

*С.Е. Титов^{1,2,3}, С.А. Лукьянов⁴, Е.С. Козорезова⁵, П.С. Деменков^{3,6}, С.В. Сергийко⁴,
Ю.А. Веряскина^{1,6}, С.Л. Воробьев⁵, И.В. Слепцов⁷, А.В. Гостимский⁸*

Валидация дооперационной диагностики злокачественных опухолей щитовидной железы с помощью молекулярного классификатора

¹ ФГБУ «Институт молекулярной и клеточной биологии» Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск

² АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск

³ ФГБОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» Минздрава России, г. Новосибирск

⁴ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Челябинск

⁵ ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики», Санкт-Петербург

⁶ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск

⁷ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

⁸ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России, Санкт-Петербург

Введение. Тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) узлов щитовидной железы под УЗ-контролем с последующим цитологическим исследованием является основным способом оценки риска злокачественности этих образований. При этом неопределенные и подозрительные на опухоль цитологические заключения (Bethesda III, IV) являются показанием для направления пациентов на оперативное лечение, в части случаев избыточное. Анализ молекулярных маркеров в материале ТАБ в дополнение к цитологическому исследованию — многообещающий способ улучшения предоперационной диагностики узлов щитовидной железы.

Целью исследования стало повышение точности дооперационной диагностики опухолей щитовидной железы.

Материалы и методы. В данной работе на основании ретроспективного многоцентрового слепого исследования проведена валидация диагностических возможностей отечественного молекулярно-генетического теста (МГТ), разработанного для дифференциальной диагностики опухолей щитовидной железы. Тест основан на оценке относительных уровней экспрессии генов GCM2 и NMGA2, уровней микроРНК-146b, -221, -375, -31 и -551b, соотношения митохондриальной и ядерной ДНК, а также определение соматической мутации V600E в гене BRAF. Анализировано 329 цитологических образцов, из них: 22 (6,7%) с заключением Bethesda II, 226 (68,7%) Bethesda IV, 6 (1,8%) Bethesda V и 75 (22,8%) Bethesda VI.

Результаты. В нашем исследовании получились следующие диагностические характеристики для выявления злокачественных опухолей молекулярным тестом: специфичность — 90,8%, чувствительность — 86,9%, положительная предсказательная ценность — 82,3%, отрицательная предсказательная ценность — 93,4%. При выявлении молекулярным тестом папиллярного рака общая точность — 96,6%, фолликулярного рака — 94,4%, медуллярного рака — 100%, Гюртлеклеточного рака — 96,9%.

Заключение. Проведенное исследование демонстрирует возможность выявления и типирования опухолей щитовидной железы с помощью панели из небольшого числа молекулярных маркеров, выявляемых в цитологических препаратах с помощью ПЦР в реальном времени. Точность отечественного МГТ сопоставима с зарубежными аналогами.

Ключевые слова: фолликулярная опухоль щитовидной железы, рак щитовидной железы, молекулярно-генетическое тестирование

Введение

Основным методом дооперационной диагностики узлов ЩЖ является тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия под контролем УЗИ с последующим цитологическим исследованием полученного аспирата. Исследование требует глубоких знаний цитопатолога, вместе с тем, даже при адекватном заборе материала, до 30% цитологических репортов оказываются неопределенными с онкологических позиций [1], поскольку цитологических признаков недо-

статочно для убедительного разделения доброкачественных и злокачественных опухолей щитовидной железы и опухолеподобных процессов. Система Bethesda, разработанная Национальным институтом рака США в 2009 г. и пересмотренная в 2017 г., широко используется в современной клинической практике и включает в себя три категории «неопределенных» заключений: Bethesda III (фолликулярные изменения неясного значения), Bethesda IV (фолликулярная неоплазия или подозрение на нее), Bethesda V (подозрение на злокачественную опухоль); при этом узлы в этих группах имеют широкий диапазон риска злокачественности (от 6 до 40%) [2].

В течение последнего десятилетия для большинства цитологически неопределенных узлов щитовидной железы (в меньшей степени для группы Bethesda III, в большей степени для групп IV, V) обычной практикой было хирургическое вмешательство [3]. Учитывая высокие риски избыточности самого вмешательства или его объема, а также затраты, связанные с операциями, во многих странах были предприняты попытки разработки дополнительных исследований, в частности молекулярных тестов, для дооперационного уточнения риска злокачественного поражения щитовидной железы. Основной целью молекулярного тестирования на дооперационном этапе является исследование неопределенных цитологических образцов ТАБ и выявление пациентов, для которых хирургическое лечение может быть избыточным в связи с установленными минимальными рисками наличия рака. Для достижения этой цели требуется, чтобы тест обладал высокой чувствительностью и, соответственно, высоким отрицательным прогностическим значением. Согласно клиническим рекомендациям Американской тиреологической ассоциации (ATA) 2020 г., в настоящее время применение молекулярно-генетического тестирования при неопределенных результатах ТАБ необходимо рассматривать как обязательное при установлении показаний к операции. Наиболее изученными и применяемыми молекулярно-генетическими тестами (МГТ) на рынке США и Европы на сегодня являются Afirma GSC, ThyGenXpThyraMir и ThyroSeq [4]. Молекулярное тестирование на данный момент не стандартизовано, используется несколько подходов: выявление соматических точечных замен (например, в генах *BRAF* и *RAS*) и транслокаций (например, *RET-PTC*, *PAX8-PPAR γ*) [5, 6], оценка экспрессии белок-кодирующих генов [7] или микроРНК [8], или же комплексы, объединяющие анализ соматических мутаций, уровней мРНК и микроРНК [9].

В требованиях NCCN для определения тактики ведения пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы указано, что МГТ по

диагностической точности должен быть не хуже цитологического заключения Bethesda II, то есть «пропускать» не более 5% злокачественных опухолей щитовидной железы на дооперационном этапе, что соответствует предсказательной ценности отрицательного результата (ПЦОР) 95% [10]. Если принять во внимание, что положительная предсказательная ценность цитологического исследования узлов щитовидной железы отнесенных к категории «неопределенных» (Bethesda III, IV) не превышает 30%, то любой МГТ, где ПЦПР будет выше 30% уже имеет огромное клиническое значение для снижения количества ненужных операций. Таким образом, для клинического использования МГТ должен иметь ПЦОР выше 95%, ПЦПР выше 30%.

