

DOI: <https://orcid.org/10.17650/2222-1468-2023-13-3-10-23>

Проблемы диагностики фолликулярного рака щитовидной железы

С.Е. Титов^{1,2}, С.А. Лукьянов³, С.В. Сергийко³, Ю.А. Веряскина^{1,4}, Т.Е. Ильина³,
Е.С. Козорезова⁵, С.Л. Воробьев⁵

¹ФГБУ «Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук»; Россия, 630090 Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8/2;

²АО «Вектор-Бест»; Россия, 630117 Новосибирск-117, Научно-производственная зона, корп. 36;

³ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 454092 Челябинск, ул. Воровского, 64;

⁴ФГБУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»; Россия, 630090 Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 10;

⁵ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики»; Россия, 192283 Санкт-Петербург, ул. Олеко Дундича, 8, корп. 2, лит. А

Контакты: Сергей Анатольевич Лукьянов 111lll@mail.ru

Введение. Фолликулярный рак щитовидной железы встречается значительно реже папиллярного. Тем не менее основные трудности в дооперационной диагностике связаны именно с этим морфологическим типом. Тонкоигольная аспирационная биопсия неспособна отличить доброкачественную фолликулярную аденому от фолликулярной карциномы, что вынуждает хирургов выполнять диагностическую резекцию щитовидной железы у всех пациентов с цитологическим заключением «фолликулярная опухоль».

Цель исследования – поиск специфических для фолликулярного рака микроРНК с помощью секвенирования нового поколения.

Материалы и методы. Проанализированы данные пациентов с дооперационным цитологическим заключением «фолликулярная опухоль», прооперированных в Челябинском центре эндокринной хирургии с 2021 по 2022 г. Гистологические препараты дважды пересматривались экспертами-патологами. Секвенирование генома выполнено в 8 гистологических образцах фолликулярного рака и 8 образцах фолликулярной аденомы. Уровни экспрессии отобранных микроРНК сравнивали со 198 архивными цитологическими образцами различных типов опухолей щитовидной железы.

Результаты. Риск злокачественности при цитологическом заключении «фолликулярная опухоль» составил 25,4 % (ошибка 74,6 %). Фолликулярный рак был впервые установлен у 36 пациентов, заболеваемость составила 0,68 случая на 100 тыс. населения в год. Диагноз «фолликулярный рак» подтвержден 3 морфологами в 8 (36,4 %) случаях. Секвенирование позволило выявить 5 наиболее различающихся между фолликулярным раком и фолликулярной аденомой микроРНК: miR-625, miR-323a, let-7a, let-7c и miR-574. Уровень ошибок при дифференцировке фолликулярной аденомы и фолликулярного рака с помощью выбранных нами микроРНК составил 21 % (при кросс-валидации 35 %).

Заключение. Молекулярно-генетическое исследование на дооперационном этапе, направленное на дифференцировку фолликулярного рака и фолликулярной аденомы, по сравнению с цитологическим исследованием имеет большую, но недостаточную для принятия окончательного клинического решения точность.

Ключевые слова: фолликулярный рак щитовидной железы; фолликулярная аденома щитовидной железы, микроРНК, молекулярная диагностика, массовое параллельное секвенирование

Для цитирования: Титов С.Е., Лукьянов С.А., Сергийко С.В. и др. Проблемы диагностики фолликулярного рака щитовидной железы. Опухоли головы и шеи 2023;13(3):10–23. DOI: <https://orcid.org/10.17650/2222-1468-2023-13-3-10-23>

Problems of follicular thyroid carcinoma diagnostics

S.E. Titov^{1,2}, S.A. Lukyanov³, S.V. Sergiyko³, Yu.A. Veryaskina^{1,4}, T.E. Ilyina³, E.S. Kozorezova⁵, S.L. Vorobyov⁵

¹Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 8/2 Akademika Lavrentieva Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia;

²Vector-Best; Bld. 36, Research and Production zone, Novosibirsk-117 630117 Russia;

³South Ural State Medical University, Ministry of Health of Russia; 64 Vorovsky St., Chelyabinsk 454092, Russia;

⁴Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian branch of the Russian Academy of Sciences; 10 Akademika Lavrentieva Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia;

⁵National Center for Clinical Morphological Diagnostics; Lit. A, Bld. 2, 8 Oleko Dundicha St., St. Petersburg 192283, Russia

Contacts: Sergey Anatolyevich Lukyanov 111lll@mail.ru

Introduction. Follicular thyroid cancer is much less common than papillary cancer. Nevertheless, the main difficulties in preoperative diagnosis are associated with this morphological type. A fine needle aspiration biopsy is not able to distinguish a benign follicular adenoma from a follicular carcinoma, which forces surgeons to perform diagnostic resection of the thyroid gland in all patients with a cytological conclusion «follicular tumor».

Aim. To search for microRNAs specific to follicular cancer by sequencing a new generation.

Materials and methods. The data of patients with a preoperative cytological conclusion «follicular tumor» operated at the Chelyabinsk Center for Endocrine Surgery from 2021 to 2022 were analyzed. Histological preparations were reviewed twice by pathologists. Genome sequencing was performed in 8 histological samples of follicular cancer and 8 samples of follicular adenoma. The expression levels of the selected microRNAs were compared with 198 archived cytological samples of various types of thyroid tumors.

