



© Я.А. Бандык<sup>1</sup>, М.С. Князева<sup>2</sup>, А.Ю. Гаранин<sup>2</sup>, К.Е. Кацуба<sup>2</sup>,  
 Л.М. Забегина<sup>2</sup>, Т.В. Шаронова<sup>2</sup>, А.В. Шалаев<sup>2</sup>, Е.Я. Гринькова<sup>2</sup>, Д.С. Плевако<sup>2</sup>, А.О. Нюганен<sup>2</sup>,  
 И.А. Полковникова<sup>3</sup>, А.С. Артемьева<sup>2</sup>, С.В. Апалько<sup>3</sup>, С.Г. Щербак<sup>2,3</sup>, А.В. Малек<sup>2</sup>

## Возможности дифференциальной диагностики фолликулярных неоплазий щитовидной железы путем анализа малых некодирующих РНК

<sup>1</sup>Общество с ограниченной ответственностью «Альгимед-Техно», г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>3</sup>Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городская больница № 40 Курортного района», г. Сестрорецк, Санкт-Петербург, Российская Федерация

© Yanina A. Bandyk<sup>1</sup>, Margarita S. Kniazeva<sup>2</sup>, Alexander Y. Garanin<sup>2</sup>, Konstantin E. Katsuba<sup>2</sup>,  
 Lidia M. Zabegina<sup>2</sup>, Tatiana V. Sharonova<sup>2</sup>, Andrey V. Shalaev<sup>2</sup>, Ekaterina Ya. Grinkova<sup>2</sup>,  
 Daniil S. Plevako<sup>2</sup>, Anna O. Nyuganen<sup>2</sup>, Irina A. Polkovnikova<sup>3</sup>, Anna S. Artemyeva<sup>2</sup>,  
 Svetlana V. Apalko<sup>3</sup>, Sergey G. Sherbak<sup>3</sup>, Anastasia V. Malek<sup>2</sup>

## Possibilities for Differential Diagnosis of Thyroid Follicular Neoplasia by Evaluation of Small Noncoding RNA

<sup>1</sup>Algimed-Techno LLC, Minsk, the Republic of Belarus

<sup>2</sup>N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, St. Petersburg, the Russian Federation

<sup>3</sup>City Hospital No. 40, Sestroretsk, the Russian Federation

**Введение.** Дооперационная дифференциальная диагностика узловых образований щитовидной железы, имеющих фолликулярную структуру, является не тривиальной задачей в силу отсутствия объективных признаков злокачественности. Это стимулирует исследования с целью поиска молекулярных маркеров фолликулярного рака и разработку диагностических тест-систем. Малые регуляторные РНК — группа молекул, выполняющих разные биологические функции, но имеющих сходную биохимическую структуру. Количественный анализ разных представителей этой группы может быть проведен одновременно с помощью идентичных технологий. Это определяет возможность комплексной оценки биологии клеток в составе анализируемого биоптата и разработки новых диагностических критериев. Целью исследования был сравнительный анализ профиля экспрессии малых РНК в клетках фолликулярной карциномы и фолликулярной аденомы щитовидной железы.

**Материалы и методы.** В исследование были включены образцы ткани фолликулярной карциномы (ФК, n = 12) и доброкачественной фолликулярной аденомы (ФА, n = 12) щитовидной железы, полученные после проведения тиреоидэктомии и гистологического исследования. Анализ профиля экспрессии коротких РНК был проведен методом глубокого секвенирования.

**Результаты.** Экспрессия (концентрация) транспортных РНК (tRNA), малых ядерных РНК (snRNA) и большой группы неклассифицированных молекул (miscRNA) повышена в клетках фолликулярной карциномы щитовидной железы, по сравнению с клетками фолликулярной аденомы, но диагностический потенциал отдельных молекул относительно невысокий. Тотальные концентрации молекул микроРНК (miRNA) оказались сопоставимы в группах ФК и ФА, анализ «реципрокных пар» маркерных молекул по-

**Introduction.** The preoperative differential diagnosis of follicular thyroid nodules is not a trivial issue due to the absence of objective signs of malignancy. This is stimulating efforts to find molecular markers of follicular cancer and to develop diagnostic test systems. Small regulatory RNAs are a large group of molecules that perform different biological functions, but have a similar biochemical structure. Quantitative analysis of different members of this group can be performed simultaneously using identical technology. This determines the possibility of a comprehensive assessment of the cellular biology of the samples analysed and the development of new diagnostic criteria. The purpose of the study was a comparative analysis of small RNAs expression profile in the samples of follicular thyroid cancer and follicular adenoma of the thyroid gland.

**Materials and Methods.** The study included tissue samples of follicular carcinoma (FC, n = 12) and benign follicular adenoma (FA, n = 12) of the thyroid gland obtained after thyroidectomy and histological examination. Analysis of the expression profile of short RNAs was carried out using next generation sequencing.

**Results.** The expression (concentration) of transfer RNAs (tRNAs), small nuclear RNAs (snRNAs), and a large group of unclassified molecules (miscRNA) is increased in FC compared to FA, but the diagnostic potential of individual molecules is relatively low. The total concentrations of microRNA molecules (miRNA) turned out to be comparable in the FC and FA groups; analysis of «reciprocal pairs» of miRNA markers allowed to differentiate FC and FA with a high degree of probability (AUC: 0.94-0.98). The total number of piwiRNA

зволяет дифференцировать ФК и ФА с высокой степенью вероятности (AUC: 0,94–0,98). Тотальное количество молекул пиРНК (piwiRNA) оказались несколько выше в образцах ФК, анализ «реципрокных пар» маркерных молекул позволяет уверенно дифференцировать ФК и ФА (AUC: 1,00).

**Выводы.** Анализ концентрации маркерных молекул микроРНК (miRNA) и пиРНК (piwiRNA) в материале тонкоигольной аспирационной биопсии представляется перспективным методом дополнительной диагностики узловых образований щитовидной железы, имеющих фолликулярную структуру.

**Ключевые слова:** фолликулярный рак щитовидной железы; дооперационная диагностика; глубокое секвенирование; микроРНК; пиРНК

**Для цитирования:** Бандык Я.А., Князева М.С., Гаранин А.Ю., Кацуба К.Е., Забегина Л.М., Шаронова Т.В., Шалаев А.В., Гринькова Е.Я., Плевако Д.С., Нюганен А.О., Полковникова И.А., Артемьева А.С., Апалько С.В., Щербак С.Г., Малек А.В. Возможности дифференциальной диагностики фолликулярных неоплазий щитовидной железы путем анализа малых некодирующих РНК. *Вопросы онкологии*. 2024; 70(2): 189-201.-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-2-189-201

molecules was slightly higher in FC samples compared to FA; analysis of «reciprocal pairs» of piwiRNA marker allows us to reliably differentiate FC and FA (AUC: 1.00).

**Conclusion.** Analysis of the concentration of marker miRNA and piwiRNA in fine-needle aspiration biopsy material appears to be a promising method for additional diagnosis of thyroid nodules with a follicular structure.

**Keywords:** follicular thyroid cancer; preoperative diagnosis; next generation sequencing; microRNA; piwiRNA

**For Citation:** Yanina A. Bandyk, Margarita S. Kniazeva, Alexander Y. Garanin, Konstantin E. Katsuba, Lidia M. Zabegina, Tatiana V. Sharonova, Andrey V. Shalaev, Ekaterina Y. Grinkova, Daniil S. Plevako, Anna O. Nyuganen, Irina A. Polkovnikova, Anna S. Artemyeva, Svetlana V. Apalko, Sergey G. Sherbak, Anastasia V. Malek. Possibilities for differential diagnosis of thyroid follicular neoplasia by evaluation of small noncoding RNA. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2024; 70(2): 189-201. (In Rus).-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-2-189-201

## Введение

*Проблема.* Неопластическая трансформация клеток щитовидной железы (ЩЖ) в большинстве случаев сопровождается формированием узловых образований, имеющих специфическую морфологию. Структурные особенности трансформированных клеток и архитектуры ткани узла лежат в основе классификации неоплазий. В большинстве случаев, визуальный анализ этих особенностей в ходе цитологического исследования материала тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) позволяет определить тип образования, оценить риск злокачественного характера ткани [1] и выбрать тактику лечения.

В «серой зоне» остается предоперационная диагностика узловых образований, сохраняющих фолликулярную структуру ткани без формирования особых цитологических признаков, но имеющих потенциал инвазивного роста. Эта проблема нашла отражение в алгоритме унификации цитологических диагнозов (The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology, TBSRTC) [2–4]. Категории Bethesda III (atypia of undetermined significance — атипия неопределенного значения) и Bethesda IV (follicular neoplasm — фолликулярное новообразование) предполагают наличие фолликулярных структур и соответствуют промежуточному риску злокачественности (22 % и 30 % соответственно). Рекомендованная врачебная тактика в этих группах предполагает на выбор: наблюдение, повторную ТАБ, молекулярное тестирование и/или диагностическую гемитиреоидэктомию. Интересно, что характер молекулярного тестирования не уточняется. Также отсутствуют объективные критерии злокачественности фолликулярных узлов

при их ультразвуковом исследовании [5, 6], даже с учетом возможностей «искусственного интеллекта» [7]. Таким образом, в современной клинической практике нет четких критериев выбора между консервативной и оперативной лечебной тактикой для пациентов с фолликулярными образованиями (Bethesda III/IV), т. е. этот выбор основывается на интуиции врача или настрое пациента и часто является вынужденной причиной неоправданных операций.