Наиболее полно диагностическую ценность зарубежных МГТ раскрывает метаанализ 2021 г., проведенный на основании 35 исследований, опубликованных с 2012 по 2019 г., который обобщает данные от 7565 пациентов [11]. Показатели чувствительности и специфичности для тестов Afirma (GSC), ThyGenX+ThyraMir и ThyroSeq version 3 составили соответственно 91 и 68%, 89 и 85%, 94 и 82%.

В опубликованной недавно нами работе был предложен вариант диагностического теста, позволяющего повысить точность выявления и типирования злокачественных опухолей ЩЖ с помощью анализа ряда молекулярных маркеров в материале цитологических образцов: гена *GCM2* для разделения образцов щитовидной и паращитовидной железы, онкогена *HMG2*, миРНК-146b, -221, -375, соотношения митохондриальной и ядерной ДНК, а также определения мутации *BRAF V600E* [12]. В ходе дальнейших проверок данного алгоритма выяснилось, что для некоторых подтипов папиллярного рака этих маркеров недостаточно (в частности, при солидном варианте, опухоль зачастую определяется как доброкачественная). В связи с этим, алгоритм был модифицирован, в панель маркеров включены дополнительно две миРНК, уровень экспрессии которых при папиллярном раке повышается: миРНК-31 и -551b [13]. Целью представленной работы было определение диагностических характеристик модифицированного молекулярно-генетического теста (МГТ) на материале цитологических образцов в рамках ретроспективного слепого многоцентрового исследования.

Цель работы — повышение точности дооперационной диагностики опухолей щитовидной железы.

Материалы и методы

В этом ретроспективном исследовании использовались цитологические материалы ТАБ пациентов из трех медицинских учреждений: Южно-Уральского государ-

ственного медицинского университета (г. Челябинск), Санкт-Петербургского государственного педиатрического университета и Клиники высоких медицинских технологий им. Н.И. Пирогова Санкт-Петербургского государственного университета.

Исследование было одобрено этическим комитетом Южно-Уральского государственного медицинского университета — протокол № 3 от 18.04.2019 г. Материал был получен в соответствии с положениями действующего законодательства РФ, от каждого пациента было получено информированное добровольное согласие, все данные были депersonализованы.

Ретроспективный цитологический и гистологический материал направлялся в Клинику высоких медицинских технологий им. Н.И. Пирогова Санкт-Петербургского государственного университета, где каждому случаю присваивался новый уникальный номер, а прежняя информация со стекол удалялась.

Критерии включения в исследование: возраст пациента — 18 лет и более, наличие информативного цитологического препарата (категории Bethesda II, III, IV, V, VI).

Пересмотр цитологических и гистологических препаратов проводился в ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики (Санкт-Петербург). Исследовали цитологические препараты, приготовленные традиционным способом с фиксацией и окраской цитологических препаратов азур-эозиновым красителем по методике Май-Грюнвальда-Гимза; оценку клеточного состава аспирата узловых образований ЩЖ — в соответствии с критериями международной классификации, принятой для оценки узловых образований щитовидной железы и стандартизации заключений The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology, Second Edition, 2017 г. Все цитологические образцы были исследованы сертифицированными цитопатологами. При пересмотре цитологических препаратов было исключено 24 образца плохого качества (низкая клеточность (менее 200 клеток), критические дефекты пробоподготовки или окраски цитологических препаратов).

Пересмотренные цитологические препараты были направлены на молекулярное исследование до этапа сопоставления результатов дооперационного цитологического и гистологического исследований операционного материала.

Общее количество образцов, отправленных на молекулярное исследование — 366 стеклопрепаратов.

Так же проводился ретроспективный анализ гистологических препаратов узловых образований щитовидной железы, цитологическое исследование которых проводили на первом этапе. Гистологические срезы получены из FFPE (фиксированные в формалине парафинизированные образцы). При ретроспективном анализе были исключены из исследования недостаточные информативные препараты (при предоставлении нерепрезентативных препаратов, при предоставлении недостаточного для точной диагностики количества вырезанного операционного материала), а также в случаях наличия двух разных опухолей в одной прооперированной доле щитовидной железы. Таким образом, на этапе пересмотра было исключено 8 гистологических образцов, не отвечающих критериям отбора.

Кроме того, 19 образцов были исключены при молекулярном исследовании по причине недостаточного количества выделенных нуклеиновых кислот (<5 нг/мкл тотальной РНК).

После выполнения молекулярно-генетических исследований было произведено сопоставление цитологических, гистологических и молекулярных результатов. При анализе и сопоставлении выявлено, что один из центров не предоставил гистологические препараты для 10 образцов. Эти случаи были исключены из исследования.

Таким образом, в работе было использовано 329 цитологических образцов: цитологическое заключение Bethesda II в 22 (6,7%), Bethesda IV в 226 (68,7%), Bethesda V в 6 (1,8%) и Bethesda VI в 75 (22,8%) (рис. 1). По типам патологических процессов получено следующее распределение: доброкачественное образование (ДО) — 32 случая, фолликулярная аденома (ФА) — 125, Гюртлеклеточная аденома (ГКА) — 60, фолликулярная карцинома (ФК) — 9, Гюртлеклеточная карцинома (ГКК) — 10, папиллярная карцинома (ПК) — 76, медулярная карцинома (МК) — 10, неоплазии паращитовидной железы (НПЩЖ) — 5, низкодифференцированная карцинома (НДК) — 1, анапластическая карцинома (АК) — 1. Доля рака щитовидной железы составила 32,5%. Мужчин было 52 (15,8% случаев), средний возраст 51 (18–83) лет, женщин — 277 случаев (84,2% случаев), средний возраст 52 (18–86) лет.