Results. The risk of malignancy at the cytological conclusion «follicular tumor» was 25.4 % (error 74.6 %). Follicular cancer was first detected in 36 patients, the incidence was 0.68 new cases per 100 thousand population per year. The diagnosis of «follicular cancer» was confirmed by 3 morphologists in 8 (36.4 %) cases. Sequencing revealed the 5 most distinct microRNAs between follicular cancer and follicular adenoma: miR-625, miR-323a, let-7a, let-7c and miR-574. The level of errors in the differentiation of follicular adenoma and follicular cancer using the microRNAs we selected was 21 % (35 % with cross-validation).

Conclusion. Molecular genetic research at the preoperative stage, aimed at differentiating follicular cancer and follicular adenoma, in comparison with cytological research has a greater, but insufficient accuracy for making a final clinical decision.

Keywords: follicular thyroid cancer, follicular thyroid adenoma, microRNA, molecular diagnostics, mass parallel sequencing

For citation: Titov S.E., Lukyanov S.A., Sergiyko S.V. et al. Problems of follicular thyroid carcinoma diagnostics. *Opukholy golovy i shei = Head and Neck Tumors* 2023;13(3):10–23. (In Russ.). DOI: <https://orcid.org/10.17650/2222-1468-2023-13-3-10-23>

Введение

Основная задача при выявлении узла щитовидной железы (ЩЖ) — отличить доброкачественное поражение от злокачественного. При достижении узлом определенных размеров и/или при наличии подозрительных на опухоль ультразвуковых изменений применяется тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) с последующей цитологической оценкой по системе Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology (Bethesda; TBSRTC, 2017). Этот подход позволяет надежно установить диагноз (доброкачественный или злокачественный узел) в 70–80 % случаев [1]. Однако у 20–30 % пациентов цитологическое заключение попадает в категорию неопределенных: фолликулярное поражение неопределенного значения (FLUS/AUS, Bethesda III), фолликулярное новообразование/подозрение на фолликулярное новообразование (FN/SFN, категория Bethesda IV) и подозрение на злокачественность (SM, категория Bethesda V) с прогнозируемой вероятностью рака 10–30, 25–40 и 50–75 % соответственно [2]. В соответствии со многими национальными клиническими рекомендациями больным, имеющим узлы в ЩЖ с неопределенными заключениями, должна повторно проводиться ТАБ или диагностическая операция в минимальном объеме гемитиреоидэктомии. Примерно в 75 % случаях по результатам по-

слеоперационного гистологического исследования узлы оказываются доброкачественными, что говорит о нецелесообразности хирургического лечения [3].

Достижения в области молекулярной онкологии привели к разработке серии молекулярных тестов, дополняющих цитологическое исследование и улучшающих стратификацию риска рака ЩЖ при неопределенных заключениях ТАБ [4]. Еще несколько лет назад использование молекулярного тестирования в основном ограничивалось академическими исследованиями. В настоящее время, согласно клиническим рекомендациям Американской тиреоидологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA) 2020 г., применение молекулярно-генетических тестов уже можно рассматривать как альтернативу операции при неопределенных результатах ТАБ. Наиболее изученными и используемыми тестами на рынке США сегодня являются Afirma GSC, ThyGenX/ThyraMir и ThyroSeq [5]. Метаанализ 2021 г., включающий 7565 пациентов с неопределенными цитологическими заключениями, показал высокую способность данных исследований обнаруживать рак ЩЖ (AUC 0,9–0,95) [6]. Тем не менее авторы пришли к выводу, что в настоящее время не существует идеальной молекулярной панели для дифференцировки злокачественных и доброкачественных новообразований ЩЖ, поскольку сохраняется вероятность пропустить рак.

Несмотря на то что доля папиллярного рака ЩЖ (ПРЩЖ) в структуре больных раком ЩЖ составляет до 90 %, около 50 % всех пропущенных случаев рака при использовании молекулярно-генетических тестов на дооперационном этапе приходится на фолликулярные и онкоцитарные формы тиреоидной карциномы [7–9]. Единственный отечественный молекулярный тест «Тироед-Инфо» также не решает эту проблему; последнее исследование показало, что он пропустил фолликулярный рак ЩЖ (ФРЩЖ) в 4 (1 %) из 329 случаев [10].

Таким образом, самым большим недостатком всех молекулярно-генетических тестов можно считать именно проблемы выявления ФРЩЖ. Объясняется это тем, что для ПРЩЖ уже обнаружен ряд специфических молекулярных маркеров, в том числе мутаций *BRAF*^{V600E} и *RET*-*PTC*, указывающих на данную опухоль с вероятностью 99 % [11]. Считается, что за развитие ФРЩЖ отвечают мутации генов семейства *RAS* и транслокация *PAX8/PPAR γ* . Проблема же состоит в том, что эти геномные изменения примерно в 30–50 % случаев встречаются и в доброкачественных опухолях, в то время как в некоторых ФРЩЖ они не обнаруживаются [12, 13]. Становится очевидным, что для повышения точности молекулярно-генетических тестов необходим поиск новых геномных изменений, высокоспецифичных для ФРЩЖ. В настоящее время во многом мутации и транслокации довольно хорошо изучены, при этом в ряде случаев их наличие или отсутствие не может считаться надежным диагностическим критерием дифференциальной диагностики, в связи с чем дальнейший поиск генетических маркеров для ФРЩЖ может быть направлен, например, на эпигенетические маркеры, такие как микроРНК [14].

