

# Дооперационное выявление метастазов папиллярного и медуллярного рака щитовидной железы в шейных лимфатических узлах с помощью молекулярного классификатора

С.Е. Титов<sup>1-3</sup>, Г.А. Катанян<sup>4</sup>, Т.Л. Полоз<sup>5</sup>, Л.Г. Измайлова<sup>4</sup>, О.А. Зенцова<sup>4</sup>, Л.Г. Дряева<sup>4</sup>, В.В. Анищенко<sup>6,7</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук»;

Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8/2;

<sup>2</sup>АО «Вектор-Бест»; Россия, 630117 Новосибирск, ул. Арбузова, 1/1;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»;

Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 1;

<sup>4</sup>ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2» министерства здравоохранения Краснодарского края;

Россия, 350012 Краснодар, ул. Красных партизан, 6;

<sup>5</sup>ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Новосибирск»; Россия, 630003 Новосибирск, ул. Владимировский спуск, 2а;

<sup>6</sup>АО «Медицинский центр «Авиценна»» группы компаний «Мать и дитя»; Россия, 630007 Новосибирск, ул. Коммунистическая, 17;

<sup>7</sup>ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;

Россия, 630091 Новосибирск, Красный просп., 52

**Контакты:** Сергей Евгеньевич Титов titovse78@gmail.com

**Введение.** Основным методом дооперационной диагностики рака щитовидной железы (РЩЖ) и выявления его метастазов — цитологическое исследование препаратов, полученных при тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии. Однако результаты такого исследования могут быть неопределенными, а обнаружение метастазов — затруднительным вследствие неопределенности цитологических признаков в ряде образцов. В своей недавней работе мы описали вариант молекулярного классификатора, позволяющего диагностировать и типировать злокачественные опухоли щитовидной железы путем выявления нескольких молекулярных маркеров в цитологических препаратах.

**Цель исследования** — оценить возможности разработанного метода в дооперационном выявлении метастазов папиллярного и медуллярного РЩЖ в лимфатических узлах боковой клетчатки шеи.

**Материалы и методы.** Исследовано 86 образцов, полученных при пункционной биопсии отдельных лимфатических узлов у 62 пациентов; во всех случаях по цитологическим данным диагностирован РЩЖ. Проведено исследование образцов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Молекулярными маркерами РЩЖ считали наличие мутации V600E гена BRAF, нормализованную концентрацию мРНК HMGA2, FN1 и SERPINA1, 5 мРНК и соотношение митохондриальной и ядерной ДНК. Для деления образцов на доброкачественные и злокачественные были использованы классификаторы на основе дерева принятия решений.

**Результаты.** Описанный ранее классификатор, основанный на анализе мутации V600E BRAF, содержания мРНК HMGA2, 3 микроРНК и соотношения митохондриальной и ядерной ДНК, позволил выявлять метастазы РЩЖ с хорошей специфичностью (98 %), но меньшей чувствительностью (83 %). Поэтому был создан новый классификатор, основанный на анализе 3 маркеров — HMGA2, FN1 и мРНК-375. Он характеризуется большей чувствительностью (93 %) в выявлении метастазов при лишь небольшом снижении специфичности (до 96 %).

**Заключение.** Мы продемонстрировали возможность дооперационного выявления метастазов РЩЖ в лимфатических узлах боковой клетчатки шеи путем анализа нескольких молекулярных маркеров в цитологическом материале.

**Ключевые слова:** рак щитовидной железы, метастазы, лимфатические узлы, микроРНК, молекулярная диагностика

**Для цитирования:** Титов С.Е., Катанян Г.А., Полоз Т.Л. и др. Дооперационное выявление метастазов папиллярного и медуллярного рака щитовидной железы в шейных лимфатических узлах с помощью молекулярного классификатора. Опухоли головы и шеи 2020;10(4):50–9.

DOI: 10.17650/2222-1468-2020-10-4-50-59



Preoperative detection of papillary and medullary thyroid cancer metastases in the lymph nodes of the neck lateral cellular tissue using a molecular classifier

S.E. Titov<sup>1-3</sup>, G.A. Katanyan<sup>4</sup>, T.L. Poloz<sup>5</sup>, L.G. Izmaylova<sup>4</sup>, O.A. Zentsova<sup>4</sup>, L.G. Dryaeva<sup>4</sup>, V.V. Anishchenko<sup>6,7</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences;

8/2 Acad. Lavrentiev Ave., Novosibirsk 630090, Russia;

<sup>2</sup>AO Vector-Best; 1/1 Arbuzova St., Novosibirsk 630117, Russia;

<sup>3</sup>Novosibirsk State University; 1 Pirogova St., Novosibirsk 630090, Russia;

<sup>4</sup>Regional Clinical Hospital No. 2; 6 Krasnykh Partizan St., Krasnodar 350012, Russia;

<sup>5</sup>Clinical Hospital "RZD-Medicine" Novosibirsk"; 2a Vladimirovskiy Spusk St., Novosibirsk 630003, Russia;

<sup>6</sup>Avicenna Medical Center, Mother and Child group of companies; 17 Kommunisticheskaya St., Novosibirsk 630007, Russia;

<sup>7</sup>Novosibirsk State Medical University; 52 Krasny Ave., Novosibirsk 630091, Russia

**Introduction.** The main method of preoperative diagnosis of thyroid tumors and the identification of possible metastasis is a cytological examination of smears obtained by fine-needle aspiration biopsy. However, the cytological material of the lymph nodes may not be adequate, and the detection of metastases faces a number of difficulties. In our recent study, we described a variant of the molecular classifier that allows the detection and typing of malignant thyroid tumors by analyzing several molecular markers in cytological preparations.

**The study objective** was to assess the applicability of the developed method for the preoperative detection of metastases of papillary and medullary thyroid cancer in the lymph nodes of the neck lateral cellular tissue.