*Современное состояние проблемы (State of the art).* Практическая необходимость разработки методов молекулярной диагностики злокачественных фолликулярных узлов ЩЖ была констатирована давно [8]. Отчасти эта задача решалась в рамках тест систем (Afirma GSC, ThyGenX/ThyraMir и ThyroSeq) для анализа узлов любой (не только фолликулярной) структуры. Но высокая стоимость этих технологий и низкая диагностическая значимость в контексте узкой задачи дифференциальной диагностики фолликулярных образований препятствовали их широкому применению. Поиск молекулярных маркеров именно фолликулярного рака ЩЖ активно велся многими научными коллективами. В табл. 1 представлены исследования, в которых было проведено непосредственное сравнение молекулярно-генетических признаков ткани доброкачественных аденом (ФА) и фолликулярных карцином (ФК).

Несмотря на значительный объем сделанной работы, надежные молекулярные маркеры фолликулярного рака ЩЖ пока неизвестны. Большинство цитируемых исследований имели фундаментальный характер, авторы констатировали наличие разницы между молекулярно-генетическим «паттерном» ФА и ФК, но не занима-

**Таблица 1. Сравнительные исследования доброкачественных и злокачественных узловых образований щитовидной железы**  
**Table 1. Comparative analysis of benign and malignant thyroid nodules**

Год публикации	Учреждение, страна	Число образцов (ФА : ФК)	Класс исследуемых маркеров	Аналитическая платформа	Ссылка
2005	University of Cambridge, Великобритания	31 : 24	мРНК	U133A Gene Chips, Affimetrix	[9]
2010	University of Copenhagen, Дания	22 : 18	мРНК	U133plus2GeneChips, Affymetrix	[10]
2011	University of Nice Sophia Antipolis, Франция	7 : 6	микроРНК	Self-made array on platform GPL4717	[11]
2013	University of Pittsburgh Medical Center, США	83 : 36	ДНК	NGS: Ion PGM Sequencing	[12]
2016	University of Leipzig, Германия	20 : 24	микроРНК	RT-PCR	[13]
2017	Université libre de Bruxelles, Бельгия	20 : 12	мРНК/ микроРНК	Human exonic evidence-based oligonucleotide microarrays	[14]
2017	Nencki Institute of Experimental Biology, Польша	25 : 27	мРНК	U133 Plus 2.0 Gene Chips, Affimetrix	[15]
2018	The Catholic University of Korea, Корея	40 : 40	ДНК	Sanger sequencing	[16]
2018	Université libre de Bruxelles, Бельгия	20 : 8	мРНК/ микроРНК	U133 Plus 2.0 Gene Chips, Affimetrix	[17]
2019	Peking Union Medical College, КНР	48 : 53	ДНК	NGS: Nextseq500, Illumina	[18]
2020	НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург РФ	33 : 51	микроРНК	RT-PCR	[19]
2020	Manarat International University, Бангладеш	25 : 27	мРНК/ микроРНК	In silico: Protein-Protein Interaction (PPI) Subnetworks	[20]
2021	Karolinska Institute, Швеция	42 : 65	мРНК (DGCR8)	RT-PCR	[21]
2023	ФГБУ «Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН» Новосибирск, РФ	8 : 8	микроРНК	NGS: HiSeq1500, Illumina	[22]

лись идентификацией потенциальных маркеров и оценкой их диагностической значимости. В ряде случаев исследователи фокусировались на решении прикладных задач. Например, Frank Weber и соавт. показали, что комплексный анализ степени угнетения экспрессии генов CCND2, PSCK2 и активации экспрессии гена PLAV позволяет дифференцировать ФА и ФК с чувствительностью 100 % и специфичностью 94,7 % [9]. Позднее Rehannah Worup и соавт. продемонстрировали высокие показатели диагностической значимости (чувствительность 95,5 % и специфичность 94,4 %) метода, основанного на оценке феномена одновременного угнетения экспрессии двух ядерных рецепторов внутриклеточных транскрипционных факторов: NR4A1 и NR4A3 [10]. Tomas Stokowy и соавт. показали возможность дифференцировать ФА и ФК с чувствительностью 89 % и специфичностью 87 % путем анализа соотношения экспрессионной активности двух молекул микроРНК: miR-484/miR-148-3p [13]. Анализ четырех молекул мРНК (CPQ, PLVAR, TFF3 и ACVRL1) позволил тем же авторам решить эту задачу с чувствительностью 76 % и специфичностью 80 % [15]. В целом, анализ результатов, полученных разными исследовательскими группами с помощью разных аналитических подходов, указывает на

отсутствие «универсального» молекулярного маркера злокачественности ткани фолликулярного узла и необходимость разработки технологии комплексного анализа комбинации показателей. Причем, диагностическая эффективность метода молекулярно-генетического анализа может быть существенно повышена путем комплексного анализа маркеров разной природы (например, митохондриальная ДНК, мРНК и микроРНК) [23], и/или путем применения автоматизированных алгоритмов интерпретации экспрессионных данных [19, 24]. Таким образом, разработка и внедрение в клиническую практику метода дифференциальной диагностики ФА и ФК является не столько научной, сколько технологической задачей.

*Дизайн исследования.* Для решения этой задачи мы сфокусировали работу на поиске потенциальных маркеров ФК среди коротких, преимущественно регуляторных, молекул РНК. Сходная структура и размер этих молекул предполагает возможность использования идентичных технологий их количественного анализа, т. е. последующего создания мульти-факторных диагностических тест-систем. В рамках исследования предполагалось сравнить «профиль» коротких РНК в образцах ФК (n.12) и ФА (n.12). Исследование было проведено с помощью инновационной технологии «глубокого секвенирования»,

основанной на формировании «нано-клубков» (DNB, DNA nanoballs) из длинной нити ДНК, состоящей из множества коротких копий анализируемых фрагментов (MGI Tech Co., Ltd., Китай). Для анализа полученных данных была использована платформа mirMaster (Universitat des Saarland, Германия), которая позволяет провести анализ экспрессии разных классов коротких РНК, включая транспортные РНК (tRNA), малые ядерные РНК (snRNA), циркулярные РНК (circRNA), микроРНК (miRNA) и РНК, ассоциированные с белками семейства Piwi (pRNA). Для наиболее интересных классов молекул (miRNA, piwiRNA) был реализован ранее описанный алгоритм расчета соотношений концентрации маркеров с «реципрокным» характером ФК-ассоциированных изменений концентрации (экспрессии), идентифицированы наиболее перспективные «реципрокные пары» маркерных молекул.

### Материалы и методы

*Пациенты и материал.* План исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, выписка 27/27 № 1 от 28.01.2021 г. Все пациенты, которым планировалось проведение плановой тиреоидэктомии, подписали информированное согласие на участие в исследовании. Перед включением в исследование биологические образцы и клинические данные были деперсонализированы. Операционный материал (доля ЩЖ) немедленно помещался в забуференный раствор 10 % формалина в соотношении 1:10. После 24 часовой фиксации фрагмент ткани железы, содержащий узловое образование, вырезался в кассеты для дальнейшей гистологической проводки и последующей световой микроскопии. На основе гистологического исследования окрашенных гематоксилином эозином препаратов в исследование были включены образцы ткани ФА (n = 12) и ФК (n = 12).

*Выделение РНК.* Из образцов ткани были приготовлены срезы толщиной 3–4 мкм, депарафинизация срезов проводилась путем инкубации в 1 мл минерального масла при 65 °С — 15 мин., затем масло и парафин удалялись с помощью двух отмывок 96 % этанолом. Протеолиз был проведен в 100 мкл раствора протеиназы К, 2 мг/мл (активность: 30 ед. акт./мг, Альгимед-Техно, Беларусь) при 60 °С — 1 час. Оставшуюся после протеолиза ткань осаждали путем центрифугирования (10 000 × g, 4 °С — 10 мин.), супернатант (~ 100 мкл) переносили в чистую пробирку, добавляли 200 мкл буфера (0,8М ацетат натрия; рН 4,0; 0,5 % октановой кислоты) и 100 мкл р-ра гуанидин изотиоцианата (3 М), перемешивали, и инкубировали 5 мин.

