме с использованием функции программного обеспечения «AQ Analyze» (рис. 1). Для мутаций 600 кодона, нуклеотидная последовательность которых не позволяет применять автоматический анализ, использовали нуклеотидную последовательность для мутации p.V600E (с.1799 T>A).

Определение аналитических характеристик разработанной методики проводили на разведениях образцов плазмидной ДНК, включающих участок гена *BRAF*, клонированный в вектор pGem-T, без мутаций или с одной из следующих мутаций с.1799 T>A p.V600E, с.1798\_1799 GT>AG p.V600R, с.1798\_1799 GT>AA p.V600K, с.1798 G>A p.V600M и с.1801 A>G p.K601E. Мутагенез проводили с помощью набора «QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit» («Agilent Technologies», США). Концентрацию клонов определяли методом ПЦР в режиме реального времени с праймерами к последовательности вектора. Для каждой мутации анализировали смеси, содержащие 1, 2, 3, 5, 10 и 30 % мутантного аллеля. Смеси с 1–5 % мутантного аллеля тестировали в трех, 10 % и 30 % – в двух повторах для двух концентраций ДНК (100 и 10000 копий в реакцию) независимо на двух приборах. Для мутации K601E дополнительно анализировали смеси, содержащие 8, 12, 15 (в трех повторах), 20 и 25 % (в двух повторах) мутантного аллеля. В качестве контроля в каждой постановке использовали клонированный фрагмент последовательности гена *BRAF* без мутаций в той же концентрации. Статистические расчеты и графические построения выполнены с помощью программы Microsoft Excel.

Апробация методики проведена на 200 образцах узловых образований щитовидной железы, полученных путем тонкоигольной аспирационной биопсии (смывы с иглы в ТЕ-буфере – 133, соскобы клеток с традиционных цитологических препаратов – 58, пунктаты, полученные в жидкую консервирующую среду «BD Sure Path Collection Vial» («Becton Dickinson», США) – 5, интраоперационных соскобов – 2, срезов парафиновых блоков – 2. ДНК выделяли с помощью наборов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии) и «QIAmp DNA FFPE Tissue Kit» («Qiagen», Германия). Концентрацию выделенной ДНК определяли методом ПЦР в режиме реального времени с праймерами к гену β-глобина. Образцы с концентрацией более 1000 копий/мкл разводили до оптимальной (300–500 копий/мкл), образцы с низкой концентрацией тестировали в не-



Таблица 1/Table 1

**Значения LOB для мутаций в 592–602 кодонах гена *BRAF***  
**LOB values for mutations in 592-602 codons of the *BRAF* gene**

Мутация/Mutations		LOB	Мутация/Mutations		LOB
1805C>A	S602Y	2,0 %	1793 C>T	A598V	6,4 %
1803 A>T	K601N	9,7 %	1792G>A	A598T	4,5 %
1801 A>G	K601E	6,8 %	1791 A>G	L597L	2,4 %
1801_1802AA>TT	K601L	1,2 %	1790 T>C	L597P	3,6 %
1800 G>A	V600V	3,0%	1790T>G	L597R	4,1 %
1800 G>T	V600V	2,0 %	1790T>A	L597Q	4,8 %
1799_1801 delTGA	V600_K601>E	3,4 %	1789 C>G	L597V	4,1 %
1799_1800 TG>AT	V600D	3,4 %	1789 C>T	L597L	1,8 %
1799_1800 TG>AA	V600E	3,4 %	1786 G>C	G596R	2,8 %
1799T>C	V600A	5,0 %	1786G>T	G596C	0,0 %
1799 T>A	V600E	3,4 %	1785 T>G	F595L	19,5 %
1799 T>G	V600G	2,4 %	1782 T>G	D594E	4,4 %
1798_1799 GT>AA	V600K	3,4 %	1782 T>A	D594E	7,2 %
1798_1799 GT>AG	V600R	3,4 %	1781 A>T	D594V	1,9 %
1798_1799 GT>CA	V600Q	3,4 %	1781 A>G	D594G	2,2 %
1798 G>A	V600M	1,8 %	1780 G>A	D594N	4,8 %
1798 G>T	V600L	3,2 %	1780 G>T	D594Y	7,1 %
1798 G>C	V600L	4,4 %	1780 G>C	D594H	5,5 %
1797 A>C	T599T	2,1 %	1777G>A	G593S	4,5 %
1797A>G	T599T	5,2 %	1776 A>G	I592M	4,0 %
1794 T>A	A598A	0,3 %			

Примечание: перечислены мутации, определение которых возможно с использованной последовательностью добавления нуклеотидов в реакцию пиросеквенирующего синтеза. LOB – limit of blank (наибольший сигнал, который ожидается при измерениях образца, не содержащего исследуемого материала).