**Materials and methods.** A total of 86 cytological samples were used, obtained from individual lymph nodes of 62 patients who had a diagnosis – thyroid cancer. Samples were analyzed by real-time polymerase chain reaction regarding the preselected set of molecular markers: the BRAF V600E mutation, the normalized concentration of HMGA2, FN1 and SERPINA1 mRNA, 5 miRNAs and the mitochondrial/nuclear DNA ratio. The decision tree-based classifier was used to discriminate between benign and malignant samples.

**Results.** The previously described classifier, based on the analysis of the BRAF V600E mutation, the content of HMGA2 mRNA, 3 miRNAs and the mitochondrial/nuclear DNA ratio, revealed metastases of thyroid cancer with good specificity (98 %) but less sensitivity (83 %). Therefore, a new classifier was built, including three markers – HMGA2 and FN1 mRNA, and miRNA-375, which, with regard to the detection of metastases, showed good sensitivity – 93 % with a slight decrease in specificity (up to 96 %).

**Conclusion.** Thus, we demonstrated the possibility of preoperative detection of thyroid cancer metastases in the lymph nodes of the neck lateral cellular tissue by analyzing several molecular markers in cytological material.

**Key words:** thyroid cancer, metastases, lymph nodes, microRNA, molecular diagnostics

**For citation:** Titov S.E., Katanyan G.A., Poloz T.L. et al. Preoperative detection of papillary and medullary thyroid cancer metastases in the lymph nodes of the neck lateral cellular tissue using a molecular classifier. *Opuholi golovy i shei = Head and Neck Tumors* 2020;10(4):50–9. (In Russ.).

## Введение

Цитологическое исследование материала, полученного при тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ), в настоящее время рассматривается как основной метод диагностики узловых образований щитовидной железы (ЩЖ) на дооперационном этапе. В большинстве случаев оно позволяет верифицировать наличие того или иного патологического процесса с учетом морфологических критериев и провести дифференциальную диагностику гиперпластических узлов, доброкачественных и злокачественных опухолей [1]. Однако приблизительно в 30 % наблюдений цитологические признаки могут быть неопределенными, что связано с отсутствием явных признаков атипии в клетках опухолей ЩЖ, и окончательный диагноз можно установить лишь при гистологическом исследовании, т. е. после хирургического вмешательства [2]. Как правило, цитологическое исследование позволяет диагностировать папиллярный, медулярный и недифференцированный рак ЩЖ (РЩЖ), однако в ряде случаев могут возникать серьезные затруднения при определении степени злокачественности [3].

Ввиду высокой частоты метастазирования карцином ЩЖ в регионарные лимфатические узлы (ЛУ) (14–22 % на момент диагностики заболевания [4, 5]) актуальной проблемой остается цитологическая верификация лимфаденопатий шеи при наличии в ЩЖ

узлов, вызывающих подозрения в их доброкачественности. Однако материал ТАБ ЛУ может быть недостаточно адекватным, а сложности его цитологического исследования часто обусловлены наличием большого количества лимфоидных элементов, гистиоцитов, многоядерных клеток типа гигантских клеток инородных тел, сопутствующих воспалительным и дегенеративным процессам [6].

Совершенствование методов дооперационной верификации патологических процессов в ЩЖ и выявления метастазов РЩЖ в ЛУ необходимо для точного определения объема хирургического вмешательства. В Российских клинических рекомендациях по диагностике и лечению высокодифференцированного рака щитовидной железы у взрослых (2017) предписывается [7]:

- удалять ЛУ центральной зоны (VI уровня), если по данным дооперационного обследования есть подозрение на наличие метастазов в этой зоне (cN1) или они выявлены интраоперационно;
- выполнять профилактическую центральную лимфаденэктомию (VI уровня, ипси- или билатеральную) при распространенной первичной опухоли (T3 или T4), дооперационно верифицированных метастазах в ЛУ боковой клетчатки шеи (cN1b);
- удалять клетчатку II–V уровней фасциально-клетчаточного пространства шеи только при доказанном метастатическом поражении ЛУ этих зон

по результатам ТАБ; селективное удаление метастатических ЛУ вне футлярно-фасциального блока не рекомендовано.

Для повышения точности дооперационной диагностики в дополнение к цитологическому исследованию материала ТАБ может быть осуществлен поиск молекулярных маркеров злокачественности в цитологических препаратах [8, 9]. Диагностический потенциал разных типов молекулярных маркеров определяется характерными для них ограничениями. Соматические мутации (точечные замены и транслокации) и повышение уровня экспрессии онкогенов в целом характеризуются высокой прогностической ценностью положительного результата и позволяют повысить общую специфичность типирования. Однако диагностическая чувствительность и прогностическая ценность отрицательного результата может быть достаточно низкой [10] в силу того, что наличие ни одного из этих маркеров не является обязательным при развитии какого бы то ни было типа опухоли.

В то же время количественный анализ экспрессии микроРНК (миРНК) в пункционном материале может обеспечить более высокую диагностическую чувствительность типирования и, соответственно, прогностическую ценность отрицательного результата, однако специфичность такого анализа может быть невысокой [10]; она в значительно большей степени зависит от ошибок, допускаемых при биопсии. Поскольку каждый маркер по отдельности не имеет всех необходимых характеристик, исследователи пытаются их комбинировать, как правило, соединяя выявление мутаций с определением уровня экспрессии ряда генов или с определением профиля экспрессии миРНК [11].

В своей недавней работе мы описали свой вариант молекулярного классификатора, позволяющего выявлять и типировать злокачественные опухоли ЩЖ путем анализа нескольких молекулярных маркеров в цитологических препаратах [12]. Результаты, описанные в той работе, были получены на выборке образцов, относящихся в основном ко II–VI категориям по классификации Bethesda (Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology) [2], и методика не проверялась на образцах ЛУ с метастазами РЩЖ и без них [12]. Цель настоящего исследования — оценить возможности разработанного метода в дооперационном выявлении метастазов папиллярного и медуллярного РЩЖ в лимфатических узлах боковой клетчатки шеи.