при комнатной температуре. Образец переносили на спин-колонку, заполненную сорбентом (BioSilica, Россия), промывали дважды буфером для промывки № 1 (500 мкл; 0,5 М гуанидин изотиоцианат; 10 мМ трис-ацетат; рН 6,5; 50 % этанол; 1 % 2-меркаптоэтанол) и дважды буфером для промывки № 2 (500 мкл; 75 % этанол; 0,1М хлорид натрия, 10 мМ трис-гидрохлорид; рН 7,5). РНК с поверхности сорбента элюировали с помощью 50 мкл буфера для элюции (10 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 10 мМ ЭДТА). Концентрацию и качество выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США).

*Подготовка библиотек и секвенирование.* Подготовка материала для «глубокого» секвенирования была проведена с использованием набора реагентов (MGIEasy Small RNA Library Prep Kit) в соответствии с протоколом производителя. В ходе этого процесса молекулы РНК каждого образца были «дополнены» короткими последовательностями — адапторами. Эта модификация добавляла уникальную «метку» (barcode) каждому образцу и обеспечивала возможность последующей амплификации. Разделение ампликонов разного размера было проведено путем электрофореза в ПААГ, фрагменты нужного размера (100–120 нуклеотидов) были выделены из геля. Продукты амплификации (двунитевые ДНК) были «циркуляризованы» и использованы в качестве матрицы в реакции амплификации по типу «катящегося кольца» (RCA, rolling circle amplification) для формирования т. н. «нано-клубков» (DNB, DNA nanoball). Каждый такой «нано-клубок» был образован длинной нитью ДНК, состоящей из множества повторов последовательности анализируемой молекулы РНК. После формирования «нано-клубков» отдельные образцы (ФА, n. 12и ФК, n.12) были объединены, и смесь загружена в ячейку (MGISEQ-2000RS Sequencing Flow Cell). Анализ был проведен на приборе DNBSEQ-G400 (MGI Tech, Китай) путем одноконцевого прочтения методом синтеза.

*Анализ данных.* Основные показатели качества секвенирования, включая общее количество прочтений, количество оригинальных прочтений, относительное содержание оснований GC, проводили с помощью программы FastQC [25] и с помощью алгоритма, интегрированного в платформу miRMaster2 [26]. Дальнейший анализ данных был проведен с помощью платформы miRMaster и позволил идентифицировать «прочитанные» последовательности коротких РНК путем их сопоставления с соответствующими базами данных: miRBase 22.1 [27, 28], Ensembl [29], RNACentral 2021 [30], GtRNAdb 18.1 [31], NONCODE 5 [32], circBase [33]. После идентификации известных молекул был проведен

анализ особенностей их экспрессии в группах образцов: ФА (n.12) и ФК (n.12). Кластерный анализ был применен для выделения групп образцов, имеющих сходный профиль экспрессии молекул определенных классов. «Визуализация» дифференциальной экспрессии молекул каждого класса была проведена путем построения Volcano-диаграмм, в которых ось-X соответствует измерению силы статистического сигнала, а ось-Y соответствует измерению статистической значимости сигнала. Для отдельных молекул дифференциальная экспрессия в группах (ФА vs ФК) была оценена с помощью теста Манна – Уитни. Оценка диагностического потенциала отдельных маркерных молекул и соотношений их концентраций в составе «реципрокных пар» была проведена с помощью ROC-анализа.

### Результаты

Не классифицируемые короткие молекулы РНК (miscellaneous RNA, miscRNA). В каждой

клетке организма содержится большое количество молекул РНК: их размер колеблется от 20 до нескольких тысяч оснований, а количество молекул – представителей одного класса колеблется от десятков до десятков миллионов [34, 35]. Принято считать, что лишь несколько процентов этого разнообразия составляют РНК, кодирующие последовательность аминокислот в белковых молекулах, так называемые информационные (или матричные) РНК. Функции большинства остальных клеточных РНК остаются не известными. Благодаря появлению технологий «глубокого» секвенирования и применению автоматизированных алгоритмов анализа больших массивов данных секвенирования, за последние два десятилетия были описаны и отчасти исследованы отдельные классы некодирующих РНК. В нашем исследовании была использована технология, которая позволила выделить и «прочитать» все короткие (до 40–50 оснований) молекулы РНК, и метод идентификации «прочитанных» молекул путем поиска аналогов в базах молекул с известными (tRNA,

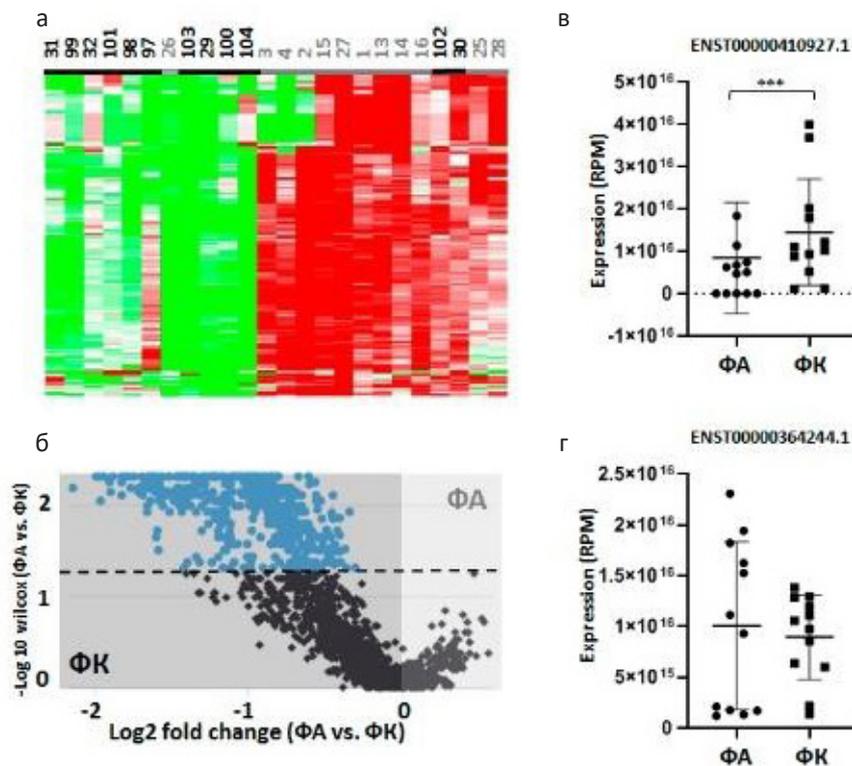


Рис. 1. Сравнительный анализ экспрессии неклассифицируемых коротких РНК в клетках фолликулярной аденомы (n.12) и фолликулярной карциномы (n.12); а — кластерный анализ (unsupervised clustering) нормализованных показателей (reads assigned per million mapped reads, RPM), цифрами черного цвета обозначены образцы ФК, цифрами серого цвета — образцы ФА; б — Volcano-диаграмма, где каждая точка отражает характер экспрессии одной молекулы в двух группах образцов: по оси X — Log<sub>2</sub> кратности количества молекул в образцах ФА относительно ФК, по оси Y — Log<sub>10</sub> T-критерия Вилкоксона, характеризующий статистическую значимость различия экспрессии данной молекулы в двух группах (ФА vs ФК); в и г — экспрессия отдельных транскриптов (ENST00000410927.1 и ENST00000364244.1) в образцах двух групп, выраженная через число прочтений на миллион идентифицированных транскриптов (RPM, reads assigned per million mapped reads). Оценка статистической значимости проведена с помощью теста Манна – Уитни: p < 0,0005 (\*\*\*)

Fig. 1. Comparative analysis of unidentified small RNA expression in cells of FA (n.12) and FC (n.12).

а — cluster analysis (unsupervised clustering) of normalized values (reads assigned per million mapped reads, RPM), values of black color correspond to FC samples, values of grey color correspond to FA samples; б — Volcano-plot displays points where each point shows extent of expression of a single molecule in two groups of samples: X-axis is Log<sub>2</sub>-fold number of molecules in FA samples compared to FC, Y-axis is Log<sub>10</sub> Wilcoxon T-test, evaluates statistical significance and difference of each single molecule in two groups (FA vs FC); в and г — expression of specific transcripts (ENST00000410927.1 and ENST00000364244.1) in samples of two groups displayed in RPM, reads assigned per million mapped reads. Evaluation of statistical significance was calculated via Mann – Whitney test: p < 0,0005 (\*\*\*)

snRNA, miRNA, piwiRNA) и еще не изученными (miscellaneous RNA) биологическими функциями. Кластерный анализ таких «неклассифицируемых» еще молекул разделил анализируемые образцы на две группы (рис. 1, а), практически соответствующие гистологическим диагнозам (ФА и ФК). Volcano-диаграмм (рис. 1, б) выявил большой кластер коротких РНК с неизвестными функциями, концентрация (или экспрессия) которых существенно и статистически значимо повышена в клетках ФК, по сравнению с клетками ФА. В качестве примера на рис. 1, в и рис. 1, г представлены результаты анализа двух молекул в образцах двух сравниваемых групп. Так, полученные результаты указывают на активацию экспрессии множества коротких некодирующих РНК в клетках злокачественных фолликулярных узлов, но функции этих молекул нам пока не известны, и биологический смысл этого феномена не понятен. Больше количество таких молекул в клетках ФК и статистическая значимость этой разницы указывают на возможный диагностический потенциал этого феномена, т. е. возможность количественной оценки множества молекул без «персонализации».