Note: mutations that can be determined with the used sequence of nucleotides added to the pyrosequencing reaction are listed. LOB – limit of blank (the highest signal that expected to be found when replicates a sample containing no test material).

скольких повторах. Параллельно с биологическими образцами в каждой постановке анализировали контрольный образец ДНК человека, полученный из клеток периферической крови, не содержащий мутаций.

Верификация мутации V600\_K601>E выполнена методом секвенирования по Сэнгеру с использованием реагентов и оборудования фирмы «Applied Biosystems» (США).

### Результаты и обсуждение

#### Аналитические характеристики методики

Для оценки аналитических характеристик определяли параметры limit of blank (LOB) – наибольший сигнал, который ожидается при измерениях образца, не содержащего тестируемого материала, и limit of detection (LOD) – наименьшая концентрация тестируемого материала, которая может быть достоверно дифференцирована от значения LOB [14].

Определение LOB было проведено на клонированном фрагменте-последовательности гена *BRAF* без мутаций в количестве 100 и 10000 копий в реакцию, в 39 повторах и на 44 повторах образцов геномной ДНК человека, выделенной из клеток периферической крови, в количестве 4000 копий в реакцию. Уровень LOB для разных мутаций со-

ставлял от 0 до 19,5 % (табл. 1), для мутации V600E значение LOB составляет 3,4 %.

Уровень колебаний фона при пиросеквенировании в значительной степени зависит от типа мутации и окружающей ее нуклеотидной последовательности, особенно от наличия гомополимеров. Наибольшее значение LOB получено для мутации с.1785 T>G p.F595L, при которой третий нуклеотид в последовательности CCAAAA заменяется на C.

Значения LOD были определены для наиболее клинически значимых мутаций V600E, V600K, V600M и V600R с помощью панели разведений клонированных контролей и составили 4,2, 5, 2,4 и 5 % соответственно. При этом предел детекции не зависел от концентрации ДНК (от 100 до 10000 копий в реакцию), за исключением мутации K601E. В случае мутации V600E при тестировании проб, содержащих 3 % мутантного аллеля, все измерения попали в диапазон от 4,8 до 6,3 %, что позволяет достоверно отличать их от образцов, не содержащих мутаций (рис. 2). При оценке результатов измерений доли мутантного аллеля была обнаружена высокая корреляция между ожидаемой и измеренной долей аллеля T ( $R^2=0,99$ ). Для мутаций V600K и V600R методика позволяет определять образцы, содержащие 2 % мутантного аллеля, для V600M – 3 %.