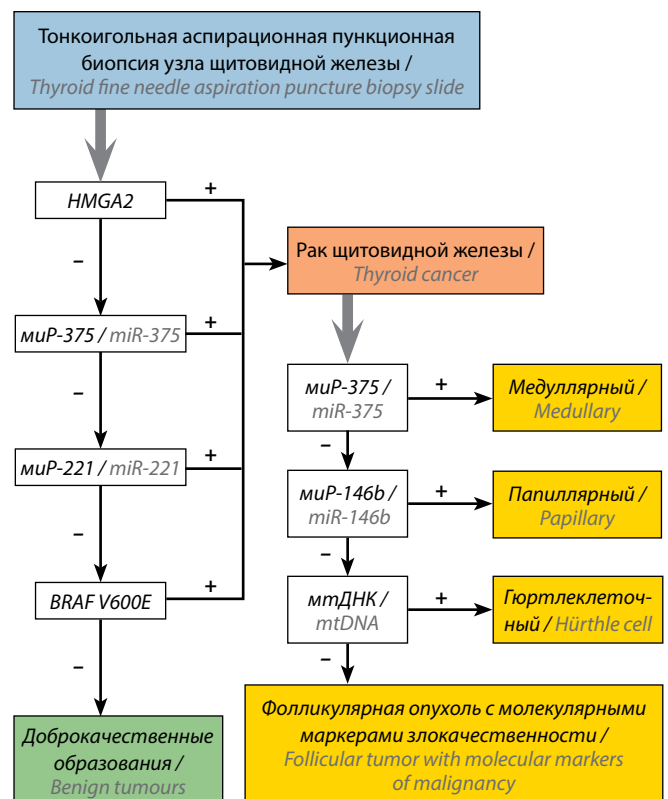
## Материалы и методы

**Клинический материал.** В работе было использовано 86 цитологических образцов, полученных при ТАБ отдельных ЛУ у 62 пациентов, которым по данным пункционной биопсии поставлен диагноз РЩЖ (у 60 пациентов — папиллярный рак, у 2 — медуллярный). Образцы были получены в Краевой клинической боль-

нице № 2 (г. Краснодар) в соответствии с законодательством России: от каждого пациента было получено письменное информированное согласие на использование его материала, все данные были деперсонализированы. Протокол исследования был утвержден этическим комитетом Краевой клинической больницы № 2.

При первичной диагностике опухоли ЩЖ у всех пациентов с лимфаденопатией боковой клетчатки шеи выполнена биопсия паравазальных ЛУ. Если при цитологическом исследовании было подтверждено наличие метастазов РЩЖ, проводили тиреоидэктомию, центральную лимфодиссекцию, фасциально-футлярную лимфодиссекцию. Получено гистологическое заключение о наличии или отсутствии метастазов в удаленных ЛУ: метастазы обнаружены в 29 из 86 образцов, не выявлены в 57 образцах.

**Метод классификации.** Первоначально для деления образцов на доброкачественные и злокачественные было использовано дерево принятия решений, предложенное нами ранее [13] (рис. 1).



**Рис. 1.** Дерево принятия решений (классификатор) для деления образцов, полученных при тонкоигольной биопсии щитовидной железы, на доброкачественные и злокачественные с последующим типированием последних. «+» означает превышение установленного уровня отсечки для данного маркера или выявление мутации BRAF V600E

**Fig. 1.** Decision tree for stratification of thyroid fine needle aspiration puncture biopsy smears on benign and malignant, followed by typing the latter. "+" means exceeding the established cutoff level for the marker or identifying the BRAF V600E mutation

Предложенный классификатор делит все цитологические образцы на следующие группы:

- доброкачественные образования, в том числе фолликулярные аденомы (фолликулярные опухоли без маркеров злокачественности);
- злокачественные образования: папиллярный, медулярный, гюртлеклеточный рак, фолликулярные опухоли с маркерами злокачественности. Анапластический рак и низкодифференцированные карциномы не выделяются данным классификатором как отдельные типы, но определяются как злокачественные.

**Выделение нуклеиновых кислот.** Высушенный цитологический препарат смывали в пробирку 3 порциями по 200 мкл лизирующего буфера (4 моль/л гуанидина изотиоцианата, 25 ммоль/л цитрата натрия, 0,3 % саркозила, 3 % дитиотреитола). Пробирки помещали в термощейкер на 10 мин при 65 °С. Раствор центрифугировали в течение 2 мин при 10 000 g, переносили супернатант в новые пробирки и добавляли к нему равный объем изопропанола, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 5 мин. Центрифугиро-

вали в течение 10 мин при 12 000 g, супернатант сливали, осадок промывали в 500 мкл 70 % этанола, затем в 300 мкл ацетона. РНК растворяли в 200 мкл деионизованной воды.

**Молекулярный анализ.** Оценку относительного уровня экспрессии генов *HMGA2*, *FN1*, *SERPINA1* (с нормализацией на ген домашнего хозяйства *PGK1*), миРНК-146b, -221, -375, -31, -551b (с нормализацией на геометрическое среднее содержания миРНК-29b, -23a, -197), соотношения митохондриальной и ядерной ДНК, а также определение соматической мутации V600E в гене *BRAF* осуществляли так, как описано ранее [12]. Дополнительные маркеры: миРНК-31 и -551b — выбраны на основании результатов предыдущего исследования [12], 2 новых гена: *FN1* и *SERPINA1* — выбраны на основании данных научной литературы [14–16]. Олигонуклеотиды, использованные в работе, приведены в табл. 1.