*Малые ядерные РНК (small nuclear RNA, snRNA).* Малые ядерные РНК — это класс молекул,

которые участвуют в процессе формирования зрелой молекулы информационной (или матричной) РНК (мРНК) в ядре [36]. Ключевыми этапами этого процесса является «вырезание» фрагментов (интронов) из длинной молекулы мРНК и «сшивание» в определенном порядке оставшихся частей (экзонов), так называемый «сплайсинг» (splicing). Малые ядерные РНК опосредуют взаимодействие мРНК и ядерных белков в составе так называемых «сплайсеосом» (spliceosome) — мульти-молекулярных комплексов, опосредующих сплайсинг. В рамках исследования было идентифицировано более тысячи таких молекул. Как и в случае группы miscRNA, профиль экспрессии snRNA «разделял» образцы на два кластера, соответствующих гистологическим диагнозам за исключением двух образцов, ФА № 26 и ФК № 30, профиль экспрессии snRNA не соответствовал гистологическому диагнозу (рис. 2, а). Интересно, что для этих же образцов наблюдалось противоречие между гистологическим диагнозом и экспрессионным профилем miscRNA (рис. 1, а). Volcano-диаграмма (рис. 2, б) также указывает на многочисленную группу snRNA, экспрессия которых статистически значимо повышена в ФК по сравнению с ФА, что может отражать большую транскрипционную активность злокачественных

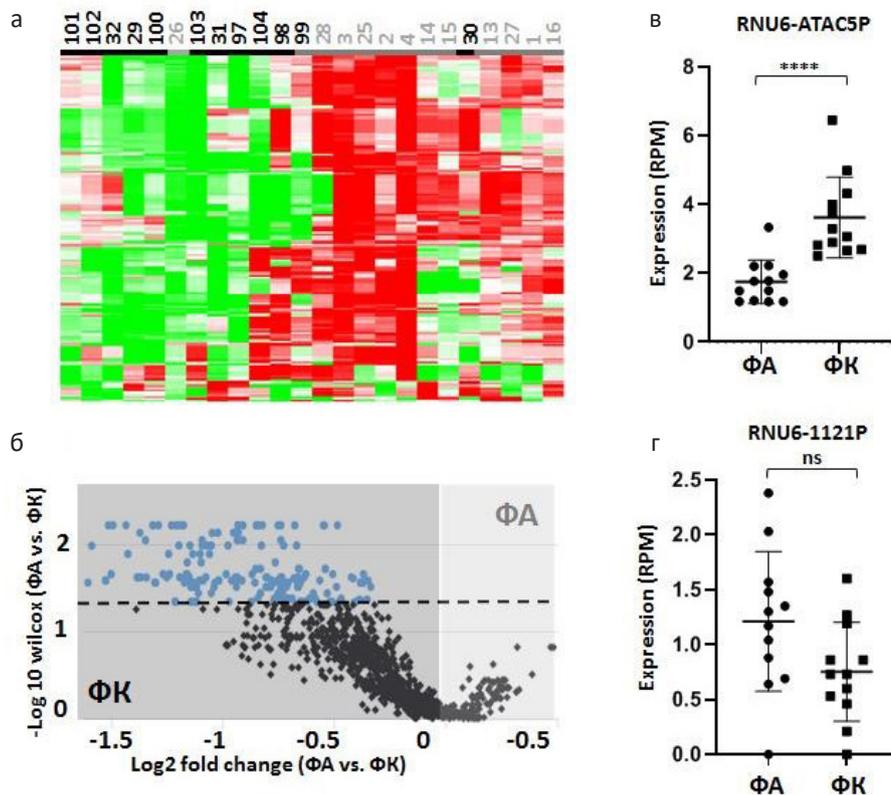


Рис. 2. Сравнительный анализ экспрессии малых ядерных РНК (snRNA) в клетках фолликулярной аденомы (n.12) и фолликулярной карциномы (n.12); а и б — идентично рис. 1, в, г. Экспрессия RNU6-ATAC5P и RNU6-1121P в образцах двух групп, выраженная через число прочтений на миллион идентифицированных транскриптов (RPM, reads assigned per million mapped reads). Оценка статистической значимости проведена с помощью теста Манна – Уитни:  $p < 0,00005$  (\*\*\*\*)

Fig. 2. Comparative analysis of small nuclear RNA (snRNA) expression in cells of FA (n.12) and FC (n.12); а and б are identical to Fig. 1, в, г. RU6-ATAC5p and RNA6-1121P in samples of two groups are displayed as RPM, reads assigned per million mapped reads. Evaluation of statistical significance is calculated via Mann – Whitney test:  $p < 0,00005$  (\*\*\*\*)

клеток в целом. При анализе отдельных молекул обращает на себя внимание незначительная разница нормализованных показателей экспрессии (значение RPM по оси Y) между сравниваемыми группами (рис. 2, в, г). Столь незначительная разница компрометирует snRNA в качестве маркеров дифференциальной диагностики ФА и ФК.

**Транспортные РНК (transfer RNA, tRNA).** Транспортные РНК — это класс молекул, размером от 73 до 93 нуклеотидов, которые имеют характерную вторичную структуру и выполняют функцию переноса аминокислот из цитоплазмы к рибосомам в процессе белкового синтеза. Геном человека кодирует более 500 молекул tRNA, такое разнообразие кажется избыточным для переноса аминокислот всего 20 типов. Экспрессия этих молекул имеет особенности, характерные для отдельных типов клеток или тканей [37, 38]. В дополнение к комбинации «целых» tRNA, клетки содержат короткие фрагменты этих молекул, биологическая роль которых пока плохо понятна. С учетом методологических особенностей нашей работы, анализ был сфокусирован именно

на фрагментах tRNA. Как было показано в ряде исследований, именно фрагменты транспортных РНК (tRNA fragments, tRFs) могут быть ассоциированы с процессом злокачественной трансформации [39, 40]. Кластерный анализ данных, полученных в исследовании, показал, что профиль экспрессии tRNA «отличает» образцы ФК и ФА (рис. 3, а), «исключение» составили ФА № 3, ФК № 99 и ФК № 102. Volcano-диаграмма (рис. 3, б) показала, что, как в случаях с snRNA и miscRNA, концентрация большого количества молекул tRNA статистически значимо повышена в клетках ФК (рис. 3, а). В качестве примера на рис. 4, в представлены результаты сравнительного анализа концентрации tRNA-Val-CAC-6-1 в образцах ФА и ФК. В тоже время статистически значимой активации экспрессии каких-либо молекул tRNA в образцах ФА обнаружено не было (рис. 3, б, г). Наблюдаемая картина, как и в случае miscRNA, позволяет предполагать, что количественный анализ tRNA или tRFs, без идентификации отдельных молекул, может иметь самостоятельное диагностическое значение.