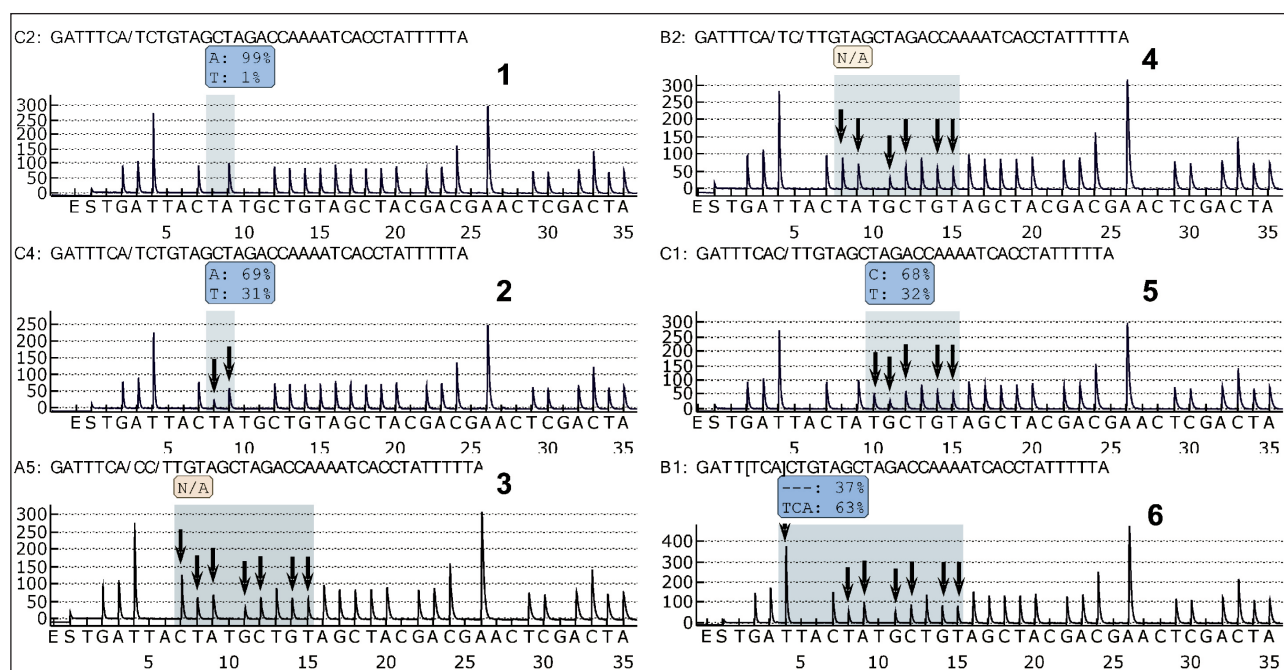


Рис. 1. Пирограммы образцов с мутациями в гене *BRAF*. Примечания: ось абсцисс – последовательность подачи нуклеотидов в реакционную смесь; ось ординат – уровень сигнала, детектируемый прибором. Над пирограммами приведены нуклеотидные последовательности, используемые для анализа мутаций. Стрелкой указаны сигналы для нуклеотидов, значения которых изменяются при наличии мутации. 1 – образец без мутаций; 2 – образец с мутацией с.1799 T>A, p.V600E, 30 % мутантного аллеля; 3 – образец с мутацией с.1798\_1799GT>AG, p.V600R, 30 % мутантного аллеля; 4 – образец с мутацией с.1798\_1799GT>AA p.V600K, 30 % мутантного аллеля; 5 – образец с мутацией с.1798 G>A, p.V600M, 30 % мутантного аллеля; 6 – образец с мутацией с.1799\_1801delTGA, p.V600\_K601>E, 38 % мутантного аллеля

Fig. 1. Programs for samples with mutations in the *BRAF* gene. Notes: The abscissa axis is the sequence of nucleotides added in reaction. The ordinate axis is the signal level. The nucleotide sequences used for mutation analysis are indicated above the pyrograms. The signals for nucleotides that change in the presence of mutation are marked with arrows. 1 – sample without mutations; 2 – sample with mutation c.1799 T>A, p.V600E, 30 % of the mutant allele; 3 – sample with mutation c.1798\_1799GT>AG, p.V600R, 30 % of the mutant allele; 4 – sample with mutation c.1798\_1799GT>AA p.V600K, 30 % of the mutant allele; 5 – sample with mutation c.1798 G>A, p.V600M, 30 % of the mutant allele; 6 – sample with mutation C.1799\_1801delTGA, P.V600\_V601>E, 38 % of the mutant allele

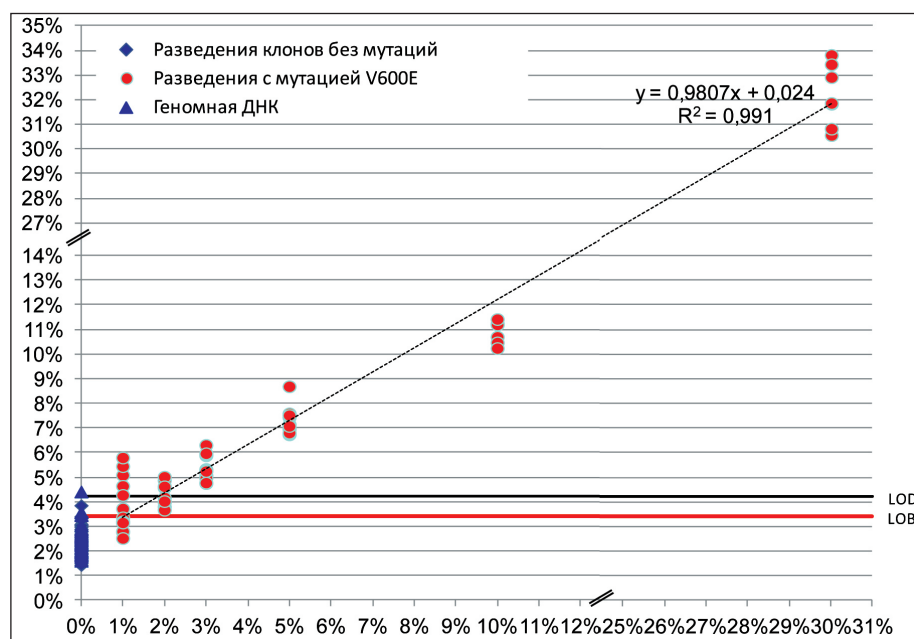


Рис. 2. Корреляция между ожидаемой и измеренной долей мутантного аллеля для мутации V600E. Примечания: ось абсцисс – доля мутантного аллеля в образце; ось ординат – измеренная доля мутантного аллеля