МикроРНК представляют собой небольшие последовательности нуклеотидов (длиной от 18 до 25 нуклеотидов) и считаются перспективными диагностическими маркерами различных заболеваний. Специфические механизмы действия позволяют им напрямую модулировать ряд клеточных биологических процессов, таких как пролиферация, дифференцировка и гибель. Их дерегулирование часто связано с развитием различных заболеваний человека, включая рак [15].

На сегодняшний день известен ряд микроРНК, экспрессия которых значительно изменена при различных типах рака ЩЖ (ПРЩЖ, анапластический рак – АРЩЖ). Некоторые из них имеют повышенную экспрессию при ФРЩЖ (miR-192, -197, -328, -346, -10b, -92a, -107, -221, -137, -767, -663b, -30d, -874, -125, -1287, -30c-1 и -125b-2), некоторые – сниженную (miR-9-5p, -9-3p, -205, -34b-3p, -1, -130b, -328, -10a, -296 и -138) [16–19]. Также есть микроРНК, которые могут аберрантно экспрессироваться одновременно в различных типах рака ЩЖ. Так, экспрессия miR-137 повышается и в ФРЩЖ, и в АРЩЖ; экспрессия miR-146b, -21,

-222, -155, -187 и -224 – в ФРЩЖ, ПРЩЖ и АРЩЖ; экспрессия miR-486, -138, -199b, miR-7 и miR-144 подавляется как при ФРЩЖ, так и при ПРЩЖ, а miR-30a – при ФРЩЖ и АРЩЖ [14].

Следовательно, все эти микроРНК могут играть большую роль в злокачественной трансформации клеток ЩЖ и, соответственно, использоваться в качестве потенциальных дооперационных маркеров, однако ни одна из них не оказалась достаточно информативной для надежной дифференцировки доброкачественных и злокачественных фолликулярных неоплазий (ФРЩЖ) и фолликулярных аденом щитовидной железы (ФАЩЖ) [20].

Цель исследования – поиск специфических для ФРЩЖ микроРНК с помощью секвенирования нового поколения. Мы предполагали провести сиквенс 8 гистологически подтвержденных образцов ФРЩЖ и 8 образцов ФАЩЖ и, отобрав те микроРНК, которые наиболее различаются, проверить их на большей выборке образцов, относящихся к разным типам опухолей и образований ЩЖ.

Материалы и методы

Клинический материал. С целью оценки эпидемиологических и клинических характеристик и, главное, для поиска новых информативных молекулярно-генетических маркеров ФРЩЖ проанализированы данные пациентов с дооперационным цитологическим заключением Bethesda IV, прооперированных в Челябинском центре эндокринной хирургии (на базе отделения плановой хирургии Городской клинической больницы №1 Челябинска) с 2021 по 2022 г. В случае установления штатным врачом-патологом диагноза ФРЩЖ гистологические образцы направлялись в ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики» (Санкт-Петербург), где они дважды пересматривались тремя независимыми экспертами-морфологами. После достижения консенсуса всех морфологов относительно диагноза гистологические образцы ФРЩЖ и ФАЩЖ (для группы сравнения) направлялись на полное геномное секвенирование.

Для валидации различных микроРНК в образцах ФРЩЖ относительно других типов опухолей ЩЖ использовались цитологические образцы (материалы ТАБ) пациентов из ранее выполненных исследований в рамках оценки диагностической точности теста «Тироед-Инфо» [10, 21, 22].

Секвенирование. РНК из гистологических образцов выделяли с помощью гомогенизации ткани в тризоле, а затем – и с использованием набора PureLink™ RNA Micro Scale Kit (Thermo, США) согласно инструкции производителя. Выделенная РНК была использована для приготовления библиотек при помощи набора NEBNext® Small RNA Library Prep Set for Illumina® (NEB) согласно инструкции производителя. Размер фрагментов полученных библиотек проверяли методом

микроэлектрофореза с помощью набора High Sensitivity DNA Kit (Agilent, США) согласно инструкции. Далее проводили секвенирование полученных библиотек и на приборе HiSeq1500 (Illumina, США) одноконцевыми чтениями длиной 50 нуклеотидов с генерацией не менее 3 млн чтений на образец. Оценку качества исходных ридов выполняли с помощью программы FastQC [23].

Полимеразная цепная реакция. Выделение нуклеиновых кислот из материала цитологических препаратов проводили традиционным способом [24] с модификацией: отобранный мазок цитологического препарата смывали в пробирку тремя порциями гуанидинового лизирующего буфера (по 200 мкл). Далее образец перемешивали и инкубировали в термошейкере в течение 15 мин при 65 °С. Затем добавляли равный объем изопропанола, тщательно перемешивали и выдерживали при комнатной температуре в течение 5 мин. После центрифугирования в течение 10 мин при 14 000 g супернатант удаляли, а осадок промывали 500 мкл 70 % этанола и 300 мкл ацетона. Наконец, РНК растворяли в 200 мкл деионизированной воды. Образцы РНК, если их не анализировали немедленно, хранили при температуре –20 °С до дальнейшего использования. Детекцию микроРНК проводили с помощью метода петлевой полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией сигнала в режиме реального времени [25]. Для каждой микроРНК отдельно выполняли реакцию обратной транскрипции с последующей ПЦП в реальном времени, как было описано нами ранее [24]. Для каждого образца анализ проводили в одном повторе. Нормировку содержания микроРНК выполняли на геометрическое среднее 3 референсных микроРНК (miR-197, -23a и -29b) с помощью метода $2^{-\Delta C_q}$ [26].