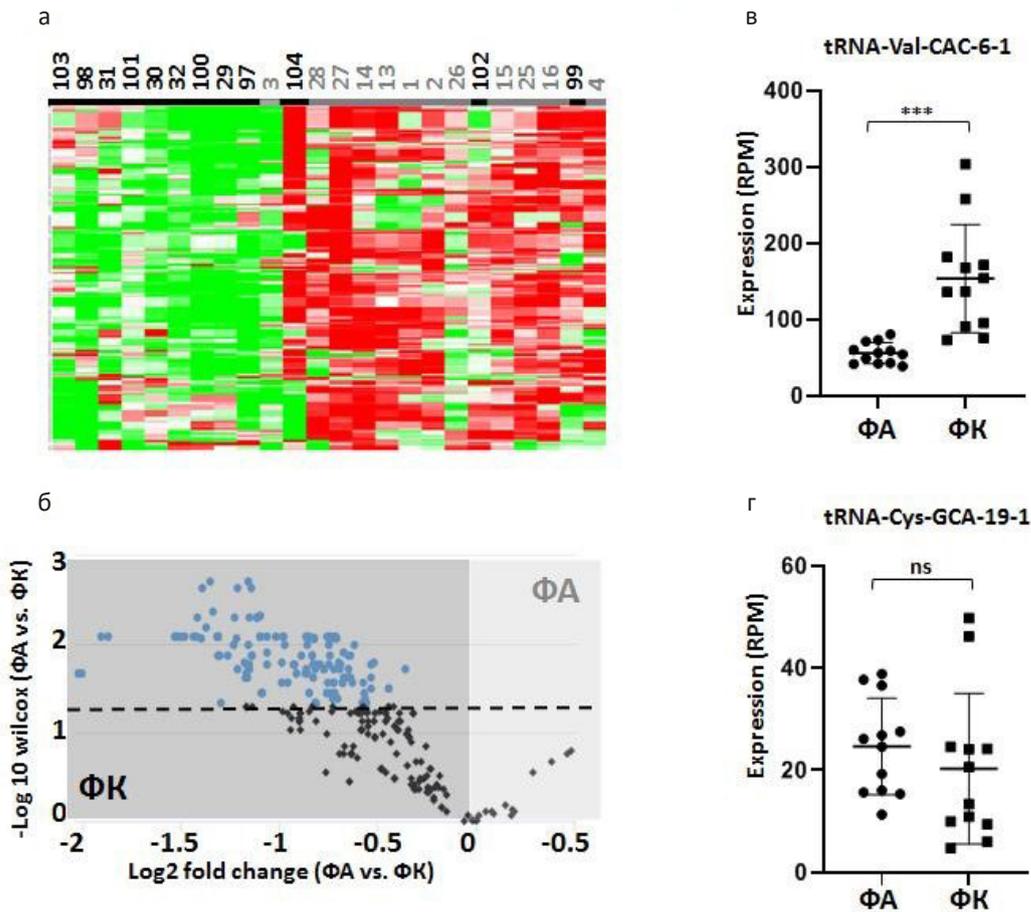


Рис. 3. Сравнительный анализ экспрессии транспортных РНК (tRNA) в клетках фолликулярной аденомы (n.12) и фолликулярной карциномы (n.12) а и б — идентично рис. 1, в, г. Экспрессия tRNA-Val-CAC-6-1 и tRNA-Cys-GCA-19-1 в образцах двух групп, выраженная через число прочтений на миллион идентифицированных транскриптов (RPM, reads assigned per million mapped reads). Оценка статистической значимости проведена с помощью теста Манна – Уитни: p < 0,0005 (\*\*\*)

Fig. 3. Comparative analysis of transfer RNA (tRNA) expression in cells of FA (n.12) and FC (n.12) a and б are identical to Fig. 1, в, г. tRNA-Val-CAC-6-1 and tRNA-Cys-GCA-19-1 expression in samples of two groups are displayed as RPM, reads assigned per million mapped reads. Evaluation of statistical significance was calculated via Mann – Whitney test: p < 0,005 (\*\*), p < 0,0005 (\*\*\*)

**МикроРНК (miRNA).** МикроРНК имеют размер 19–22 нуклеотида, регулируют стабильность молекул матричных РНК (мРНК) в клеточной цитоплазме и, таким образом, формируют механизм так называемого пост-транскрипционного контроля генной экспрессии. Участие этих молекул в канцерогенезе известна, а в наших ранних исследованиях была показана возможность использования этих молекул в качестве маркеров дифференциальной диагностики ФА и ФК [19]. В рамках этой работы предполагалось провести масштабное сравнение профиля экспрессии микроРНК в образцах ФА и ФК, что позволило бы выбрать наиболее перспективные диагностические маркеры. Но разница между составом микроРНК в образцах ФА и ФК оказалась относительно «скромной». Алгоритм неконтролируемой кластеризации (unsupervised clustering) не позволил «разделить» ФА и ФК, как это получалось при анализе miscRNA, snRNA или tRNA. Контролируемая кластеризация показала «пеструю» картину, которая отражает отсутствие очевидной разницы между ФА и ФК при ана-

лизе широкого профиля микроРНК (рис. 4, а). Volcano-плот не выявил существенной разницы в количестве молекул с повышенной или сниженной концентрацией в образцах ФА и ФК (рис. 4, б). Концентрация лишь двух молекул (miR-550a, miR-139) была статистически значимо повышена в клетках ФА. При более детальном анализе для ряда молекул была обнаружена разница экспрессионной активности, причем наблюдаемые различия были разнонаправлены и статистически значимы, например, в случаях miR-550a и miR-1248 (рис. 4, в, г). Эти данные указывают на отсутствие количественной разницы микроРНК клеток ФА и ФК, но качественные отличия (концентрация отдельных молекул) могут иметь диагностический потенциал. Валидация маркерных микроРНК требует дополнительных исследований.

**PIWI-ассоциированные РНК, piРНК (PiwiRNA).** Семейство пиРНК включает молекулы РНК средней длины 23–36 нуклеотидов, эти молекулы образуют стабильные комплексы с белками семейства PIWI — piRISC (piRNA-induced silencing complex). Предполагается, что

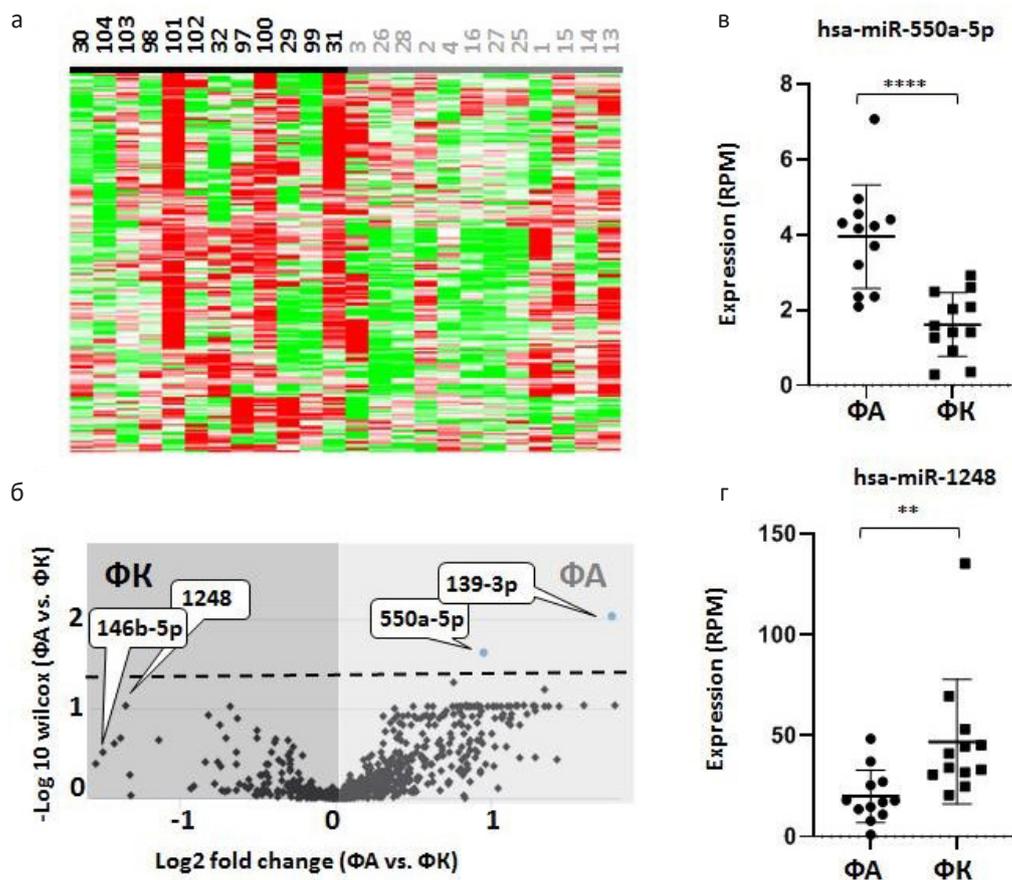


Рис. 4. Сравнительный анализ экспрессии микроРНК (microRNA) в клетках фолликулярной аденомы (n.12) и фолликулярной карциномы (n.12) а и б — идентично рис. 1, в, г. Экспрессия miR-550a-5p и miR-1248 в образцах двух групп, выраженная через число прочтений на миллион идентифицированных транскриптов (RPM, reads assigned per million mapped reads). Оценка статистической значимости проведена с помощью теста Манна – Уитни:  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,00005$  (\*\*\*\*).  
Fig. 4. Comparative analysis of microRNA (miRNA) expression in cells of FA (n.12) and FC (n.12) A. and B. are identical to Fig. 1, B, G. MiR-550a-5p and miR-1248 expression in samples of two groups are displayed as number of RPM, reads assigned per million mapped reads. Evaluation of statistical significance was calculated via Mann – Whitney test:  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,00005$  (\*\*\*\*)

основной биологической функцией пиРНК является контроль экспрессии транспозонов, регуляция генной экспрессии и участие в клеточной реакции на вирусную инфекцию [41]. Исследования последних лет показали участие piwiRNA в регуляции пролиферативной активности, инвазивного роста и резистентности к цитостатикам злокачественных клеток разной природы [42, 43]. Это указывает на возможный диагностический потенциал этих молекул. В нашем исследовании алгоритм неконтролируемой кластеризации разделил образцы на основе профиля экспрессии piwiRNA на две группы (рис. 5, а), соответствующим гистологическим диагнозам за исключением трех образцов (ФА № 3, ФА № 26 и ФК № 29). Это указывает на «глобальные» и воспроизводимые отличия между составом пиРНК в клетках ФА и ФК. Volcano-плот (рис. 5, б) демонстрирует большое число молекул с высокой концентрацией в клетках ФК и единичные молекулы с высокой концентрацией в клетках ФА. Можно полагать, что класс молекул пиРНК включает потенциальные маркеры дифференциальной диагностики ФА и ФК. При-

меры представлены на рис. 5, в, г. Более того, такие маркеры могут формировать «эффективные» реципрокные пары, что будет существенно повышать их диагностическое значение.