Fig. 2. Correlation between the expected and measured fraction of the mutant allele for the V600E mutation. Notes: The abscissa axis is the fraction of the mutant allele in the sample. The ordinate axis is the measured fraction of the mutant allele. Rhombus are clones without mutations, circles are dilutions of V600E mutation and triangles are genomic DNA



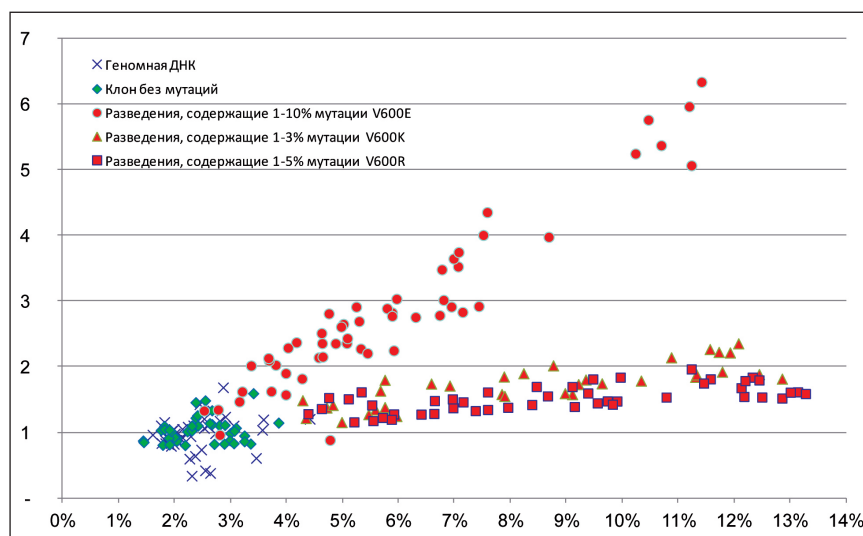


Рис. 3. Отношение сигналов в положениях T8 и G11 пирограммы в зависимости от измеренной доли мутации V600E. Примечания: ось абсцисс – измеренная доля мутации V600E; ось ординат – отношение сигналов в положениях T8 и G11 пирограммы Fig. 3. The ratio of signals in positions T8 and G11 of the pyrogram depending on the measured ratio of the V600E mutation. Notes: The abscissa axis is the measured ratio of the V600E mutation. The ordinate axis is the ratio of signals in positions T8 and G11 of the pyrogram. Crosses are genomic DNA, rhombus are clones without mutations, circles are dilutions with 1–10 % of the V600E mutation, triangles are dilutions with 1–3 % of the V600K mutation, squares are dilutions with 1–5 % of the V600R mutation

Для мутации K601E аналитические параметры определяли на разведениях с концентрацией 10000 копий в ПЦР, LOD составил 9,3 %, что позволяет выявлять 10 % мутантного аллеля. Выявление этой мутации на образцах с низкой концентрацией затруднено из-за большого разброса результатов.

В настоящее время отсутствуют утвержденные экспертными организациями рекомендации по определению доли мутантного аллеля при соматических мутациях в гене *BRAF*, однако полученные результаты демонстрируют возможность применения пиросеквенирования для определения соматических мутаций на фоне значительного избытка интактной ДНК. При необходимости существует возможность повысить чувствительность пиросеквенирования путем использования различных вариантов проведения ПЦР, например COLD-ПЦР или AS-ПЦР [13].

### Клиническая апробация

Апробация методики была проведена на панели из 200 биологических образцов узловых образований щитовидной железы. Концентрация выделенной ДНК составляла от 0,3 до 38650 копий/мкл. Низкая концентрация ДНК (менее 10 копий/мкл), при которой нельзя надежно исключить ложноотрицательный результат, была получена в 43 образцах смывов с иглы и 4 образцах соскобов с цитологических препаратов. При этом в 8 (17 %) из этих проб была выявлена мутация V600E. Это позволяет в большинстве случаев использовать для определения мутаций в гене *BRAF* материал, остающийся после проведения стандартной тонкоигольной биопсии, без повторного забора, однако не позволяет исключить наличие соматических мутаций при получении отрицательного результата в образцах с низкой концентрацией ДНК.