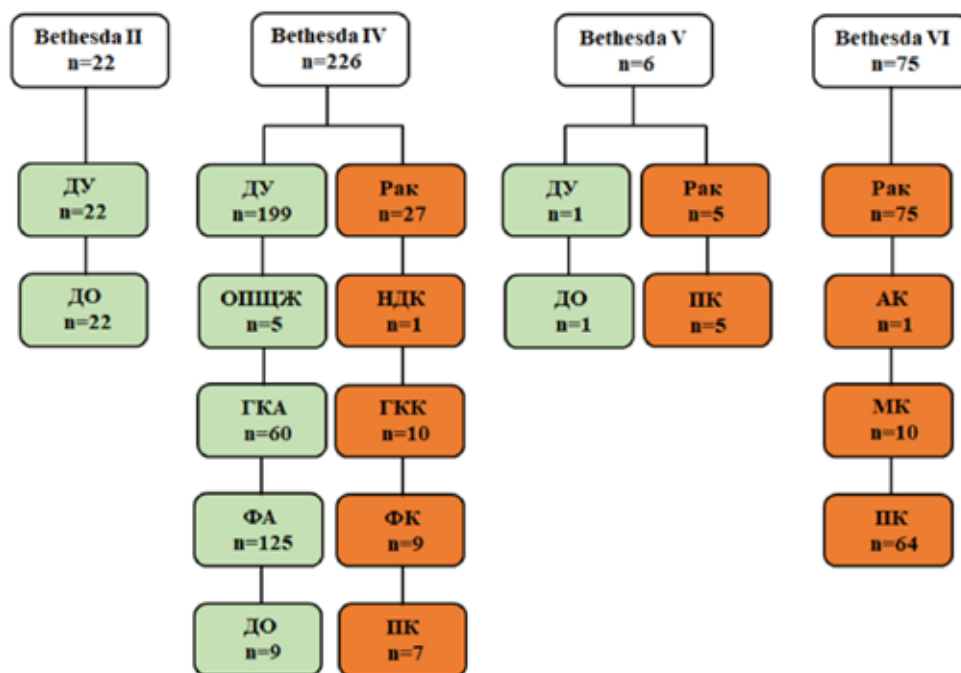


Рис. 1. Сравнение предоперационных цитологических и послеоперационных гистологических заключений

Диагностический алгоритм с использованием МГТ, ранее описанный [14], был использован с некоторыми изменениями (рис. 2). В блок дерева принятия решения для определения риска злокачественности был введен критерий «повышенное содержание миР-146b», но с дополнительной проверкой критерия «повышенное содержание миР-551b ИЛИ миР-31» для исключения ложноположительных результатов. Кроме того, в блок дерева принятия решения введено определение мутации V600E в гене BRAF.

Таким образом, данный классификатор позволяет распределить все цитологические образцы на следующие группы: доброкачественный узел, включающая доброкачественные образования и фолликулярные опухоли без маркеров злокачественности (ФА и ГКА); злокачественные, которые в свою очередь делятся на: папиллярные карциномы, медуллярные карциномы, Гюртлеклеточные карциномы и фолликулярные опухоли с маркерами злокачественности (ФО-МЗ), в последнюю группу входят фолликулярные раки и часть фолликулярных вариантов папиллярного рака. Анапластические и низкодифференцированные карциномы данным классификатором как отдельные типы не определяются, но, если определяются как злокачественные, то в зависимости от набора молекулярных маркеров, попадают в группу ПР или ФО-МЗ.

Нуклеиновые кислоты экстрагировали с цитологических стеклопрепаратов [10]: высушенный цитологический препарат промывали в микроцентрифужной пробирке с тремя порциями гуанидинового лизирующего буфера объемом 200 мкл. Образец энергично перемешивали и инкубировали в термостакане в течение 15 мин при 65 °С. Затем добавляли равный объем изопропанола. Реакцион-

ный раствор тщательно перемешивали и выдерживали при комнатной температуре в течение 5 мин. После центрифугирования в течение 10 мин при 14 000 g надосадочную жидкость удаляли, а осадок промывали 500 мкл 70% этанола и 300 мкл ацетона. Наконец, РНК растворяли в 200 мкл деионизированной воды. Если образцы РНК не анализировались немедленно, их хранили при температуре -20 °С до дальнейшего использования. Концентрацию общей РНК в каждом образце измеряли на флуориметре Qubit (Invitrogen, США) с помощью набора Qubit RNA HS Assay Kit. Образцы исключались из анализа, если концентрация общей РНК была ниже 5 нг/мкл.

Оценка относительных уровней экспрессии генов *GCM2* и *HMGA2* (нормализованных к гену *PGK1*), уровней микроРНК-146b, -221, -375, -31 и -551b (нормализованных к среднему геометрическому содержанию микроРНК 29b, 23a и 197) и соотношения митохондриальной и ядерной ДНК, а также определение соматической мутации V600E в гене BRAF были проведены, как описано ранее [12].

Данные обрабатывались в Excel (Microsoft, США) или Statistica 9.1 (StatSoft Inc., США). Диагностические характеристики определяли с помощью стандартных таблиц 2×2, сравнивающих качественные результаты бинарных молекулярных тестов (положительные или отрицательные) относительно эталонных стандартных диагнозов, сделанных при гистологическом исследовании. Доверительные интервалы для чувствительности, специфичности и точности были рассчитаны с помощью метода Клоппера–Пирсона. Доверительными интервалами для прогнозируемых значений являются доверительные интервалы, приведенные в [15].