Анализ данных. Данные обрабатывались в программах Excel (Microsoft, США) и Statistica 9.1 (StatSoft Inc., США). Различия между группами оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Для корректировки множественного тестирования применялась поправка Бонферрони. Диагностические характеристики определяли с помощью стандартных таблиц 2 × 2, сравнивающих качественные результаты бинарных молекулярных тестов (положительные или отрицательные) относительно эталонных стандартных диагнозов, установленных при гистологическом исследовании. Доверительные интервалы для чувствительности, специфичности и точности рассчитывались по методу Клоппера–Пирсона. Доверительные интервалы для прогностических значений являются логитными доверительными интервалами, приведенными N.D. Metcaldo и соавт. [27].

Для отбора важных признаков были использованы 4 метода: фильтрация по Фишеру (Fisher filtering), ReliefF Algorithm, Forward-logit и дискриминантный анализ методом ортогональных частных наименьших

квадратов (discriminant analysis and orthogonal projections to latent structures, OPLS-DA). Фильтрация по Фишеру — один из наиболее широко используемых методов контролируемого выбора признаков [28]. Forward-logit — метод прямого отбора признаков с использованием логистической регрессии, позволяющий отобрать наиболее информативные признаки. Фильтрации по Фишеру и Forward-logit проводились с использованием библиотеки sklearn.feature_selection на языке Python. ReliefF Algorithm [29] использует взвешивание признаков для оценки их важности для классификации; применялась библиотека scikit-feature [30].

Дискриминантный анализ методом OPLS-DA [31] был выполнен в пакете gopls [32]. В качестве оценки связи переменной с различием классов использовали важность независимой переменной в проекции (variable importance in projection, VIP) [33].

Классификацию цитологических препаратов ШЖ проводили с помощью программы TANAGRA [34] методом построения дерева принятия решений C4.5 [35]. Для оценки качества предсказания принадлежности образца к той или иной группе использовали кросс-валидацию (leave-p-out cross-validation) с пятью разбиениями.

Для проверки гипотезы об однородности данных внутри групп образцов проведена кластеризация методом k-средних с использованием библиотеки sklearn.cluster на языке Python. Для удобного представления данных кластеризации в двумерном пространстве был использован метод главных компонент [36].

Результаты

Клинико-эпидемиологические данные. Всего в 2021–2022 гг. были прооперированы 1282 пациента с цитологическим заключением Bethesda IV. Распределение больных в зависимости от гистологического диагноза представлено в табл. 1.

Риск злокачественности при заключении Bethesda IV за 2 года составил в среднем 25,4 %. За это время диагноз ФРЩЖ был установлен впервые у 36 пациентов (2 мужчин и 34 женщины); медиана возраста больных составила 54 года (42,25–66,75 года); самому младшему пациенту было 19 лет, самому старшему — 81 год. Медиана наибольшего диаметра опухолевого узла оказалась равной 1,75 см (1,2–2,4 см), наименьший диаметр узла — 0,5 см, наибольший — 3,3 см. Стадия T1aN0M0 выявлена у 23 пациентов, T2N0M0 — у 13.

За 2012–2022 гг. в Челябинском окружном онкологическом диспансере было выявлено еще 13 случаев ФРЩЖ. Таким образом, заболеваемость ФРЩЖ в Челябинской области составила 0,68 новых случая на 100 тыс. населения в год.

Результаты морфологического исследования. Из 36 случаев ФРЩЖ на пересмотр были отправлены 22 доступных в архиве гистологических препарата (табл. 2).

Таблица 1. Распределение прооперированных пациентов с опухолями щитовидной железы (ЩЖ) и цитологическим заключением Bethesda IV в зависимости от гистологического диагноза

Table 1. Distribution of the operated patients with thyroid tumors and cytological Bethesda IV class depending on histological diagnosis

Диагноз Diagnosis	2021 г., абс. (%) 2021, abs. (%)	2022 г., абс. (%) 2022, abs. (%)
Доброкачественные новообразования: Benign neoplasms:		
коллоидный узел colloid nodule	37 (8,0)	40 (8,2)
фолликулярная аденома follicular adenoma	318 (67,9)	343 (70,4)
онкоцитарная аденома oncocyctic adenoma	82 (17,5)	63 (13,0)
фолликулярная опухоль неясного злокачественного потенциала follicular tumor of uncertain malignant potential	15 (3,2)	20 (4,1)
неинвазивная фолликулярная неоплазма с папиллярноподобными ядерными изменениями noninvasive follicular neoplasm with papillary-like nuclear features	16 (3,4)	21 (4,3)
всего <i>total</i>	468 (71,5)	487 (77,6)
Злокачественные новообразования: Malignant neoplasms:		
папиллярный рак papillary carcinoma	147 (22,4)	118 (18,8)
медуллярный рак medullary carcinoma	7 (1,1)	2 (0,3)
онкоцитарный (гюртлеклеточный) рак oncocyctic (Hurthle cell) carcinoma	9 (1,4)	5 (0,8)
плоскоклеточный рак squamous cell carcinoma	1 (0,2)	0
анапластический рак anaplastic carcinoma	1 (0,2)	2 (0,3)
фолликулярный рак follicular carcinoma	22 (3,3)	14 (2,2)
всего <i>total</i>	187 (28,5)	141 (22,4)