При тестировании было обнаружено 47 образцов с мутациями, из них 45 с мутацией V600E и 1 с мутацией V600\_K601>E (c.1799\_1801delTGA,

COSM1133). Доля мутантного аллеля составляла 3,5–45 % для V600E и 38 % для V600\_K601>E. В одном образце из-за низкой доли мутантного аллеля не удалось точно установить тип мутации в 600 кодоне (V600E, V600K или V600R). Еще в одном образце не удалось достоверно определить наличие мутации в 600 кодоне.

Так как при измеренной доле мутантного аллеля, находящейся в диапазоне от 1 до 7 %, анализ пирограмм не всегда позволяет надежно дифференцировать некоторые мутации, в частности V600E от V600K и от V600R, для подтверждения наличия мутации и точного определения ее типа в таких случаях образцы развели до 10–20 копий в реакцию и тестировали в 10 повторях. За счет случайного разброса в количестве копий ДНК с мутацией, попавших в ПЦР, данная процедура позволила надежно подтвердить наличие мутации и определить ее тип. В частности, при анализе одного образца при первом тестировании было детектировано 3–4 % мутации V600E, при тестировании разведений в 5 повторях мутация не была обнаружена, в двух повторях выявлено 6 %, по одному повтору – 9, 10 и 14 % мутации V600E.

Удобным способом дифференцировать мутацию V600E от V600K или V600R при использовании разработанной методики является определение отношения сигналов в 8 и 10 положениях пирограммы (рис. 1). При мутациях V600K и V600R на пирограмме сигнал увеличивается в положениях T8 и G11, при V600E – только в T8, а уровень G11 не превышает колебаний уровня фона в образцах без мутаций. Это позволяет по отношению высот T8/G11 отличать V600E от V600K или V600R начиная с 5 % измеренной доли мутации V600E (рис. 3).

На момент выполнения анализа 34 из 45 пациентов с мутацией V600E был установлен диагноз папиллярного рака щитовидной железы, у одного – диагноз анапластического рака, у 7 – подозрение



на папиллярный рак, у трех больных диагноз не определен. Мутация V600\_K601>E была обнаружена у пациента с подозрением на папиллярный рак или трабекулярную аденому, ранее эта мутация была описана при ряде опухолей, в том числе при папиллярном раке щитовидной железы, как приводящая к конститутивной активации BRAF [2, 15]. Мутации в 600 кодоне гена *BRAF* были выявлены у 34 из 51 пациента с установленным диагнозом папиллярного рака щитовидной железы, у 8 из 20 пациентов с подозрением на рак, у 1 из 18 пациентов с атипией неясного значения, у единственного пациента с анапластическим раком и у 3 из 43 пациентов без установленного диагноза. У 23 пациентов с доброкачественными образованиями и 44 с фолликулярными опухолями мутации обнаружены не были.

### Заключение

Разработана методика на основе технологии пиросеквенирования, позволяющая определять нуклеотидную последовательность 592–601 кодонов гена *BRAF*. Методика может быть использована для выявления клинически значимых соматиче-