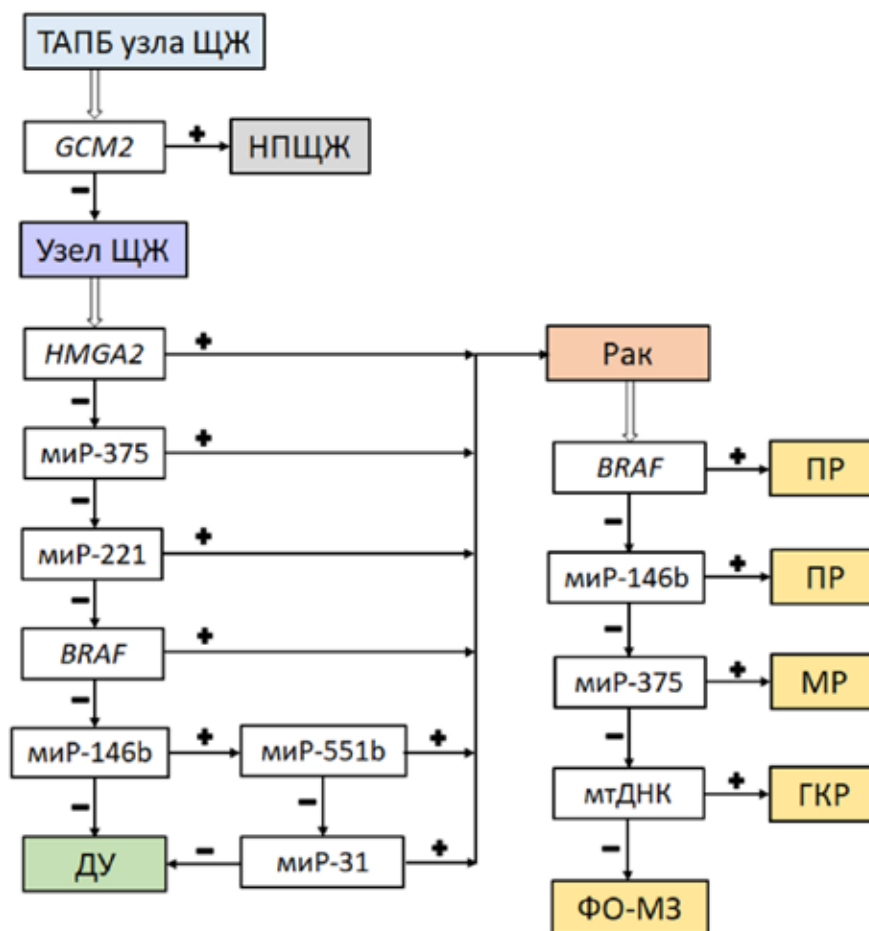


Рис. 2. Дерево решений для классификации образцов на доброкачественные и злокачественные с последующим типированием рака. (+/-) означает превышение/не превышение установленного порогового значения или идентификацию/не идентификацию мутации BRAF V600E

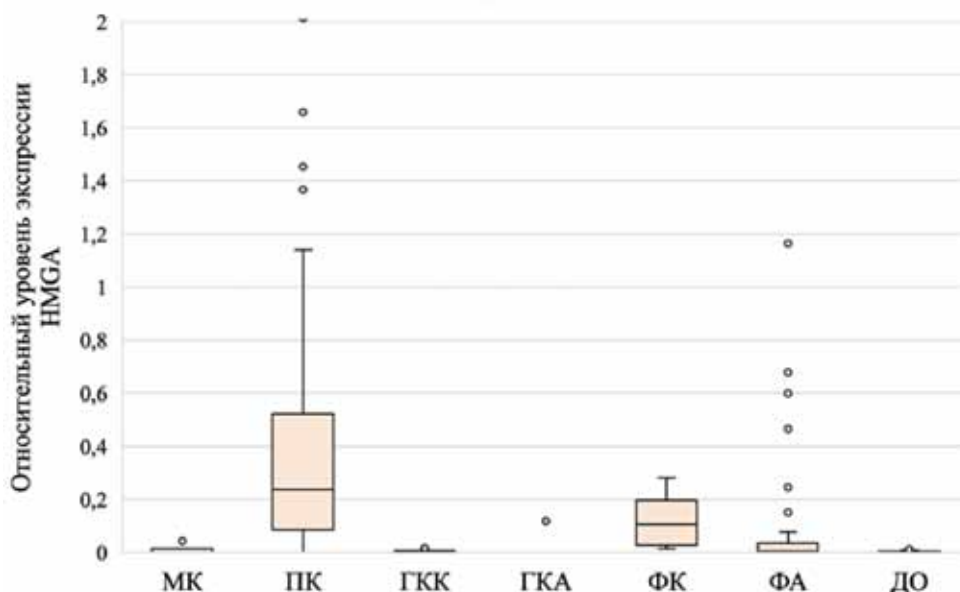


Рис. 3. Экспрессия мРНК *HMGA2* при зобе и опухолях щитовидной железы. На рисунке представлены медианное значение, верхний и нижний квартили, диапазон без выбросов и выбросы (кружки)

Результаты

Уровни экспрессии *HMGA2* в разных типах опухолей представлены на рис. 3.

Полученные в этой работе результаты хорошо согласуются с теми данными, которые были нами получены в предыдущем исследовании [13]: повышение уровня экспрессии *HMGA2* характерно для ПК и ФК, но не характерно для МК и ГКК. Однако, среди ФА также встретилось несколько ($n=11$; 8,8%) образцов с повышенным уровнем экспрессии *HMGA2*. В то же время для ГКА повышение уровня экспрессии *HMGA2* оказалось редким событием ($n=1$; 1,7%).

Относительная экспрессия миРНК в разных типах опухолей представлена на рис. 4.

В некоторых типах опухолей выявлена определенная закономерность изменения экспрессии миРНК. Так, для ПК характерно повышение относительного уровня экспрессии миРНК-146b ($n=71$; 93,4%), миРНК-31 ($n=58$; 76,3%) и миРНК-551b ($n=56$; 73,7%).

Для медуллярной карциномы характерно значительное повышение уровня миРНК-375 (100%), причем, хотя уровень ее экспрессии повышается, например, и при ПК ($n=44$; 57,9%), размах изменений при МК значительно выше. Отношение среднего значения уровня миРНК-375 при МК и ПК — 109,2, а отношение минимального уровня при МК и максимально при ПК — 5,1.

Содержание миРНК-221 повышено при ПК ($n=21$; 27,6%), но особенно при ГКК ($n=6$; 60%). Повышенный уровень миРНК-221 был обнаружен также в ряде образцов в группе ГКА ($n=6$; 10%).

Отношение митохондриальной и ядерной ДНК в разных типах опухолей представлено на рис. 5.

Как и ожидалось, отношение мтДНК/ядДНК оказалось заметно повышено в ГКК и ГКА. Кроме того, отдельные образцы с высоким количеством мтДНК были выявлены среди ДО, ПК и, особенно, ФА. Если говорить о количестве образцов, значение мтДНК/ядДНК в которых превысило отсечку, установленную в нашем классификаторе, то для ГКК это 90% ($n=9$), ГКА — 41,7% ($n=25$), ФА — 2,4% ($n=3$). Медианное значения для ГКА — 3170, для ФА — 553, тем не менее диапазоны значений перекрываются, для ГКА — 220–19 756, а для ФА — 108–9476. Медианное значения для ГКК — 7248, для ФК — 465.

На рис. 6 показана диаграмма движения образцов в рамках данного исследования.

329 образцов было проанализировано с помощью МГТ, из них 5 относились к опухолям паращитовидной железы. Образцы классифицировали как паращитовидную железу на основании анализа экспрессии гена *GCM2*. В данной работе точность определения опухолей паращитовидной железы равна 100%.