Единодушное согласие всех трех морфологов относительно диагноза ФРЩЖ было получено в 8 (36,4 %) случаях. В 4 случаях специалисты установили другие формы рака, а в 10 диагнозов «рак» некоторые врачи-морфологи поставили под сомнение. Таким образом, для секвенирования были отобраны 8 образцов ФРЩЖ

Таблица 2. Расхождения морфологических диагнозов после пересмотра гистологических препаратов пациентов с фолликулярным раком щитовидной железы (ФРЩЖ)

Table 2. Differences in morphological diagnoses after re-evaluation of histological samples from patients with follicular thyroid carcinoma (FTC)

Результат пересмотра препарата Result of sample re-evaluation	Исходный диагноз Initial diagnosis	
	Минимально инвазивный ФРЩЖ (n = 20) Minimally invasive FTC (n = 20)	Широко инвазивный ФРЩЖ (n = 2) Widely invasive FTC (n = 2)
Минимально инвазив- ный фолликулярный рак Minimally invasive follicular carcinoma	8	—
Низкодифференциро- ванный рак Poorly differentiated carcinoma	—	1
Папиллярный рак, фолликулярный вариант Papillary carcinoma, follicular type	1	1
Онкоцитарный рак Oncocyctic carcinoma	1	—
Фолликулярная опухоль с неопределенным злокачественным потенциалом Follicular tumor of uncertain malignant potential	2	—
Онкоцитарная аденома Oncocyctic adenoma	2	—
Фолликулярная аденома Follicular adenoma	6	—

и 8 образцов ФАЩЖ (для группы сравнения) (в группе сравнения разногласий морфологов не было).

Результаты секвенирования. С целью оценки значимости отдельных микроРНК для дифференцировки ФРЩЖ и ФАЩЖ были использованы 4 метода: фильтрация по Фишеру, ReliefF Algorithm, Forward-logit и OPLS-DA. Наиболее значимые 11 микроРНК, полученные с применением каждого метода, приведены в табл. 3.

Для валидации на большей выборке с помощью ПЦР в реальном времени, были отобраны микроРНК, имеющие номер меньше 1000 и отобранные как минимум двумя методами. Таким образом, на валидацию мы выбрали miR-625, -323a, let-7a, let-7c и -574. МикроРНК-21 уже рассматривалась в одном из наших исследований [24], где показана ее ассоциация с ПРЩЖ и, в меньшей степени, с медуллярным раком ЩЖ (МРЩЖ), но не

Таблица 3. Самые значимые микроРНК для дифференцировки фолликулярного рака и фолликулярной аденомы щитовидной железы
Table 3. The most significant microRNAs for differentiation of follicular carcinoma and follicular adenoma of the thyroid

Фильтрация по Фишеру Fischer titration		ReliefF Algorithm		Forward-logit		OPLS-DA	
Отобранные микроРНК Selected microRNAs	<i>p</i>	Отобранные микроРНК Selected microRNAs	Вес признака Predictor weight	Отобранные микроРНК Selected microRNAs	<i>p</i>	Отобранные микроРНК Selected microRNAs	VIP
miR-21	0,008374	let-7a	0,179057	miR-21	0,0112	miR-21	1,320482
let-7a	0,009803	let-7g	0,140669	let-7a	0,0126	let-7c	1,230706
miR-625	0,011832	miR-574	0,138393	miR-625	0,0144	miR-625	1,190680
miR-323a	0,012154	miR-323a	0,134487	miR-323a	0,0147	miR-323a	1,184797
miR-3173	0,015695	miR-95	0,117850	miR-3173	0,0179	let-7g	1,177794
let-7c	0,016883	miR-21	0,114970	—	—	miR-3173	1,177405
miR-574	0,020426	miR-12136	0,114719	—	—	let-7a	1,151223
miR-12136	0,023270	let-7c	0,111131	—	—	miR-3613	1,129260
miR-95	0,026256	miR-3173	0,104236	—	—	miR-1273h	1,091417
miR-331	0,030077	miR-493	0,102093	—	—	miR-10400	1,086390
let-7d	0,030513	miR-625	0,100808	—	—	miR-4717	1,058442

Примечание. Жирным шрифтом выделены микроРНК, отобранные для валидации на большей выборке. VIP — variable importance in projection, важность независимой переменной в проекции; OPLS-DA — Discriminant analysis and orthogonal projections to latent structures, дискриминантный анализ методом ортогональных частных наименьших квадратов
Note. microRNAs selected for validation in a large sample are shown in bold. VIP — variable importance in projection; OPLS-DA — orthogonal projections to latent structures—discriminant analysis

с ФРЩЖ, поэтому в данном исследовании мы не стали ее брать для более подробного изучения.