ских мутаций в этом участке в количественном формате. Методика обеспечивает достаточную чувствительность для выявления частых мутаций в 600 кодоне и позволяет определять редкие мутации в секвенируемом фрагменте. Разработан алгоритм анализа для дифференцировки мутаций в 600 кодоне на основе соотношения высот пиков на пириграмме. Исползованный подход может быть применен для определения мутаций во фрагментах ДНК сопоставимой длины для других онкогенов. Выделение ДНК из образцов, полученных путем тонкоигольной аспирационной биопсии, в большинстве случаев обеспечивало концентрацию ДНК, достаточную для проведения анализа, что позволяет использовать разработанную методику в комплексе с цитологическим анализом без дополнительного инвазивного вмешательства. Планируется расширенная апробация методики. Выявление мутаций в гене *BRAF* может быть использовано для уточнения диагноза при неопределенном результате цитологического заключения тонкоигольной биопсии узловых образований щитовидной железы, определения объема операции и оценки послеоперационного риска.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Zaman A., Wu W., Bivona T.G. Targeting Oncogenic BRAF: Past, Present, and Future. *Cancers* (Basel). 2019; 11(8): 1197. doi: 10.3390/cancers11081197.
2. Tate J.G., Bamford S., Jubb H.C., Sondka Z., Beare D.M., Bindal N., Boutselakis H., Cole C.G., Creatore C., Dawson E., Fish P., Harsha B., Hathaway C., Jupp S.C., Kok C.Y., Noble K., Ponting L., Ramshaw C.C., Rye C.E., Speedy H.E., Stefancsik R., Thompson S.L., Wang S., Ward S., Campbell P.J., Forbes S.A. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(D1): D941–D947. doi: 10.1093/nar/ky1015.
3. Dumaz N., Jouenne F., Delyon J., Mourah S., Bensussan A., Lebbé C. Atypical BRAF and NRAS Mutations in Mucosal Melanoma. *Cancers* (Basel). 2019 Aug 8; 11(8): 1133. doi: 10.3390/cancers11081133.
4. Ducreux M., Chamseddine A., Laurent-Puig P., Smolenschi C., Hollebecque A., Dartigues P., Samallin E., Boige V., Malka D., Gelli M. Molecular targeted therapy of BRAF-mutant colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2019 Jun 18; 11: 1758835919856494. doi: 10.1177/1758835919856494.
5. Cibas E.S., Ali S.Z. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid.* 2017 Nov; 27(11): 1341–1346. doi: 10.1089/thy.2017.0500.
6. Бельцевич Д.Г., Мудунов А.М., Ванушко В.Э., Румянцев П.О., Мельниченко Г.А., Кузнецов Н.С., Подвязников С.О., Алымов Ю.В., Поляков А.П., Фадеев В.В., Болотин М.В., Севрюков Ф.Е., Крылов В.В., Феденко А.А., Болотина Л.В., Жаров А.А., Фалалеева Н.А., Филоненко Е.В., Невольских А.А., Иванов С.А., Хайлова Ж.В., Геворкян Т.Г. Клинические рекомендации: Дифференцированный рак щитовидной железы. 2020. 47 с. [Интернет]. URL: <http://cr.rosminzdrav.ru/#/recomend/977> (дата обращения: 20.10.2020). [Beltsevich D.G., Mudunov A.M., Vanushko V.E., Rumyantsev P.O., Melnichenko G.A., Kuznetsov N.S., Podvyaznikov S.O., Alymov Yu.V., Polyakov A.P., Fadeev V.V., Bolotin M.V., Sevryukov F.E., Krylov V.V., Fedenko A.A., Bolotina L.V., Zharov A.A., Falaleeva N.A., Filonenko E.V., Nevol'skikh A.A., Ivanov S.A., Khailova Zh.V., Gevorkyan T.G. Clinical Guidelines: Differentiated Thyroid Cancer. 2020. 47 p. [Internet]. URL: <http://cr.rosminzdrav.ru/#/recomend/977> (cited: 20.10.2020). (in Russian)].
7. Patel K.N., Yip L., Lubitz C.C., Grubbs E.G., Miller B.S., Shen W., Angelos P., Chen H., Doherty G.M., Fahey T.J.3rd, Kebebew E., Livolsi V.A., Perrier N.D., Sipos J.A., Sosa J.A., Steward D., Tufano R.P., McHenry C.R., Carty S.E. The American Association of Endocrine Surgeons Guidelines for the Definitive Surgical Management of Thyroid Disease in Adults. *Ann Surg.* 2020 Mar; 271(3): e21–e93. doi: 10.1097/SLA.0000000000003580.
8. Haugen B.R., Alexander E.K., Bible K.C., Doherty G.M., Mandel S.J., Nikiforov Y.E., Pacini F., Randolph G.W., Sawka A.M., Schlumberger M., Schuff K.G., Sherman S.I., Sosa J.A., Steward D.L., Tuttle R.M., Wartofsky L. 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 Jan; 26(1): 1–133. doi: 10.1089/thy.2015.0020.
9. Poller D.N., Glaysher S. Molecular pathology and thyroid FNA. *Cytopathology.* 2017 Dec; 28(6): 475–481. doi: 10.1111/cyt.12492.
10. Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П., Шипулин Г.А. Опыт использования систем генетического анализа на основе технологии пиросеквенирования. Справочник заведующего КДЛ. 2016; 5: 33–42. [Mironov K.O., Dunaeva E.A., Dribnokhodova O.P., Shipulin G.A. Using genetic analysis system based on pyrosequencing method. *Spravochnik zaveduyushchego KDL.* 2016; 5: 33–42. (in Russian)].
11. Дунаева Е.А., Миронов К.О., Дрибноходова О.П., Субботина Т.Е., Башимакова Е.Е., Ольховский И.А., Шипулин Г.А. Количественное определение мутации V617F в гене JAK2 методом пиросеквенирования. Клиническая лабораторная диагностика. 2014; 59(11): 60–63. [Dunaeva E.A., Mironov K.O., Dribnokhodova O.P., Subbotina T.N., Bashmakova E.E., Olkhovskii I.A., Shipulin G.A. The quantitative testing of V617F mutation in gene JAK2 using pyrosequencing technique. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2014; 59 (11): 60–63. (in Russian)].
12. Дрибноходова О.П., Миронов К.О., Дунаева Е.А., Маркелов М.П., Войцеховская Я.А., Демидова И.А., Баринов А.А., Шипулин Г.А. Выявление активирующих соматических мутаций в гене KRAS методом пиросеквенирования. Клиническая лабораторная диагностика. 2013; 6: 49–51. [Dribnokhodova O.P., Mironov K.O., Dunaeva E.A., Demidova I.A., Barinov A.A., Voicievskaya I.A., Markelov M.L., Shipulin G.A. The detection of activating somatic mutations in gene KRAS using pyrosequencing technique. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2013; 6: 49–51. (in Russian)].
13. Дунаева Е.А., Миронов К.О., Субботина Т.Н., Ольховский И.А., Шипулин Г.А. Разработка и сравнительная апробация методик для повышения чувствительности определения мутации V617F в гене JAK2 методом пиросеквенирования. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (2): 125–128. [Dunaeva E.A., Mironov K.O., Subbotina T.N., Olkhovskiy I.A., Shipulin G.A. The development and comparative approbation of methods of increasing sensitivity of detection of mutation V617F in gene JAK2 by pyrosequencing. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2017; 62 (2): 125–128. (in Russian)].
14. Armbruster D.A., Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev.* 2008 Aug; 29 Suppl 1(Suppl 1): S49–52.
15. Hou P., Liu D., Xing M. Functional characterization of the T1799-1801del and A1799-1816ins BRAF mutations in papillary thyroid cancer. *Cell Cycle.* 2007 Feb 1; 6(3): 377–9. doi: 10.4161/cc.6.3.3818.