*Диагностический потенциал микроРНК (microRNA) и пиРНК (PiwiRNA).* Из всех классов малых РНК, которые были включены в анализ, высокий диагностический потенциал отдельных молекул был выявлен только в двух классах: микроРНК и пиРНК. Более детальное исследование включило ROC анализ отдельных молекул, выбор молекул с максимальными и минимальными значениями площади под кривой (area under curve, AUC), которые отражают активацию или угнетение экспрессии в клетках ФК, формирование «реципрокных» пар и расчет значений AUC для соотношений концентраций молекул в составе таких пар. При этом концентрация была выражена в нормализованных единицах — число прочтений на миллион (reads per million, RPM), а ROC анализ был проведен на группе из 24 образцов (ФА, n = 12) и ФК, n = 12). В табл. 2 в качестве примера представлены результаты для четырех молекул,

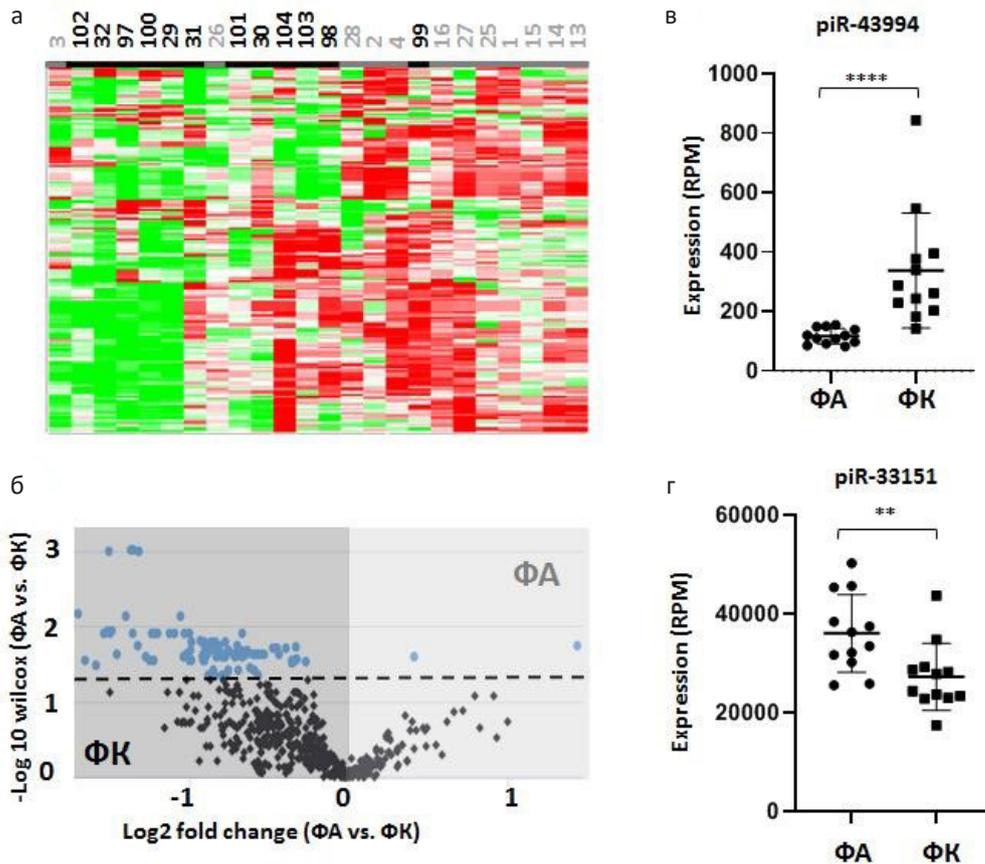


Рис. 5. Сравнительный анализ экспрессии пиРНК (piwiRNA) в клетках фолликулярной аденомы (n.12) и фолликулярной карциномы (n.12). а и б — идентично рис. 1, в, г. Экспрессия piR-43994 и piR-33151 в образцах двух групп, выраженная через число прочтений на миллион идентифицированных транскриптов (RPM, reads assigned per million mapped reads). Оценка статистической значимости проведена с помощью теста Манна – Уитни: p < 0,005 (\*\*), p < 0,00005 (\*\*\*\*)

Fig. 5. Comparative analysis of piRNA (piwiRNA) expression in cells of FA (n.12) and FC (n.12). а and б are identical to Fig. 1, в, г. Expression of piR-43994 and piR-33151 in samples of two groups are displayed as number of RPM, reads assigned per million mapped reads. Evaluation of statistical significance was calculated via Mann – Whitney test: p < 0,005 (\*\*), p < 0,000005(\*\*\*\*)

экспрессия которых активирована в клетках ФК (↑: miR-139-5p, Let7c-5p, miR-151a-5c, miR-143-3p) и для четырех молекул, экспрессия которых угнетена в клетках ФК (↓: miR-92a-3p-2; miR-221-3p; miR-200c-3p; miR-34a-5p). Справа от названия молекулы указано значение AUC, которое характеризует диагностический потенциал соответствующего маркера. Так, максимальное значение этого параметра было получено для miR-139-5p (0,90), минимальное — для miR-200c-3p (0,68). В нижней строке табл. 2 приведены значения параметра AUC, рассчитанное для соотношения концентраций этих молекул. Как видно из представленных данных, этот «прием»

позволяет существенно повысить диагностический потенциал анализа.

Рис. 6 наглядно демонстрирует, что расчетное значение соотношения концентраций двух маркерных молекул с реципрокным характером экспрессионных изменений, ассоциированных с развитием ФР, имеет больший диагностический потенциал, чем каждый маркер отдельно.

Результаты аналогичного анализа диагностического потенциала нескольких молекул пиРНК представлены в табл. 3. В соответствии с данными, представленными на рис. 5, Б, количество молекул пиРНК с усиленной в ФК экспрессией больше, чем количество молекул с пониженной

**Таблица 2. Диагностический потенциал отдельных молекул микроРНК и «реципрокных» пар микроРНК (Area Under Curve, AUC)**  
**Table 2. Diagnostic potential of specific microRNA molecules and «reciprocal» pairs of microRNA (Area Under Curve, AUC)**

	маркер	AUC	маркер	AUC	маркер	AUC	маркер	AUC
↑	139-5p	0,90	Let7c-5p	0,79	151a-5p	0,68	143-3p	0,87
↓	92a-3p-2	0,76	221-3p	0,76	200c-3p	0,58	34a-5p	0,75
R	139/92	0,98	7c/221	0,96	151/200c	0,96	143/34a	0,94

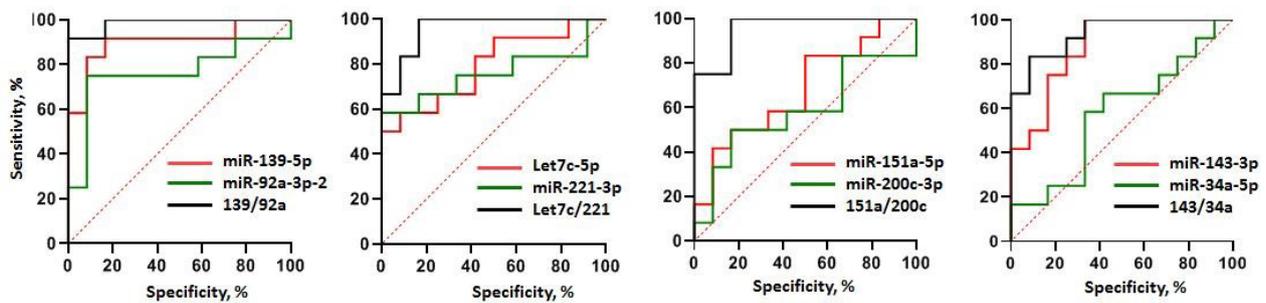


Рис. 6. Диагностический потенциал отдельных молекул микроРНК и «реципрокных» пар микроРНК (Receiver Operation Curve)  
Fig. 6. Diagnostic potential of specific microRNA molecules and «reciprocal» pairs of microRNA (Receiver Operation Curve)

**Таблица 3. Диагностический потенциал отдельных молекул пиРНК и «реципрокных» пар пиРНК (Area Under Curve, AUC)**  
**Table 3. Diagnostic potential of specific piRNA molecules and «reciprocal» pairs of piRNA (Area Under Curve, AUC)**