**Классификацию цитологических препаратов ЛУ** проводили с помощью программы TANAGRA [17] методом построения дерева принятия решений C4.5 [18] с оценкой качества прогноза с помощью кросс-валидации с 5 разбиениями.

**Таблица 1.** Используемые в работе последовательности олигонуклеотидов

Table 1. The sequences of oligonucleotides used in this work

Мишень Target	Тип олигонуклеотида Oligonucleotide type	Последовательность (5' → 3') Sequence (5' → 3')
миР-146b miR-146b	ОТ-праймер RT primer	GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCTCCGACACGA CAGCCTATG
	Обратный ПЦР-праймер Reverse PCR primer	CTGAGGCTCACTGAGACCT
	ПЦР-зонд TaqMan probe	(R6G)-ATTTCGCACC(T-BHQ1)CCGACACGACAGCCTATG
	Прямой ПЦР-праймер Forward PCR Primer	ACCAGCTGAGAACTGAATTCC
миР-221 miR-221	ОТ-праймер RT primer	GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCTCGACACGAC GAAACCCA
	Обратный ПЦР-праймер Reverse PCR primer	CTGAGGCTCACTGAGACCT
	ПЦР-зонд TaqMan probe	(R6G)-ATTTCGCACC(T-BHQ1)CGACACGACGAAACCCAG
	Прямой ПЦР-праймер Forward PCR Primer	CAGCAGCTACATTGTCTGC
миР-31 miR-31	ОТ-праймер RT primer	GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCTCGACACGAC AGCTATGC
	Обратный ПЦР-праймер Reverse PCR primer	CTGAGGCTCACTGAGACCT
	ПЦР-зонд TaqMan probe	(R6G)-ATTTCGCACC(T-BHQ1)CGACACGACAGCTATGC
	Прямой ПЦР-праймер Forward PCR Primer	CAAGCAGGCAAGATGCTG

Продолжение табл. 1

Continuation of table 1

Мишень Target	Тип олигонуклеотида Oligonucleotide type	Последовательность (5' → 3') Sequence (5' → 3')
миР-375 miR-375	ОТ-праймер RT primer	GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTTCGCACCTCGACACGACT CACGCGA
	Обратный ПЦР-праймер Reverse PCR primer	CTGAGGCTCACTGAGACCT
	ПЦР-зонд TaqMan probe	(R6G)-ATTCGCACC(T-BHQ1)CGACACGACTCACGCGA
	Прямой ПЦР-праймер Forward PCR Primer	ACAGCTTTGTTCGTTTCGGC
миР-551b miR-551b	ОТ-праймер RT primer	GAGGAGAGGCCTTGTAGCACGACCTTATCCTCACCTCCT CTCCTCCTGAAACC
	Обратный ПЦР-праймер Reverse PCR primer	GCCTTGTAGCACGACCTTA
	ПЦР-зонд TaqMan probe	(R6G)-TC(C-LNA)TCACC(T-BHQ1)CCTCTCCTCCTGAAACC
	Прямой ПЦР-праймер Forward PCR Primer	CACACTCAGCGACCCATACTT
миР-29b miR-29b	ОТ-праймер RT primer	GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTTTCGCACCTCGACACGAC AA(C-LNA)AC(T-LNA) GAT
	Обратный ПЦР-праймер Reverse PCR primer	CTGAGGCTCACTGAGACCT
	ПЦР-зонд TaqMan probe	(R6G)-TTCGCACCC(T-BHQ1)CGACACGACAACACTGAT
	Прямой ПЦР-праймер Forward PCR Primer	CAGCACTAGCACCATTGAA
миР-23a miR-23a	ОТ-праймер RT primer	GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTTTCGCACCTCGACACGAC GGAAATCC
	Обратный ПЦР-праймер Reverse PCR primer	CTGAGGCTCACTGAGACCT
	ПЦР-зонд TaqMan probe	(R6G)-TTCGCACCC(T-BHQ1)CGACACGACGGAAATCC
	Прямой ПЦР-праймер Forward PCR Primer	CAGCACATCACATTGCCAG
миР-197 miR-197	ОТ-праймер RT primer	GTCGTGGGTGAAGCAGACAGACACAATTACGCACCTGCCACGAC GCTGGGTG
	Обратный ПЦР-праймер Reverse PCR primer	GTGAAGCAGACAGACACAA
	ПЦР-зонд TaqMan probe	(R6G)-TTACGCACC(T-BHQ1)GCCACGACGCTGGGTG
	Прямой ПЦР-праймер Forward PCR Primer	CCACGTTACCACCTTCTC
HMGA2	Обратный ОТ/ПЦР-праймер Reverse RT/PCR primer	ACTTGTGTGGCCATTTCTT
	ПЦР-зонд TaqMan probe	(R6G)-CAGAAGCCAC(T-BHQ1)GGAGAAAAACGGCCAA
	Прямой ПЦР-праймер Forward PCR Primer	TCCCTCTAAAGCAGCTCAAAA