Поступила/Received 14.10.2020

Принята в печать/Accepted 09.11.2020



## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Дрибноходова Ольга Павловна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов, ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (г. Москва, Россия). E-mail: dribnokhodova@cmd.su. SPIN-код: 8513-7531. Researcher ID (WOS): I-4645-2014. Author ID (Scopus): 16401348800. ORCID: 0000-0003-4918-4907.

**Дунаева Елена Алексеевна**, научный сотрудник научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов, ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (г. Москва, Россия). SPIN-код: 5866-8568. Researcher ID (WOS): I-4590-2014. Author ID (Scopus): 55989868900. ORCID: 0000-0002-4477-8506.

**Лешкина Гульнара Витальевна**, биолог подразделения молекулярных методов диагностики, ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (г. Москва, Россия). SPIN-код: 1198-4116.

**Ярыгина Екатерина Андреевна**, младший научный сотрудник научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов, ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (г. Москва, Россия). SPIN-код: 1410-8094. ORCID: 0000-0003-3741-2474.

**Бухарина Анна Юрьевна**, лаборант-исследователь подразделения молекулярных методов диагностики, ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (г. Москва, Россия). SPIN-код: 7308-9565. Researcher ID (WOS): AAX-5415-2020. ORCID: 0000-0002-6892-3595.

**Войцеховская Яна Александровна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник научной группы геномной инженерии и биотехнологии, ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (г. Москва, Россия). SPIN-код: 9539-9800. Author ID (Scopus): 57215740100.

**Борисова Эльза Валериевна**, врач клинико-диагностической лаборатории, ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (г. Москва, Россия).

**Бормотова Светлана Константиновна**, врач клинико-диагностической лаборатории, ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (г. Москва, Россия). ORCID: 0000-0002-5950-9018.

**Дауд Антонина Игоревна**, кандидат медицинских наук, заведующая клинико-диагностической лабораторией, иностранное консультативное унитарное предприятие «МедАрт» (г. Минск, Республика Беларусь). Researcher ID (WOS): AAX-7658-2020.

**Хлявич Виталий Николаевич**, врач УЗ-диагностики, онколог, иностранное консультативное унитарное предприятие «МедАрт» (г. Минск, Республика Беларусь).

**Мионов Константин Олегович**, доктор медицинских наук, руководитель научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов, ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (г. Москва, Россия). SPIN-код: 2706-5561. Researcher ID (WOS): I-4912-2014. Author ID (Scopus): 24172492700. ORCID: 0000-0001-8207-9215.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Дрибноходова Ольга Павловна**: разработка концепции и планирование научной работы, сбор и обработка данных, статистическая обработка данных, написание текста статьи.