	маркер	AUC	маркер	AUC	маркер	AUC	маркер	AUC
↑	piR-43994	0,98	piR-60577	0,97	piR-43996	0,98	piR-61648	0,93
↓	piR-33151	0,84	piR-31143	0,59	piR-31142	0,67	piR-31115	0,59
R	33151/43994	1,00	31143/60577	1,00	31142/43996	1,00	31115/61648	1,00

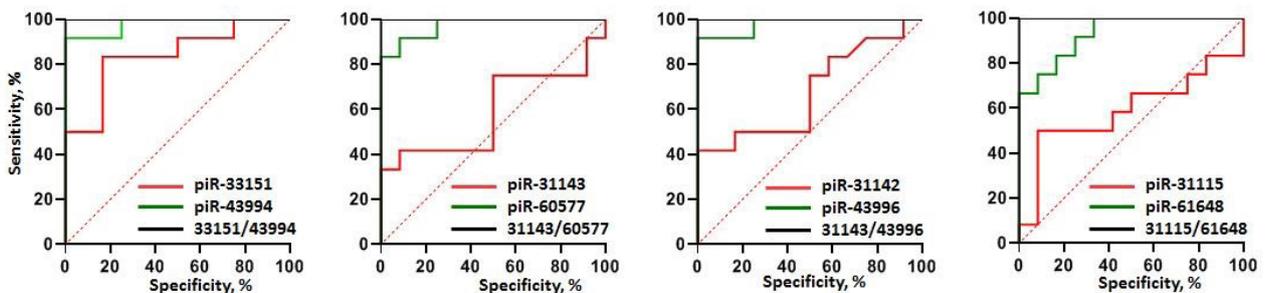


Рис. 7. Диагностический потенциал отдельных молекул пиРНК и «реципрокных» пар пиРНК (Receiver Operation Curve)  
Fig. 7. Diagnostic potential of specific piRNA molecules and «reciprocal» pairs of piRNA (Receiver Operation Curve)

относительно ФА экспрессией. Этот феномен находит отражение в показателях диагностической значимости: значения AUC молекул с высокой концентрацией в ФК (piR-43994, piR-60577, piR-43996, piR-61648) оказались в интервале 0,93–0,98; значения AUC молекул с низкой концентрацией в ФК (piR-33151, piR-31143, piR-31142, piR-31115) были существенно ниже: 0,59–0,84. Дальнейший анализ проведен по аналогии с методом расчета соотношений концентраций молекул микроРНК с реципрокным характером экспрессионных изменений. В случае пиРНК этот метод позволил достичь «абсолютных» показателей диагностической значимости: во всех четырех случаях AUC была равна 1,0.

Данные из табл. 3 графически представлены на рис. 7. В целом, полученные данные указывали на высокий диагностический потенциал молекул класса пиРНК (PiwiRNA), что оказалось неожиданным результатом. Механизмы участия этих молекул в процессе злокачественной трансформации изучены пока слабо, но это не препятствует использованию их высокого диагностического потенциала в практических целях.

### Обсуждение

В представленной работе был проведен сравнительный анализ экспрессии коротких регуляторных РНК в клетках фолликулярной карциномы и доброкачественной аденомы щитовидной железы. Целью исследования была оценка диагностического потенциала основных классов коротких регуляторных РНК, включая транспортные РНК (tRNA), малые ядерные РНК (snRNA), микроРНК (miRNA) и РНК, ассоциированные с белками семейства Piwi (piwiRNA). Дизайн исследования решал задачу поиска потенциальных маркеров фолликулярного рака сходной структуры, что определяло бы возможность их сочетанного анализа в рамках одной диагностической тест-системы.

В исследовании был описан интересный феномен существенного повышения концентрации молекул трех групп: miscRNA, tRNA и snRNA. Эти результаты указывают на возможность разработки диагностической технологии на основе количественного анализа молекул всех или одного из перечисленных классов без идентификации отдельных маркеров. Высокий диагностический потенциал представителей двух классов малых регуляторных РНК (miRNA и piwiRNA) был показан с помощью методов статистического анализа больших массивов данных (кластерный анализ, диаграмма рассеяния) и путем ROC-анализа отдельных молекул и расчетных показателей соотношений их концентраций. Особый интерес представляют результаты

оценки показателей диагностической значимости ряда молекул piwiRNA. Представители этого класса (piR-13643) ранее изучались китайскими исследователями в качестве маркеров папиллярной карциномы щитовидной железы (44,45), но в контексте задачи дифференциальной диагностики фолликулярных узлов piwiRNA еще не рассматривались.

### Заключение

Отдельные классы малых некодирующих РНК могут служить маркерами дифференциальной диагностики. Наибольший диагностический потенциал имеют микроРНК (miRNA) и пиРНК (pRNA).

#### *Конфликт интересов*

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### *Conflict of interest*

The authors declare no conflict of interest.

#### *Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики*

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА в редакции 2013 г. План исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, выписка 27/27 № 1 от 28.01.2021 г. Все пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

#### *Compliance with patient rights and principles of bioethics*

The study was carried out in accordance with the WMA Helsinki Declaration as amended in 2013. Research plan was approved by the local ethical committee N.N. Petrov NMRC of Oncology of MoH of Russia, protocol 27/27 № 1 dated 28.01.2021. All patient gave written informed consent to participate in the study.

#### *Финансирование*

Работа была проведена на средства государственного задания Минздрава России по теме «Разработка и клиническая апробация методов диагностики и прогнозирования эффекта терапии онкологических заболеваний на основе анализа микроРНК в биопсийном материале».

#### *Financing*

Financial support for this study was provided by MoH of Russia, the topic of the study is «Development and clinical test of methods for diagnosis and prognosis of therapeutic effect of cancer by miRNA analysis in biopsy».

#### *Участие авторов*

Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации, одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