Результаты оценки уровней экспрессии отобранных методом полимеразной цепной реакции в цитологических образцах. Полимеразная цепная реакция проведена на 198 архивных цитологических образцах, которые были отобраны в ранее проведенных исследованиях (с цитологическим заключением Bethesda III–IV): 30 образцов ФРЩЖ, 24 — онкоцитарного рака ЩЖ (прежнее название Пюртле-клеточный рак), 37 — ПРЩЖ, 30 — МРЩЖ, 13 — оксифильноклеточная аденома ЩЖ, 41 — ФАЩЖ, 23 — коллоидный узел (доброкачественное образование).

Относительная экспрессия выбранных 5 микроРНК была определена в 198 образцах ЩЖ, включающих разные типы опухолей и образований (рис. 1). Оценка значимости различий в экспрессии между разными типами опухолей приведена в табл. 4.

Таким образом, установлено, что экспрессия выбранных нами микроРНК имеет связь со злокачественными опухолями ЩЖ, но не с ФРЩЖ, а с МРЩЖ (miR-625, -323a, let-7a, let-7c), ПРЩЖ (miR-625, -574, let-7a, let-7c) и онкоцитарным раком ЩЖ (let-7c). Для определения диагностического потенциала этих микроРНК была определена площадь под ROC-кривой

(ROC AUC) для дифференциальной диагностики отдельных групп (табл. 5).

Согласно данным, представленным в табл. 5, наибольшей диагностической значимостью для дифференциальной диагностики МРЩЖ обладает экспрессия miR-323a, причем данная микроРНК позволяет отличать его не только от нормальных опухолей и образований, но и от других злокачественных опухолей. Онкоцитарный рак ЩЖ и норму наилучшим образом можно дифференцировать с помощью микроРНК let-7c, ПРЩЖ — с помощью miR-574, МРЩЖ — с помощью miR-323a, как было указано выше, а также miR-625.

Далее мы попробовали классифицировать образцы по значениям уровня экспрессии выбранных микроРНК с использованием алгоритма построения дерева принятия решений (C4.5), который относится к классу логических методов. Качество предсказания оценивали с помощью кросс-валидации с 5-ю разбиениями. Сравнение результатов классификации проводили по количеству узлов дерева принятия решений (предполагалось, что чем меньше узлов в дереве, тем меньше должна быть ошибка, связанная с переобучением), а также по доле ошибок, в том числе по средней ошибке при кросс-валидации. Ошибкой считали расхождение между результатами гистологического

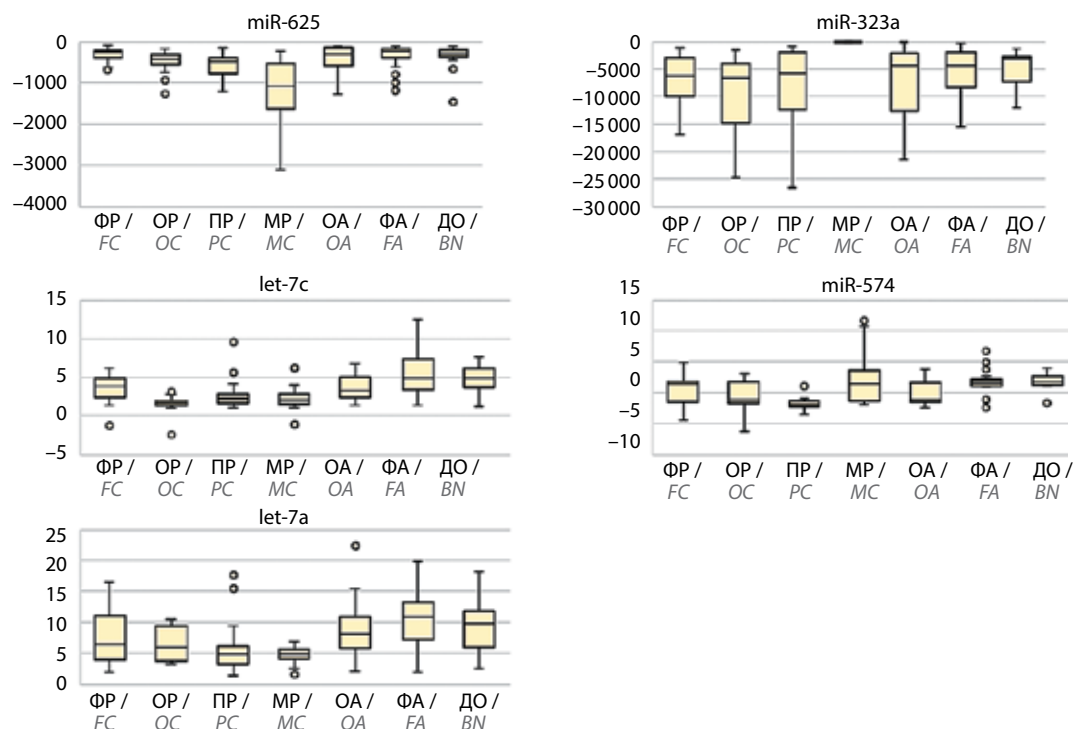


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии 5 микроРНК в разных типах опухолей щитовидной железы. Представлены медиана, верхний и нижний квартили, диапазон без выбросов и выбросы (обозначены кружками). ФР – фолликулярный рак; ОР – онкоцитарный рак; ПР – папиллярный рак; МР – медуллярный рак; ОА – онкоцитарная аденома; ФА – фолликулярная аденома; ДО – доброкачественное образование (коллоидный узел)