Стратификация образцов ЩЖ с помощью молекулярного теста показала, что правильно были определены: 10 из 10 образцов МК (100%); 69 из 76 образцов ПК (90,7%), как рак — 72 образца (94,7%); 6 из 10 образцов ГКК (60%); 4 из 9 образцов ФК (44,4%), как рак — 5 образцов (55,5%); 32 из 32 образцов ДО (100%); 112 из 125 образцов ФА (88,3%) и 53 из 60 образцов ГКА (89,6%) — как доброкачественные.

Получившиеся диагностические характеристики для выявления рака и разных типов злокачественных опухолей ЩЖ приведены в таблице.

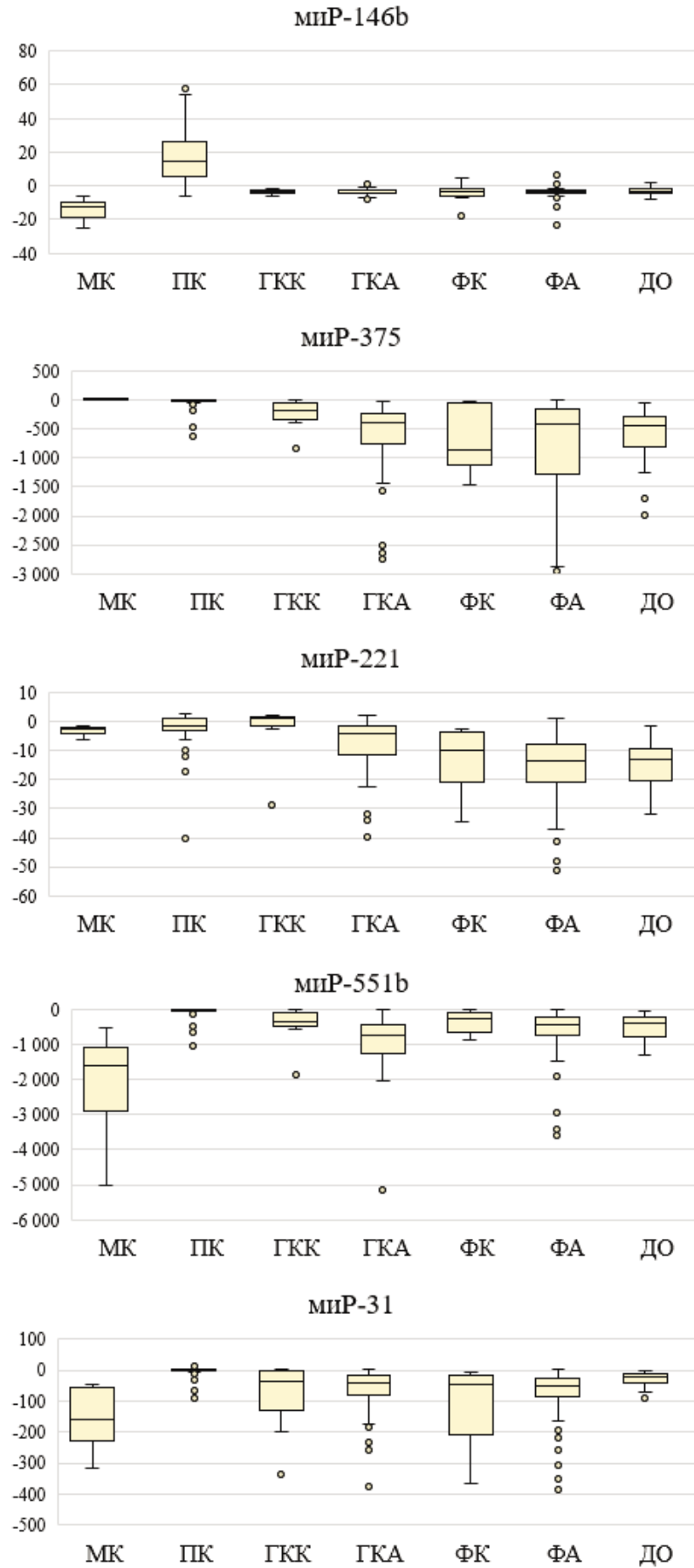


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии 5 микроРНК при зобе и опухолях щитовидной железы. На рисунке представлено медианное значение, верхний и нижний квартили, диапазон без выбросов и выбросы (кружки)

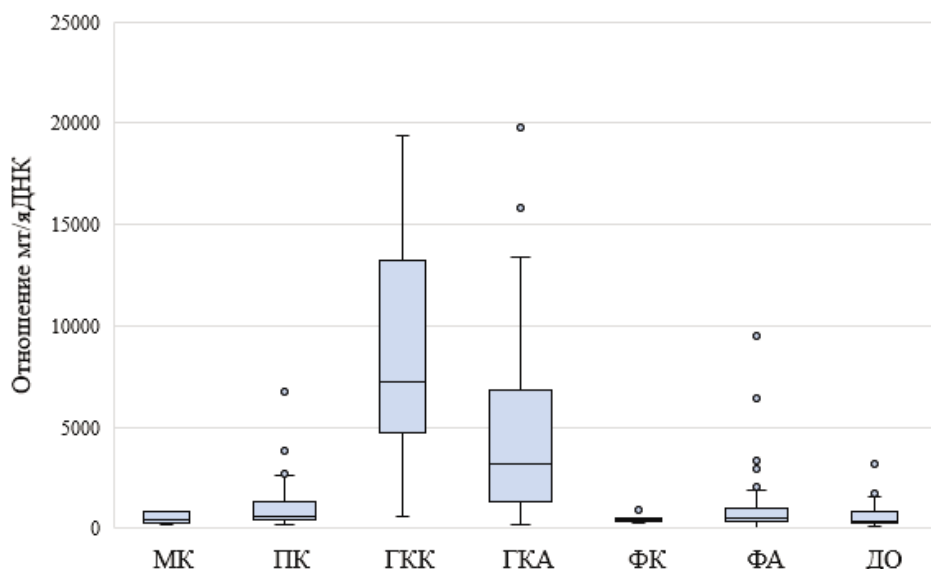


Рис. 5. Соотношение мтДНК/ядДНК при зобе и опухолях щитовидной железы. На рисунке представлено медианное значение, верхний и нижний квантили, диапазон без выбросов и выбросы (кружки)