**Дунаева Елена Алексеевна**: сбор и обработка данных, статистическая обработка данных, критический пересмотр рукописи.

**Лешкина Гульнара Витальевна**: разработка концепции научной работы, сбор и обработка данных, критический пересмотр рукописи.

**Ярыгина Екатерина Андреевна**: сбор и обработка данных, критический пересмотр рукописи.

**Бухарина Анна Юрьевна**: сбор и обработка данных, критический пересмотр рукописи.

**Войцеховская Яна Александровна**: сбор и обработка данных, критический пересмотр рукописи.

**Борисова Эльза Валериевна**: сбор и обработка данных, критический пересмотр рукописи.

**Бормотова Светлана Константиновна**: сбор и обработка данных, критический пересмотр рукописи.

**Дауд Антонина Игоревна**: сбор и обработка данных, критический пересмотр рукописи.

**Хлявич Виталий Николаевич**: сбор и обработка данных, критический пересмотр рукописи.

**Мионов Константин Олегович**: общее руководство, разработка концепции научной работы, анализ и статистическая обработка результатов, редактирование и критический пересмотр рукописи.

**Финансирование**

*Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.*

**Конфликт интересов**

*Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.*

## ABOUT THE AUTHORS

**Olga P. Dribnokhodova**, PhD, Researcher of Scientific Group for Development of New Methods of Genetic Polymorphisms Detection, Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance (Moscow, Russia). E-mail: dribnokhodova@cmd.su. Researcher ID (WOS): I-4645-2014. Author ID (Scopus): 16401348800. ORCID: 0000-0003-4918-4907.



**Elena A. Dunaeva**, Researcher of Scientific Group for Development of New Methods of Genetic Polymorphisms Detections, Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): I-4590-2014. Author ID (Scopus): 55989868900. ORCID: 0000-0002-4477-8506.

**Gulnara V. Leshkina**, Biologist of the Molecular Diagnostic Methods Department, Central research institute of Epidemiology, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance (Moscow, Russia).

**Ekaterina A. Yarygina**, Junior Researcher of Scientific Group for Development of New Methods of Genetic Polymorphisms Detection, Central Research institute of Epidemiology, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0003-3741-2474.

**Anna Yu. Bukharina**, Laboratory Researcher Assistant of the Molecular Diagnostic Methods Department, Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): AAX-5415-2020. ORCID: 0000-0002-6892-3595.

**Yana A. Voiciehovskaya**, PhD, Researcher of the Scientific Group of Genetic Engineering and Biotechnology, Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance (Moscow, Russia). Author ID (Scopus): 57215740100.

**Elza V. Borisova**, Physician of Clinical Diagnostic Laboratory, Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance (Moscow, Russia).

**Svetlana K. Bormotova**, Physician of Clinical Diagnostic Laboratory, Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0002-5950-9018.

**Antonina I. Daoud**, MD, PhD, Head of Clinical Diagnostic Laboratory, Foreign unitary consultancy enterprise «MedArt» (Minsk, Republic of Belarus). Researcher ID (WOS): AAX-7658-2020.

**Vitaly N. Khlavich**, Ultrasound Diagnostic Physician, Oncologist, Foreign unitary consultancy enterprise «MedArt» (Minsk, Republic of Belarus).

**Konstantin O. Mironov**, PhD, DSc, Head of Scientific Group for Development of New Methods of Genetic Polymorphisms Detection, Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): I-4912-2014. Author ID (Scopus): 24172492700. ORCID: 0000-0001-8207-9215.

#### AUTHOR CONTRIBUTION

**Olga P. Dribnokhodova**: study design, data collection and analysis, statistical analysis, writing of the manuscript.

**Elena A. Dunaeva**: data collection and analysis, critical revision of the manuscript.

**Gulnara V. Leshkina**: data collection and analysis, critical revision of the manuscript.

**Ekaterina A. Yarygina**: data collection and analysis, critical revision of the manuscript.

**Anna Yu. Bukharina**: data collection and analysis, critical revision of the manuscript.

**Yana A. Voiciehovskaya**: data collection and analysis, critical revision of the manuscript.

**Elza V. Borisova**: data collection and analysis, critical revision of the manuscript.

**Svetlana K. Bormotova**: data collection and analysis, critical revision of the manuscript.

**Antonina I. Daoud**: data collection and analysis, critical revision of the manuscript.

**Vitaly N. Khlavich**: data collection and analysis, critical revision of the manuscript.

**Konstantin O. Mironov**: general supervision, study conception, study analysis, text editing, critical revision and final approval of the manuscript.

#### **Funding**

*This study required no funding.*

#### **Conflict of interest**

*The authors declare that they have no conflict of interest.*