Окончание табл. 1

The end of table 1

Мишень Target	Тип олигонуклеотида Oligonucleotide type	Последовательность (5' → 3') Sequence (5' → 3')
FNI	Обратный ОТ/ПЦР-праймер Reverse RT/PCR primer	CTGCACGAACATCGGTGAA
	ПЦР-зонд TaqMan probe	(R6G)-ACCACA(T-BHQ1)CGAGCGGATCTGGCCCC
	Прямой ПЦР-праймер Forward PCR Primer	GAGGAGAGTGGAAGTGTGA
SERPINA1	Обратный ОТ/ПЦР-праймер Reverse RT/PCR primer	CCTGCCAGCAGGAGGATG
	ПЦР-зонд TaqMan probe	(R6G)-TGGGA(C-LNA)AG(T-BHQ1)GAATCGACAATGCCGTCTTC
	Прямой ПЦР-праймер Forward PCR Primer	CCTGTCTCCTCAGCTTCA
PGK1	Обратный ОТ/ПЦР-праймер Reverse RT/PCR primer	GCTGGCTCGGCTTTAAC
	ПЦР-зонд TaqMan probe	(R6G)-TTCCCAGAAGCA(T-BHQ1)CTTTTCCCTTCCCTTCT
	Прямой ПЦР-праймер Forward PCR Primer	GGAGAACCTCCGCTTTTCAT
Митохондриальная ДНК Mitochondrial DNA	Обратный ПЦР-праймер Reverse PCR primer	GATCACAGGTCTATCACCCCTA
	ПЦР-зонд TaqMan probe	(R6G)-TGCATGGAGAGC(T-BHQ1)CCCGTGAGTGGT
	Прямой ПЦР-праймер Forward PCR Primer	CCCCAGACGAAAATACCAAA
Ядерная ДНК Nuclear DNA	Обратный ПЦР-праймер Reverse PCR primer	CCATAGTTTCACCAGTGAGG
	ПЦР-зонд TaqMan probe	(R6G)-CCAGGGAC(T-BHQ1)CTTCTGGGCTGCTGAGAT
	Прямой ПЦР-праймер Forward PCR Primer	CATTGTCAGCCAGTGAGT

**Примечание.** ОТ-праймер – праймер, используемый в обратной транскрипции; ПЦР – полимеразная цепная реакция; BHQ1 – гаситель флуоресценции типа «черная дыра» 1; LNA – заблокированная (запертая, закрытая) нуклеиновая кислота; R6G – родамин 6G (родамин 590).

Note. BHQ1 – black hole quencher 1; LNA – locked nucleic acid; PCR – polymerase chain reaction; R6G – rhodamine 6G (rhodamine 590); RT primer – reverse transcription primer.

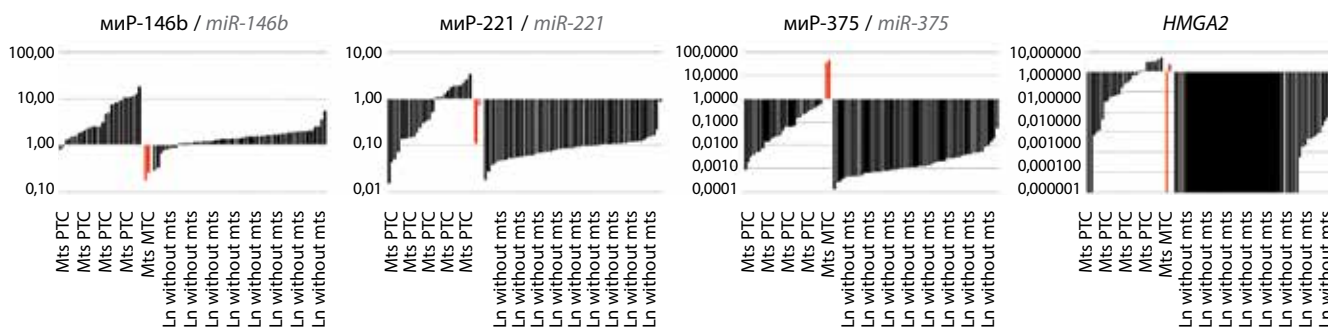
Доверительные интервалы для чувствительности, специфичности и точности рассчитывались по методу Клоппера–Пирсона. Доверительные интервалы для прогностических значений являются стандартными логитными доверительными интервалами, приведенными в [19].

### Результаты

Цитологические препараты были проанализированы с помощью предложенного нами молекулярного классификатора, позволяющего определить образец

как злокачественный или доброкачественный. Относительный уровень экспрессии отдельных маркеров представлен на рис. 2, результаты деления ЛУ на доброкачественные и злокачественные приведены в табл. 2.

Из 29 ЛУ, в которых при гистологическом исследовании подтверждено наличие метастазов, в 27 выявлен папиллярный рак, в 2 – медулярный. С помощью молекулярного классификатора к злокачественным было отнесено 24 ЛУ, к доброкачественным – 5, т.е. метастазы были выявлены этим методом в 82,8 % случаев. Из 57 ЛУ, в которых при цитологическом исследовании



**Рис. 2.** Относительный уровень экспрессии миРНК-146b, -21, -375 и гена *HMG2* в цитологических образцах (в порядке возрастания). Данные приведены в виде логарифмической шкалы, образцы с признаками метастазов медулярного рака выделены красным. *Mts PTC* – лимфатические узлы с метастазами папиллярного рака ( $n = 27$ ); *Mts MTC* – лимфатические узлы с метастазами медулярного рака ( $n = 2$ ); *Ln without mts* – лимфатические узлы без метастазов ( $n = 57$ )

**Fig. 2.** All values of relative expression levels of miRNA-146b, -221, -375 and the *HMG2* gene in increasing order in fine needle aspiration puncture biopsy smears. Data are shown on a logarithmic scale, samples with metastases of medullary cancer are highlighted in red. *Mts PTC* – lymph nodes with metastases of papillary thyroid carcinoma ( $n = 27$ ); *Mts MTC* – lymph nodes with metastases of medullary thyroid carcinoma ( $n = 2$ ); *Ln without mts* – lymph nodes without metastases ( $n = 57$ )

**Таблица 2.** Результаты деления лимфатических узлов на доброкачественные и злокачественные с помощью молекулярного классификатора

**Table 2.** Results of classification of lymph nodes into benign/malignant by molecular classifier

Результат применения молекулярного классификатора Result of using the molecular classifier	Результат цитологического/гистологического исследования Result of cytological/histological analysis	
	Обнаружены метастазы Lymph node metastases	Лимфатический узел без метастазов Lymph node without metastases
Рак Cancer	24	1
Доброкачественные образования Benign	5	56

метастазы не были обнаружены, при молекулярном анализе также не было обнаружено маркеров злокачественности в 56 образцах, т. е. точность при определении ЛУ без метастазов составила 98,2 %.