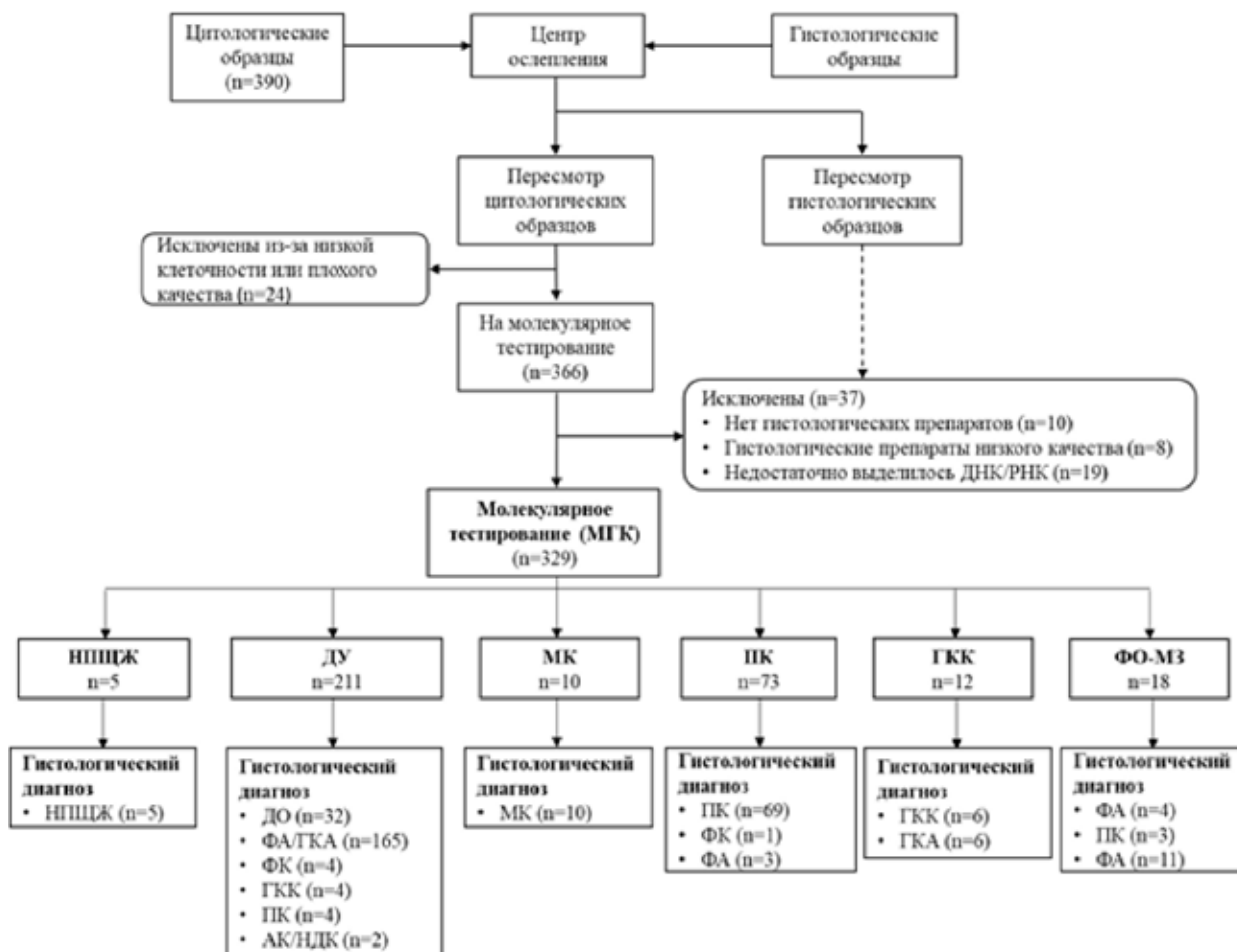


Рис. 6. Схема движения образцов данного исследования

Диагностические характеристики МГТ при выявлении рака среди образцов с неопределенной цитологией (цитологическими заключениями Bethesda IV, включая 95% ДИ) составили: специфичность — 90% (85–93,8%), чувствитель-

ность — 71,9% (53,2–86,2%), предсказательная ценность положительного результата (ПЦПР) — 53,5% (41,8–64,8%) и предсказательная ценность отрицательного результата (ПЦОР)– 95,2% (92–97,2%).

Диагностические характеристики молекулярного классификатора злокачественных опухолей (включая 95% доверительный интервал)

	Рак, n=107	МТС, n=10	ПК, n=76	ФК, n=9	ГКК, n=10
Специфичность, %	90,8	100,0	98,4	95,6	98,1
	(86,1–94,3)	(98,8–100,0)	(95,9–99,5)	(92,7–97,5)	(95,9–99,3)
Чувствительность, %	86,9	100,0	90,8	50,0	60,0
	(79,0–92,7)	(69,1–100,0)	(81,9–96,2)	(15,7–84,3)	(26,2–87,8)
Точность, %	89,5	100,0	96,6	94,4	96,9
	(85,6–92,6)	(98,9–100,0)	(94,0–98,3)	(91,4–96,7)	(94,4–98,5)
ПЦПР*, %	82,3	100,0	94,5	22,2	50,0
	(75,3–87,7)		(86,7–97,9)	(10,8–40,3)	(28,1–71,9)
ПЦОР**, %	93,4	100,0	97,2	98,7	98,7
	(89,6–95,8)		(94,5–98,6%)	(97,4–99,3)	(97,3–99,4)

Обсуждение

Цель молекулярно-генетического тестирования узлов щитовидной железы с неопределённым цитологическим результатом состоит в том, чтобы выделить пациентов, у которых риск злокачественного поражения низкий и которым может не применяться хирургическое лечение по онкологическим показаниям. Оценивая полученные результаты, можно констатировать, что 200 из 232 пациентов с цитологическим заключением Bethesda IV и Bethesda V, включённых в наше исследование, по данным последующего гистологического анализа не требовали хирургического лечения, при этом вероятность обнаружения рака в этой группе больных составила 13,8%. Из этих 200 образцов 180 (77,6% от всех пациентов с неопределённой цитологией) МГТ определил как доброкачественные, так что можно было ограничиться наблюдением за этими пациентами. В то же время молекулярный классификатор не выявил имеющийся по гистологическому заключению рак в 9 (3,9%) образцах: это 4 ГКК, 1 низкодифференцированная карцинома и 4 высокодифференцированные малоинвазивные фолликулярные карциномы. Такая частота соответствует доле риска недиагностированного рака ЩЖ среди узлов с цитологическим заключением Bethesda II [16, 17].