#### *Authors' contributions*

The authors declare their authorship to comply with the international ICMJE criteria. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, have approved the final version of the article before publication, agreed to assume responsibility for all aspects of the work, implying proper review and resolution of issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Воробьев С.Л. Морфологическая диагностика заболеваний щитовидной железы: (цитология для патологов, патология для цитологов). Санкт-Петербург: Коста. 2014. [Vorobyov S.L. Morphological diagnostics of thyroid diseases: (cytology for pathologists, pathology for cytologists). Saint Petersburg. Kosta. 2014. (In Rus)].
2. Bongiovanni M., Spitale A., Faquin W.C., et al. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: a meta-analysis. *Acta Cytol.* 2012; 56(4): 333-9.-DOI: <https://doi.org/10.1159/000339959>.
3. Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. *Thyroid.* 2017; 27(11): 1341-1346.-DOI: <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0500>.
4. Ali S.Z., Baloch Z.W., Cochand-Priollet B., et al. The 2023 Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. *Thyroid.* 2023; 33(9): 1039-1044.-DOI: <https://doi.org/10.1089/thy.2023.0141>.
5. Li W., Song Q., Lan Y., et al. The value of sonography in distinguishing follicular thyroid carcinoma from adenoma. *Cancer Manag Res.* 2021; 13: 3991-4002.-DOI: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S307166>.
6. Kuo T.C., Wu M.H., Chen K.Y., et al. Ultrasonographic features for differentiating follicular thyroid carcinoma and follicular adenoma. *Asian J Surg.* 2020; 43(1): 339-346.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2019.04.016>.
7. Lin A.C., Liu Z., Lee J., et al. Generating a multimodal artificial intelligence model to differentiate benign and malignant follicular neoplasms of the thyroid: A proof-of-concept study. *Surgery.* 2024; 175(1): 121-127.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.surg.2023.06.053>.
8. Daniels G.H. Follicular thyroid carcinoma: a perspective. *Thyroid.* 2018; 28(10): 1229-1242.-DOI: <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0306>.
9. Weber F., Shen L., Aldred M.A., et al. Genetic classification of benign and malignant thyroid follicular neoplasia based on a three-gene combination. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(5): 2512-21.-DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2004-2028>.
10. Borup R., Rossing M., Henaó R., et al. Molecular signatures of thyroid follicular neoplasia. *Endocr Relat Cancer.* 2010; 17(3): 691-708.-DOI: <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0288>.
11. Lassalle S., Hofman V., Ilie M., et al. Can the microRNA signature distinguish between thyroid tumors of uncertain malignant potential and other well-differentiated tumors of the thyroid gland? *Endocr Relat Cancer.* 2011; 18(5): 579-94.-DOI: <https://doi.org/10.1530/ERC-10-0283>.
12. Nikiforova M.N., Wald A.I., Roy S., et al. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98(11): E1852-60.-DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2292>.
13. Stokowy T., Wojtas B., Jarzab B., et al. Two-miRNA classifiers differentiate mutation-negative follicular thyroid carcinomas and follicular thyroid adenomas in fine needle aspirations with high specificity. *Endocrine.* 2016; 54(2): 440-447.-DOI: <https://doi.org/10.1007/s12020-016-1021-7>.
14. Dom G., Frank S., Floor S., et al. Thyroid follicular adenomas and carcinomas: molecular profiling provides evidence for a continuous evolution. *Oncotarget.* 2017; 9(12): 10343-10359.-DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23130>.
15. Wojtas B., Pfeifer A., Oczko-Wojciechowska M., Krajewska J, et al. Gene expression (mRNA) markers for differentiating between malignant and benign follicular thyroid tumours. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(6): 1184.-DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18061184>.
16. Jung C.K., Kim Y., Jeon S., et al. Clinical utility of EZH1 mutations in the diagnosis of follicular-patterned thyroid tumors. *Hum Pathol.* 2018; 81: 9-17.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.04.018>.
17. Rossing M., Borup R., Henaó R., et al. Down-regulation of microRNAs controlling tumorigenic factors in follicular thyroid carcinoma. *J Mol Endocrinol.* 2012; 48(1): 11-23.-DOI: <https://doi.org/10.1530/JME-11-0039>.
18. Duan H., Liu X., Ren X., et al. Mutation profiles of follicular thyroid tumors by targeted sequencing. *Diagn Pathol.* 2019; 14(1): 39.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s13000-019-0817-1>.
19. Knyazeva M., Korobkina E., Karizky A., et al. Reciprocal dysregulation of MiR-146b and MiR-451 contributes in malignant phenotype of follicular thyroid tumor. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(17): 5950.-DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21175950>.
20. Hossain M.A., Asa T.A., Rahman M.M., et al. Network-based genetic profiling reveals cellular pathway differences between follicular thyroid carcinoma and follicular thyroid adenoma. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17(4): 1373.-DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph17041373>.
21. Paulsson J.O., Rafati N., DiLorenzo S., et al. Whole-genome sequencing of follicular thyroid carcinomas reveal recurrent mutations in microRNA processing subunit DGCR8. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021; 106(11): 3265-3282.-DOI: <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab471>.
22. Титов С.Е., Лукьянов С.А., Сергийко С.В., et al. Проблемы диагностики фолликулярного рака щитовидной железы. *Опухоли головы и шеи.* 2023; 13(3): 10-23.-DOI: <https://doi.org/10.17650/2222-1468-2023-13-3-10-23>. [Titov S.E., Lukyanov S.A., Sergiyko S.V., et al. Problems of follicular thyroid carcinoma diagnostics. *Head and Neck Tumors (HNT).* 2023; 13(3): 10-23.-DOI: <https://doi.org/10.17650/2222-1468-2023-13-3-10-23>. (In Rus)]. Titov S.E., Ivanov M.K., Demenkov P.S., et al. Combined quantitation of HMGA2 mRNA, microRNAs, and mitochondrial-DNA content enables the identification and typing of thyroid tumors in fine-needle aspiration smears. *BMC Cancer.* 2019; 19(1): 1010.
23. Kniazeva M., Zabegina L., Shalaev A., et al. NOVAprep-miR-Cervix: new method for evaluation of cervical dysplasia severity based on analysis of six miRNAs. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(11): 9114.-DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24119114>.
24. Wingett S.W., Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res.* 2018; 7: 1338.-DOI: <https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.2>.
25. Fehlmann T., Kern F., Laham O., et al. miRMaster 2.0: multi-species non-coding RNA sequencing analyses at scale. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(W1): W397-W408.-DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab268>.
26. Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(D1): D155-D162.-DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>.
27. Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(Database issue): D68-73.-DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1181>.
28. Yates A.D., Achuthan P., Akanni W., et al. Ensembl 2020. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48(D1): D682-D688.-DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz966>.
29. Sweeney B.A., Petrov A.I., Ribas C.E., et al. RNAcentral Consortium. RNAcentral 2021: secondary structure integration, improved sequence search and new member databases. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(D1): D212-D220.-DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa921>.
30. Thornlow B.P., Armstrong J., Holmes A.D., et al. Predicting transfer RNA gene activity from sequence and genome context. *Genome Res.* 2020; 30(1): 85-94.-DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.256164.119>.

31. Zhao Y., Li H., Fang S., et al. NONCODE 2016: an informative and valuable data source of long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(D1): D203-8.-DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1252>.
32. Glažar P., Papavasileiou P., Rajewsky N. circBase: a database for circular RNAs. *RNA.* 2014; 20(11): 1666-70.-DOI: <https://doi.org/10.1261/rna.043687.113>.
33. Walter N.G. Are non-protein coding RNAs junk or treasure? An attempt to explain and reconcile opposing viewpoints of whether the human genome is mostly transcribed into non-functional or functional RNAs. *Bioessays.* 2024; 46(4): e2300201.-DOI: <https://doi.org/10.1002/bies.202300201>.
34. Palazzo A.F., Lee E.S. Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front Genet.* 2015; 6.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00002>.
35. Valadkhan S., Gunawardane L.S. Role of small nuclear RNAs in eukaryotic gene expression. *Essays Biochem.* 2013; 54: 79-90.-DOI: <https://doi.org/10.1042/bse0540079>.
36. Pinkard O., McFarland S., Sweet T., Collier J. Quantitative tRNA-sequencing uncovers metazoan tissue-specific tRNA regulation. *Nat Commun.* 2020; 11(1): 4104.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17879-x>.
37. Torres A.G. Enjoy the silence: nearly half of human tRNA genes are silent. *Bioinform Biol Insights.* 2019; 13: 1177932219868454.-DOI: <https://doi.org/10.1177/1177932219868454>.
38. Yu M., Lu B., Zhang J., et al. tRNA-derived RNA fragments in cancer: current status and future perspectives. *J Hematol Oncol.* 2020; 13(1): 121.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00955-6>.
39. Ren D., Mo Y., Yang M., et al. Emerging roles of tRNA in cancer. *Cancer Lett.* 2023; 563: 216170.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216170>.
40. Ozata D.M., Gainetdinov I., Zoch A., et al. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nat Rev Genet.* 2019; 20(2): 89-108.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0073-3>.
41. Yuan C., Qin H., Ponnusamy M., et al. PIWI-interacting RNA in cancer: Molecular mechanisms and possible clinical implications (Review). *Oncol Rep.* 2021; 46(3): 209.-DOI: <https://doi.org/10.3892/or.2021.8160>.
42. Yao J., Xie M., Ma X., et al. PIWI-interacting RNAs in cancer: Biogenesis, function, and clinical significance. *Front Oncol.* 2022; 12: 965684.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.965684>.
43. Zhang Z., Liu N. PIWI interacting RNA-13643 contributes to papillary thyroid cancer development through acting as a novel oncogene by facilitating PRMT1 mediated GLII methylation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2023; 1867(11): 130453.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2023.130453>.
44. Chang Z., Ji G., Huang R., et al. PIWI-interacting RNAs piR-13643 and piR-21238 are promising diagnostic biomarkers of papillary thyroid carcinoma. *Aging (Albany NY).* 2020; 12(10): 9292-9310.-DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.103206>.

Поступила в редакцию / Received / 14.02.2024  
 Прошла рецензирование / Reviewed / 20.03.2024  
 Принята к печати / Accepted for publication / 11.04.2024

**Сведения об авторах / Author Information / ORCID**

- Янина Александровна Бандык / Yanina A. Bandyk / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6148-6778>, SPIN-code: 7320-5006.
- Маргарита Сергеевна Князева / Margarita S. Kniازهva / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2079-5061>, SPIN-code: 1435-9601.
- Александр Юрьевич Гаранин / Alexander Yu. Garanin / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8313-3794>, SPIN-code: 7320-5006.
- Константин Евгеньевич Кацуба / Konstantin E. Katsuba / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7373-5206>, SPIN-code: 7345-9100.
- Лидия Михайловна Забегина / Lidia M. Zabegina/ ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0827-164>, SPIN-code: 9886-7610.
- Татьяна Валерьевна Шаронова / Tatyana V. Sharonova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5372-1253>, SPIN-code: 4328-7064.
- Андрей Владимирович Шалаев / Andrey V. Shalaev / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6148-6994>, SPIN-code: 9971-1945.
- Екатерина Ярославовна Гринькова / Ekaterina Ya. Grinkova / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0002-7238-5870>, SPIN-code: 7865-6899.
- Даниил Сергеевич Плевако / Daniil S. Plevako / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5657-130X>, SPIN-code: 8770-9117.
- Анна Олеговна Нюганен / Anna O. Nyuganen / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2685-5093>, SPIN-code: 2357-6059.
- Ирина Андреевна Полковникова / Irina A. Polkovnikova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9178-8512>, SPIN-code: 1081-6432.
- Анна Сергеевна Артемьева / Anna S. Artemyeva / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2948-397X>, SPIN-code: 5760-5463.
- Светлана Вячеславовна Апалько / Svetlana V. Apalko / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3853-4185>, SPIN-code: 7053-2507.
- Сергей Григорьевич Щербак / Sergey G. Shcherbak / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5036-1259>, SPIN-code: 1537-9822.
- Анастасия Валерьевна Малек / Anastasia V. Malek / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5334-7292>, SPIN-code: 6445-3432.