Диагностические характеристики метода выявления ЛУ с метастазами с помощью молекулярного классификатора (включая 95 % доверительный интервал):

- специфичность 98,2 % (90,6–99,7 %)
- чувствительность 82,8 % (64,2–94,2 %)
- точность 93,0 % (85,4–97,4 %)
- прогностическая ценность положительного результата 96,0 % (77,3–97,4 %)
- прогностическая ценность отрицательного результата 91,8 % (83,4–96,2 %)

Таким образом, предложенный нами классификатор при хорошей специфичности выявления метастазов дифференцированного РЩЖ в ЛУ продемонстрировал меньшую чувствительность.

Поскольку дерево принятия решений, построенное для выявления признаков злокачественности в узлах ЩЖ, характеризуется недостаточной чувствительностью при выявлении метастазов в ЛУ, для последних мы построили отдельное дерево принятия решений, добавив при машинном обучении в качестве дополнительных маркеров миРНК-31 и -551b и гены *FN1* и *SERPINA1*. Относительный уровень экспрессии дополнительных маркеров представлен на рис. 3, получившееся дерево принятия решений – на рис. 4, результаты деления образцов на доброкачественные/злокачественные с помощью нового классификатора – в табл. 3.

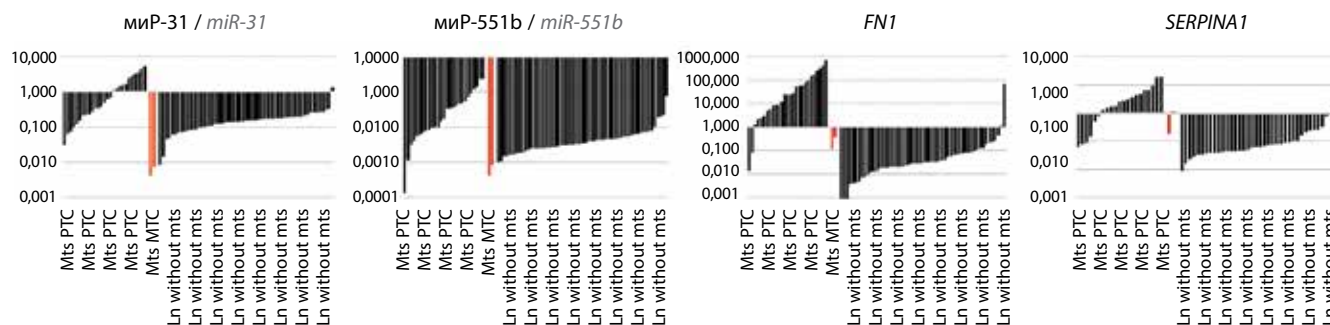
Диагностические характеристики метода выявления ЛУ с метастазами с помощью нового молекулярного классификатора (включая 95 % доверительный интервал):

- специфичность 96,5 % (87,9–99,6 %)
- чувствительность 93,1 % (77,2–94,2 %)
- точность 95,3 % (88,5–98,7 %)
- прогностическая ценность положительного результата 93,1 % (77,5–98,1 %)
- прогностическая ценность отрицательного результата 96,5 % (87,8–99,1 %)

Классификатор, построенный специально для выявления признаков метастазов папиллярного и медулярного РЩЖ в ЛУ, характеризуется более высокой чувствительностью, но несколько худшей специфичностью.

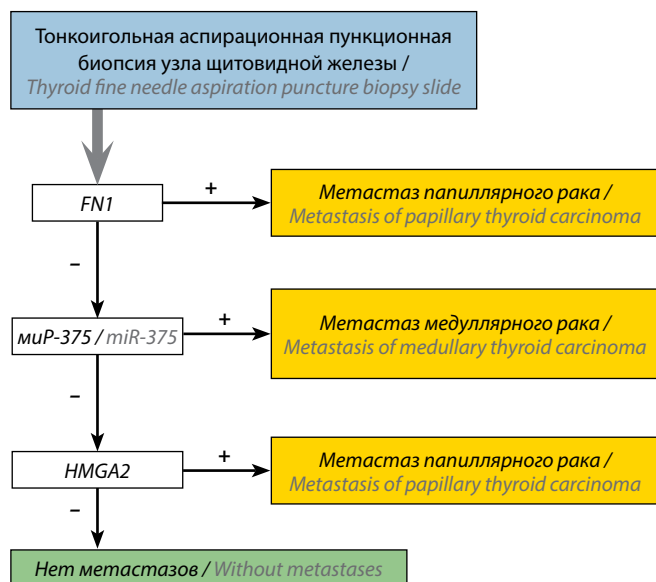
### Обсуждение

В настоящее время основными методами дооперационного выявления метастазов в ЛУ являются ультразвуковое исследование ЛУ шеи и ТАБ. Однако данные методы имеют свои ограничения, и существует необходимость в расширении диагностического арсенала за счет новых методов, позволяющих повысить точность



**Рис. 3.** Относительный уровень экспрессии *miR-31*, *-551b* и генов *FN1* и *SERPINA1* в цитологических образцах (в порядке возрастания). Данные приведены в виде логарифмической шкалы, образцы с метастазами медулярного рака выделены красным. *Mts PTC* – лимфатические узлы с метастазами папиллярного рака ( $n = 27$ ); *Mts MTC* – лимфатические узлы с метастазами медулярного рака ( $n = 2$ ); *Ln without mts* – лимфатические узлы без метастазов ( $n = 57$ )