Заключение

Проведённая работа является первым слепым многоцентровым исследованием отечественного МГТ, которое подтвердило его клиническую эффективность в дифференциальной диагностике узловых образований щитовидной железы. Наши исследования подчеркивают, что решения об операции уже могут приниматься с учётом

результатов МГТ пациентов с неопределённым цитологическим заключением Bethesda IV, что должно привести к значительному снижению диагностических вмешательств на щитовидной железе. При этом отмечена недостаточная чувствительность теста к фолликулярному и Гюртлеклеточному раку, что заметно влияет на чувствительность теста и требует поиска дополнительных маркеров в отношении этой группы опухолей.

Вклад авторов:

Титов С.Е. — концепция и дизайн исследования, получение данных для анализа, интерпретация данных, обзор публикаций по теме статьи, написание рукописи;

Лукьянов С.А. — концепция и дизайн исследования, сбор клинических данных, получение данных для анализа, интерпретация данных, обзор публикаций по теме статьи, написание рукописи;

Козорезова Е.С. — концепция и дизайн исследования, валидация диагноза, получение данных для анализа;

Деменков П.С. — проверка подлинности данных, интерпретация данных;

Сергийко С.В. — концепция и дизайн исследования, техническая и административная поддержка, руководство исследованием;

Веряскина Ю.А. — получение данных, проверка подлинности данных;

Воробьев С.Л. — валидация диагноза, получение данных для анализа, техническая и административная поддержка;

Слепцов И.В. — техническая и административная поддержка, получение данных для анализа;

Гостимский А.В. — техническая и административная поддержка, получение данных для анализа.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии в статье конфликта интересов.

Финансирование

Исследование было финансировано в рамках государственного задания (ЕГИСУ НИОКТР № 121040100268-9), Российским научным фондом (проект № 20-14-00074), Институтом молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения РАН (проект FWGZ-2021-0014). Для обработки данных и расчетов использовались вычислительные ресурсы ЦКП «Биоинформатика» при поддержке бюджетного проекта № FWNR-2022-0020. Спонсорской поддержки исследование не имело.

ЛИТЕРАТУРА

- Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC et al. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis // *Acta Cytol.* 2012;56(4):333-339. doi:10.1159/000339959
- Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology // *Thyroid.* 2017;27:1341-6. doi:10.1089/thy.2017.0500
- Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer // *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association.* 2009;19(11):1167-214.
- Patel KN, Yip L, Lubitz CC et al. The American Association of Endocrine Surgeons Guidelines for the Definitive Surgical Management of Thyroid Disease in Adults // *Ann Surg.* 2020;271(3):e21-e93. doi:10.1097/SLA.0000000000003580
- Nikiforova MN, Mercurio S, Wals A et al. Analytical performance of the ThyroSeq v3 genomic classifier for cancer diagnosis in thyroid nodules // *Cancer.* 2018;124:1682-1690.
- Beaudenon-Huibregtse S, Alexander EK, Guttler RB et al. Centralized molecular testing for oncogenic gene mutations complements the local cytopathologic diagnosis of thyroid nodules // *Thyroid.* 2014;24:1479-1487.
- Patel KN, Angell TE, Babiarz J et al. Performance of a Genomic Sequencing Classifier for the Preoperative Diagnosis of Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules // *JAMA Surg* Published online. 2018. doi:10.1001/jamasurg.2018.1153
- Santos MTD, Buzolin AL, Gama RR et al. Molecular Classification of Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology: Development and Validation of a Highly Sensitive and Specific New miRNA-Based Classifier Test Using Fine-Needle Aspiration Smear Slides // *Thyroid.* 2018 Nov 22.
- Lupo MA, Walts AE, Sistrunk JW et al. Multiplatform molecular test performance in indeterminate thyroid nodules // *Diagn Cytopathol.* 2020;48(12):1254-1264. doi:10.1002/dc.24564
- Haddad RI, Nasr C, Bischoff L et al. NCCN Guidelines Insights: Thyroid Carcinoma, Version 2.2018 // *J Natl Compr Canc Netw.* 2018;16(12):1429-1440. doi:10.6004/jnccn.2018.0089
- Silaghi CA, Lozovanu V, Georgescu CE et al. Thyroseq v3, Afirma GSC, and microRNA Panels Versus Previous Molecular Tests in the Preoperative Diagnosis of Indeterminate Thyroid Nodules: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:649522. Published 13 May 2021. doi:10.3389/fendo.2021.649522
- Titov SE, Demenkov PS, Lukyanov SA. et al. Preoperative detection of malignancy in fine-needle aspiration cytology (FNAC) smears with indeterminate cytology (Bethesda III, IV) by a combined molecular classifier // *J Clin Pathol.* 2020;73(11):722-727. doi:10.1136/jclinpath-2020-206445
- Titov SE, Ivanov MK, Demenkov PS et al. Combined quantitation of HMG2 mRNA, microRNAs, and mitochondrial-DNA content enables the identification and typing of thyroid tumors in fine-needle aspiration smears // *BMC Cancer.* 2019;19:1010.
- Titov SE, Kozorezova ES, Demenkov PS et al. Preoperative Typing of Thyroid and Parathyroid Tumors with a Combined Molecular Classifier // *Cancers (Basel).* 2021;13(2):237. Published 11 Jan 2021. doi:10.3390/cancers13020237
- Mercaldo ND, Lau K.F, Zhou XH. Confidence intervals for predictive values with an emphasis to case-control studies // *Stat. Med.* 2007;26:2170-2183. doi:10.1002/sim.2677
- Reuters KB, Mamone MCOC, Ikejiri ES et al. Bethesda Classification and Cytohistological Correlation of Thyroid Nodules in a Brazilian Thyroid Disease // *Center. Eur Thyroid J.* 2018;7(3):133-138. doi:10.1159/000488104
- Park SY, Hahn SY, Shin JH et al. The Diagnostic Performance of Thyroid US in Each Category of the Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology // *PLoS One.* 2016;11(6):e0155898. Published 2016 Jun 27. doi:10.1371/journal.pone.0155898

Поступила в редакцию 17.06.2022 г.
Получена после доработки 09.08.2022 г.