Fig. 1. Relative expression levels of 5 microRNAs in different types of thyroid tissues. Median, upper and lower quartiles, range without outliers and outliers (circles) are presented. FC – follicular carcinoma; OC – oncocyctic carcinoma; PC – papillary carcinoma; MC – medullary carcinoma; OA – oncocyctic adenoma; FA – follicular adenoma; BN – benign neoplasm (colloid nodule)

Таблица 4. Уровень значимости при попарном сравнении экспрессии 5 микроРНК в разных типах опухолей щитовидной железы

Table 4. Significance level for pairwise comparison of expression of 5 microRNAs in different types of thyroid tumors

miR-625						
	ОР OC	ПР PC	МР MC	ОА OA	ФА FA	ДО BN
ФР FC	0,019215	0,000034	4,69E-08	0,842785	0,425234	0,712952
ОР OC		0,137882	0,000070	0,108139	0,002848	0,014822
ПР PC	—		0,000130	0,025494	0,000007	0,000220
МР MC	—	—		0,000307	4,29E-09	0,000001
ОА OA	—	—	—		0,685738	0,973727
ФА FA	—	—	—	—		0,370529
miR-323a						
ФР FC	0,448908	0,894674	1,21E-10	0,989451	0,286829	0,247060

Продолжение табл. 4

Continuation of table 4

miR-323a						
ОР OC		0,695626	1,46E-09	0,556155	0,104295	0,099085
ПР PC	—		2,67E-11	0,876962	0,275400	0,345858
МР MC	—	—		0,000002	1,41E-11	4,17E-09
ОА OA	—	—	—		0,700672	0,644737
ФА FA	—	—	—	—		0,944226
let-7a						
ФР FC	0,487669	0,081362	0,047331	0,683938	0,098765	0,390685
ОР OC		0,170586	0,254259	0,140170	0,002268	0,044410
ПР PC	—		0,807781	0,000127	8,34E-09	0,000072
МР MC	—	—		0,000007	5,31E-10	0,000024
ОА OA	—	—	—		0,041069	0,517970
ФА FA	—	—	—	—		0,134391
let-7c						
ФР FC	0,000006	0,002748	0,000556	0,801644	0,005118	0,023198
ОР OC		0,005638	0,063751	0,000626	2,97E-09	2,75E-07
ПР PC	—		0,281010	0,049018	1,96E-07	0,000022
МР C	—	—		0,015536	3,80E-08	0,000004
ОА OA	—	—	—		0,014361	0,051999
ФА FA	—	—	—	—		0,492963
miR-574						
ФР FC	0,254200	0,000012	0,176129	0,451053	0,228284	0,041663
ОР OC		0,001193	0,021082	0,886161	0,012619	0,002601
ПР PC	—		1,00E-08	0,001818	1,81E-09	9,08E-09

Окончание табл. 4

The end of table 4

miR-574						
	ОР OC	ПР PC	МР MC	ОА OA	ФА FA	ДО BN
МР MC	—	—		0,074264	0,875129	0,609027
ОА OA	—	—	—		0,059890	0,037998
ФА FA	—	—	—	—		0,269003

Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые, с учетом множественных сравнений, различия ($p < 0,000476$). ФР — фолликулярный рак; ОР — онкоцитарный рак; ПР — папиллярный рак; МР — медуллярный рак; ОА — онкоцитарная аденома; ФА — фолликулярная аденома; ДО — доброкачественное образование.

Note. Significant differences taking into account multiple comparisons ($p < 0,000476$) are shown in bold. FC — follicular carcinoma; OC — oncocytic carcinoma; PC — papillary carcinoma; MC — medullary carcinoma; OA — oncocytic adenoma; FA — follicular adenoma; BN — benign neoplasm.

Таблица 5. ROC-анализ экспрессии 5 микроРНК при дифференциальной диагностике различных опухолей щитовидной железы

Table 5. ROC analysis of expression of 5 microRNAs in differential diagnosis of various thyroid tumors

МикроРНК MicroRNA	ROC AUC						
	ФР/ФА FC/FA	Рак / норма Cancer/health	ФР/норма FC/health	ОР/норма OC/health	ПР/норма PC/health	МР / норма MC/health	МР/все остальное MC/everything else
miR-625	0,525	0,729	0,517	0,709	0,779	0,897	0,861
miR-323a	0,582	0,558	0,568	0,617	0,563	0,972	0,977
let-7a	0,676	0,807	0,620	0,744	0,815	0,873	0,754
let-7c	0,691	0,806	0,654	0,926	0,812	0,856	0,706
miR-574	0,613	0,670	0,581	0,678	0,894	0,477	0,646

Примечание. ROC AUC — площадь под ROC-кривой; ФР — фолликулярный рак; ОР — онкоцитарный рак; ПР — папиллярный рак; МР — медуллярный рак; ФА — фолликулярная аденома. Норма = ФА + ДО; рак = ФР + ОР + ПР + МР. Жирным шрифтом выделены значения ROC AUC $> 0,85$.

Note. ROC AUC — area under the ROC curve; FC — follicular carcinoma; OC — oncocytic carcinoma; PC — papillary carcinoma; MC — medullary carcinoma; FA — follicular adenoma. Health = FA + BN; cancer = FC + OC + PC + MC. ROC AUC values $> 0,85$ are shown in bold.