**Fig. 3.** All values of the relative expression levels of *miRNA-31*, *-551b* and the *FN1* and *SERPINA1* genes in increasing order in fine needle aspiration puncture biopsy smears. Data are shown on a logarithmic scale, samples with metastases of medullary cancer are highlighted in red. *Mts PTC* – lymph nodes with metastases of papillary thyroid carcinoma ( $n = 27$ ); *Mts MTC* – lymph nodes with metastases of medullary thyroid carcinoma ( $n = 2$ ); *Ln without Mts* – lymph nodes without metastases ( $n = 57$ )



**Рис. 4.** Дерево принятия решений (классификатор) для деления образцов, полученных при тонкоигольной аспирационной биопсии лимфатических узлов, на содержащие и не содержащие метастазы. «+» означает превышение установленного уровня отсечки для данного маркера

**Fig. 4.** Decision tree for classifying lymph node fine needle aspiration puncture biopsy smears as containing and not containing metastases. “+” means exceeding the established cutoff level for the marker

выявления метастазов. Учитывая собственный опыт выявления и типирования злокачественных опухолей ЩЖ в материале ТАБ, на основе анализа нескольких молекулярных маркеров (определения уровня экспрессии нескольких *miRНК*, онкогена *HMGA2*, соотношения митохондриальной и ядерной ДНК и выявления мутации в гене *BRAF*) [12], мы оценили возможность применения данного подхода к дооперационному выявлению метастазов в ЛУ. Предложенный нами классификатор при хорошей специфичности (98 %) выявления метастазов РЩЖ в ЛУ продемонстрировал

**Таблица 3.** Результаты деления лимфатических узлов на метастатически пораженные и без признаков метастазов с помощью нового молекулярного классификатора

**Table 3.** Results of classification of lymph nodes into benign/malignant by the new molecular classifier

Результат применения молекулярного классификатора Result of using the molecular classifier	Результат цитологического/гистологического исследования Result of cytological/histological analysis	
	Обнаружены метастазы Lymph node metastases	Лимфатический узел без метастазов Lymph node without metastases
Рак Cancer	27	2
Доброкачественные образования Benign	2	55

меньшую чувствительность (83 %). Что касается типирования, то оба метастаза медулярного рака с помощью классификатора были определены как медулярный рак, а из 22 ЛУ с метастазами папиллярного рака с помощью классификатора 20 (91 %) были определены как папиллярный рак, а 2 (9 %) – как фолликулярные опухоли с маркерами злокачественности.

В целом профиль молекулярных маркеров метастазов рака не отличался существенным образом от такового злокачественных узлов ЩЖ. Но профиль молекулярных маркеров ЛУ без метастазов отличался от профиля доброкачественных узлов ЩЖ. Самое принципиальное различие – повышенный уровень экспрессии *miRНК-146b* в нормальных ЛУ по сравнению с таковым в доброкачественных узлах ЩЖ. Несмотря на то что *miRНК-146b* – один из принципиально важных маркеров папиллярного РЩЖ, в данном случае это не



сказалось на специфичности метода, поскольку эта миРНК используется только на этапе типирования, а не на этапе деления образцы на доброкачественные и злокачественные.

Недостаточная чувствительность, по-видимому, объясняется недостаточным размахом изменений использованных маркеров, так что в образцах с метастазами эти изменения не удавалось зафиксировать в сравнении с уровнем маркеров в материале самого ЛУ. Таким образом, из 27 образцов с метастазами папиллярного рака мутация V600E в гене *BRAF* была выявлена в 15 (55 %), повышенный уровень экспрессии гена *HMGA2* — в 16 (59 %), повышенный уровень миРНК-375 — в 9 (33 %), повышенный уровень миРНК-221 — в 12 (44 %).

По этой причине мы решили построить отдельное дерево принятия решений для выявления метастазов в ЛУ с привлечением дополнительных молекулярных маркеров. В частности, на этапе обучения мы добавили к первоначальному набору маркеров миРНК-31 и -551b, экспрессия которых повышается при папиллярном раке, а также 2 онкогена — *FN1* и *SERPINA1*. В конечном счете в новый классификатор было включено 3 маркера — *HMGA2*, *FN1* и миРНК-375, при этом чувстви-

тельность нового классификатора при выявлении метастазов оказалась выше — 93 %, а специфичность снизилась лишь незначительно — до 96 %. Повышение чувствительности произошло за счет одного из дополнительных маркеров — гена *FN1*. В целом этот маркер хуже выявляет злокачественные опухоли ЩЖ, чем *HMGA2* (данные не опубликованы), но его изменения имеют больший размах: разница между минимальным и максимальным уровнем относительной экспрессии *FN1* в 3 раза больше, чем аналогичный показатель *HMGA2*.

### Заключение

В данной работе мы продемонстрировали возможность дооперационного выявления метастазов РЩЖ в ЛУ боковой клетчатки шеи путем анализа нескольких молекулярных маркеров в материале ТАБ. Данный метод не требует специального (повторного) проведения биопсии, поэтому анализ может быть выполнен вслед за цитологическим исследованием образца.