*S.E. Titov^{1,2,3}, S.A. Lukyanov⁴, E.S. Kozorezova⁵,
P.S. Demenkov^{3,6}, S.V. Sergiyko⁴, Yu.A. Veryaskina^{1,6},
S.L. Vorobyev⁵, I.V. Sleptsov⁷, A.V. Gostimskii⁸*

Validation of preoperative diagnosis of malignant thyroid tumors using a molecular classifier

- ¹ Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Department of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
- ² «Vector-Best», Novosibirsk, Russia
- ³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
- ⁴ South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia
- ⁵ National Center for Clinical Morphological Diagnostics, St. Petersburg, Russia
- ⁶ Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia
- ⁷ Saint-Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia
- ⁸ Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

Background. Fine needle aspiration biopsy (FNA) of thyroid nodules under ultrasound control followed by cytological examination is the main method to assess the risk of malignancy of these formations. At the same time, vague and suspicious cytological findings (Bethesda III, IV) are indications for referring patients for surgical treatment, and in some cases this will be excessive. The analysis of molecular markers in the FNA

material in addition to cytological examination is a promising way to improve the preoperative diagnosis of thyroid nodules.

Aim. The aim of the study was improving accuracy of preoperative diagnosis of thyroid tumors.

Materials and methods. The validation of the diagnostic capabilities of the domestic molecular genetic test (MGT), developed for the differential diagnosis of thyroid tumors, was carried out on the basis of a retrospective multicenter blind study. The test was based on the assessment of the relative levels of expression of GCM2 and HMGA2 genes, microRNA levels -146b, -221, -375, -31 and -551b, the ratio of mitochondrial and nuclear DNA, as well as the determination of somatic mutation V600E in the BRAF gene. 329 cytological samples were analyzed, which included: 22 (6.7%) with the conclusion of Bethesda II, 226 (68.7%) of Bethesda IV, 6 (1.8%) of Bethesda V, and 75 (22.8%) of Bethesda VI.

Results. The following diagnostic characteristics were obtained for detection of malignant tumors by means of a molecular test in the study: specificity — 90.8%, sensitivity — 86.9%, positive predictive value — 82.3%, negative predictive value — 93.4%. The overall accuracy was 96.6% for detecting of papillary cancer with the molecular test, 94.4% for follicular cancer, 100% for medullary cancer, and 96.9% for Hürthle cell carcinoma.

Conclusion. The performed study demonstrates the possibility of detecting and typing thyroid tumors with the use of a panel of a small number of molecular markers detected in cytological preparations with real-time PCR. The accuracy of the domestic MGT is comparable with foreign analogues.

Key words: follicular thyroid tumor, thyroid cancer, molecular genetic testing

Сведения об авторах

Титов Сергей Евгеньевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, Институт молекулярной и клеточной биологии, Сибирское отделение РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева 8/2, titovse78@gmail.com

Лукьянов Сергей Анатольевич, канд. мед. наук, ассистент кафедры общей и детской хирургии, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64, 111111@mail.ru

Козорезова Евгения Сергеевна, врач клинической лабораторной диагностики, заместитель директора по развитию, ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики», Россия, 192283, Санкт-Петербург, ул. Олеко Дундича, 8, корп. 2, лит. А, kozorezovaes@yandex.ru

Деменков Павел Сергеевич, канд. техн. наук, научный сотрудник лаборатории компьютерной протеомики, Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева 8/2, demps@bionet.nsc.ru

Сергейко Сергей Владимирович, д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедры общей и детской хирургии, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64, ssv_1964@mail.ru

Веряскина Юлия Андреевна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, Институт молекулярной и клеточной биологии, Сибирское отделение РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева 8/2, microrna@inbox.ru

Воробьев Сергей Леонидович, канд. мед. наук, врач-патологоанатом, директор ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики», Россия, 192283 Санкт-Петербург, ул. Олеко Дундича, 8, корп. 2, лит. А, slvorob@gmail.ru

Слепцов Илья Валерьевич, д-р мед. наук, главный специалист по эндокринологии и эндокринной хирургии, Клиника высоких медицинских технологий им. Н.И. Пирогова, Санкт-Петербургский государственный университет, 190103, Санкт-Петербург, наб. р. Фонтанки, 154, newsurgery@yandex.ru

Гостимский Александр Вадимович, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой общей медицинской практики, ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2, gostimsky@mail.ru

Sergey Evgenievich Titov, PhD, Senior Researcher at the Laboratory of Molecular Genetics of the Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 8/2 Akad. Lavrent'eva Ave., Novosibirsk, 630090, Russia, titovse78@gmail.com

Sergey Anatolyevich Lukyanov, MD, PhD, Teaching Assistant of the Department of General and Pediatric Surgery of the South Ural State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 64 Vorovskogo str., Chelyabinsk, 454092, Russia, 111111@mail.ru

Evgeniya Sergeevna Kozorezova, MD, Physician of Clinical Laboratory of Diagnostics, Deputy Director for Development of LLC «National Center for / of Clinical Morphological Diagnostics», 8 Oleko Dundicha str., building 2A, St. Petersburg, 192283, Russia, kozorezovaes@yandex.ru

Pavel Sergeevich Demenkov, PhD, Researcher at the Laboratory of Computer Proteomics of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 8/2 Akad. Lavrent'eva Ave., Novosibirsk, 630090, Russia, demps@bionet.nsc.ru

Sergey Vladimirovich Sergiyko, MD., PhD, DSc, Associate Professor, Head of the Department of General and Pediatric Surgery of the South Ural State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 64 Vorovskogo str., Chelyabinsk, 454092, Russia, ssv_1964@mail.ru

Yulia Andreevna Veryaskina, Researcher at the Laboratory of Molecular Genetics of the Institute of Molecular and Cell Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 8/2 Akad. Lavrent'eva Ave., Novosibirsk, 630090, Russia, micrna@inbox.ru

Sergey Leonidovich Vorobyov, MD, PhD, pathologist, Director of LLC «National Center of Clinical Morphological Diagnostics», 8 Oleko Dundicha str., building 2A, St. Petersburg, 192283, Russia, slvorob@gmail.ru

Ilya Valeryevich Sleptsov, MD, PhD, DSc, Chief Specialist in Endocrinology and Endocrine Surgery of Pirogov Clinic of High Medical Technologies of St. Petersburg State University, 190103, 154 Fontanka River Embankment, St. Petersburg, Russia, newsurgery@yandex.ru

Alexander Vadimovich Gostimsky, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of General Medical Practice at Saint-Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 194100, 2 Litovskaya str., St. Petersburg, Russia, gostimsky@mail.ru