Выводы данной работы ограничены вследствие относительно небольшого размера выборки и ввиду того, что отсутствие метастазов в 57 ЛУ было установлено только при цитологическом исследовании.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bongiovanni M., Spitalo A., Faquin W.C. et al. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis. *Acta Cytol* 2012;56(4):333–9. DOI: 10.1159/000339959.
- Ali S., Cibas E. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: definitions, criteria, and explanatory notes. 2<sup>nd</sup> edn. New York: Springer, 2018. DOI: 10.1007/978-3-319-60570-8.
- Wang C.C., Friedman L., Kennedy G.C. et al. A large multicenter correlation study of thyroid nodule cytopathology and histopathology. *Thyroid* 2011;21(3):243–51. DOI: 10.1089/thy.2010.0243.
- Zaydfudim V., Feurer I.D., Griffin M.R., Phay J.E. The impact of lymph node involvement on survival in patients with papillary and follicular thyroid carcinoma. *Surgery* 2008;144(6):1070–8. DOI: 10.1016/j.surg.2008.08.034.
- Liu F.H., Kuo S.F., Hsueh C. et al. Postoperative recurrence of papillary thyroid carcinoma with lymph node metastasis. *J Surg Oncol* 2015;112(2):149–54. DOI: 10.1002/jso.23967.
- Torres M.R., Nobrega Neto S.H., Rosas R.J. et al. Thyroglobulin in the washout fluid of lymph-node biopsy: what is its role in the follow-up of differentiated thyroid carcinoma? *Thyroid* 2014;24(1):7–18. DOI: 10.1089/thy.2013.0244.
- Бельцевич Д.Г., Ванушко В.Э., Румянцев П.О. и др. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению высокодифференцированного рака щитовидной железы у взрослых, 2017 год. *Эндокринная хирургия* 2017;11(1):6–27. [Beltsevich D.G., Vanushko V.E., Rumiantsev P.O. et al. 2017 Russian clinical practice guidelines for differentiated thyroid cancer diagnosis and treatment. *Endokrinnyaya hirurgiya = Endocrine Surgery* 2017;11(1):6–27. (In Russ.)].
- Shibru D., Chung K.W., Kebebew E. Recent developments in the clinical application of thyroid cancer biomarkers. *Curr Opin Oncol* 2008;20(1):13–8. DOI: 10.1097/CCO.0b013e3282f27e49.
- Villabona C.V., Mohan V., Arce K.M. et al. Utility of ultrasound *versus* gene expression classifier in thyroid nodules with atypia of undetermined significance. *Endocr Pract* 2016;22(10):1199–203. DOI: 10.4158/EP161231.OR.
- Keutgen X.M., Filicori F., Fahey T.J. 3<sup>rd</sup>. Molecular diagnosis for indeterminate thyroid nodules on fine needle aspiration: advances and limitations. *Expert Rev Mol Diagn* 2013;13(6):613–23. DOI: 10.1586/14737159.2013.811893.
- Labourier E., Shifrin A., Busseniers A.E. et al. Molecular testing for miRNA, mRNA, and DNA on fine-needle aspiration improves the preoperative diagnosis of thyroid nodules with indeterminate cytology. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100(7):2743–50. DOI: 10.1210/jc.2015-1158.
- 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. DOI: 10.1186/s12885-019-6154-7.
- Titov S.E., Demenkov P.S., Lukyanov S.A. 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):722–7. DOI: 10.1136/jclinpath-2020-206445.
- Vierlinger K., Mansfeld M.H., Koperek O. et al. Identification of SERPINA1 as single marker for papillary thyroid carcinoma through microarray meta analysis and quantification of its discriminatory power in independent validation. *BMC Med Genomics* 2011;4:30. DOI: 10.1186/1755-8794-4-30.
- Sponziello M., Rosignolo F., Celano M., et al. Fibronectin-1 expression is increased in aggressive thyroid cancer and favors the migration and invasion of cancer cells. *Mol Cell*

- Endocrinol 2016;431:123–32.  
DOI: 10.1016/j.mce.2016.05.007.
16. Qiu J., Zhang W., Zang C. et al. Identification of key genes and miRNAs markers of papillary thyroid cancer. Biol Res 2018;51(1):45.  
DOI: 10.1186/s40659-018-0188-1.
17. Rakotomalala R. [TANAGRA: a free software for research and academic purposes (In French)]. In: Proceedings of EGC'2005, RNTI-E-3. Vol. 2. Pp. 697–702.
18. Quinlan J.R. C4.5: programs for machine learning. San Francisco: Morgan Kaufmann Publishers Inc., 1993.
19. Mercaldo N.D., Lau K.F., Zhou X.H. Confidence intervals for predictive values with an emphasis to case-control studies. Stat Med 2007;26(10):2170–83.  
DOI: 10.1002/sim.2677.

#### Вклад авторов

С.Е. Титов: разработка дизайна исследования, проведение молекулярно-генетического тестирования, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;  
Г.А. Катанян: разработка концепции и дизайна исследования, отбор пациентов, написание текста статьи;  
Т.Л. Полоз: разработка концепции исследования, научное редактирование статьи;  
Л.Г. Измайлова, О.А. Зенцова, Л.Г. Дряева: отбор пациентов;  
В.В. Анищенко: анализ полученных данных, научное редактирование статьи.

#### Authors' contributions

S.E. Titov: developing of research design, molecular genetic testing, analysis of the obtained data, reviewing of publications on the article's theme, article writing;  
G.A. Katanyan: developing of study concept and design, selection of patients, article writing;  
T.L. Poloz: developing of study concept, scientific editing of the article;  
L.G. Izmaylova, O.A. Zentsova, L.G. Dryaeva: selection of patients;  
V.V. Anishchenko: analysis of the obtained data, scientific editing of the article.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

С.Е. Титов / S.E. Titov: <https://orcid.org/0000-0001-9401-5737>  
Т.Л. Полоз / T.L. Poloz: <https://orcid.org/0000-0003-4006-7560>  
В.В. Анищенко / V.V. Anishchenko: <https://orcid.org/0000-0003-1178-5205>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-14-00074).

**Financing.** The study was performed with a financial support of Russian Science Foundation (project No. 20-14-00074).

#### Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Краевой клинической больницы № 2 (г. Краснодар).  
Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

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

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Regional Clinical Hospital No. 2 (Krasnodar).  
All patients gave written informed consent to participate in the study.

**Статья поступила:** 07.07.2020. **Принята к публикации:** 20.10.2020.

**Article submitted:** 07.07.2020. **Accepted for publication:** 20.10.2020.