анализа для данного узла и классификатора. Результаты классификации разных типов опухолей с помощью 5 выбранных нами микроРНК и алгоритма построения дерева принятия решений C4.5 представлены на рис. 2.

Согласно данным, представленным на рис. 2, дифференциация ФАЩЖ и ФРЩЖ с помощью выбранных нами микроРНК дают высокий уровень ошибок (21 %, при кросс-валидации — 35 %), а наименьший процент ошибок (и самое простое дерево) наблюдается при МРЩЖ, который можно с высокой точностью отличить не только от доброкачественной опухоли, но и от других типов опухолей, включая злокачественные новообразования (процент ошибок — 2 %, при кросс-валидации — 3 %). Также относительно точно можно дифференцировать ПРЩЖ и доброкачествен-

ную опухоль (процент ошибок — 5 %, при кросс-валидации — 12 %).

С учетом неудовлетворительных результатов поиска информативного дооперационного маркера ФРЩЖ дополнительно был проведен кластерный анализ данных секвенирования методом k-средних (рис. 3). Кластерный анализ подразумевает разбиение выборки так, чтобы похожие образцы попали в одну и ту же группу, а образцы из разных групп существенно различались — в нашем случае по профилю содержания микроРНК, выявленному с помощью секвенирования.

Проверка однородности данных с помощью кластерного анализа показала, что на молекулярном уровне происходит четкое деление исследованных нами 16 образцов (ФРЩЖ и ФАЩЖ) на 2 группы. Первый

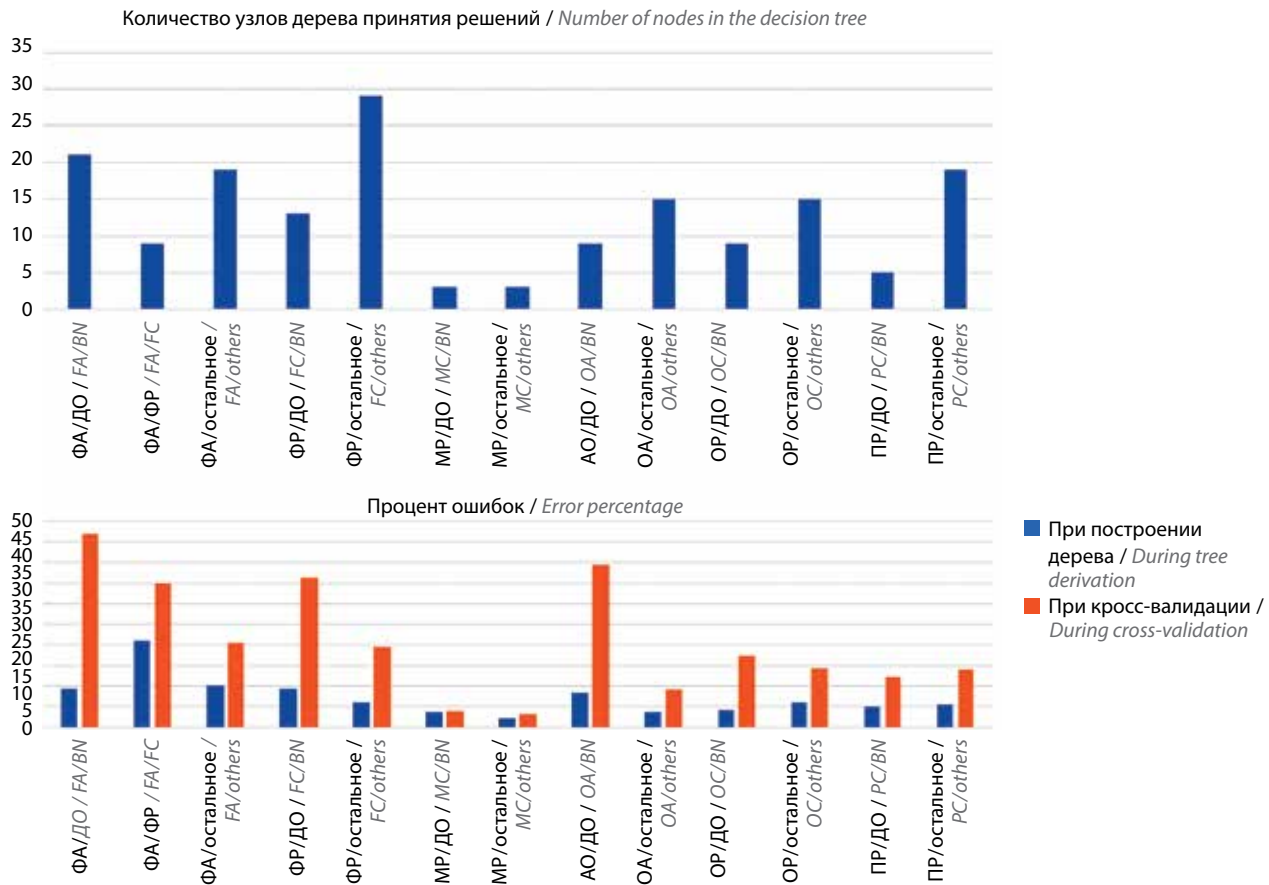


Рис. 2. Сравнение результатов классификации разных типов опухолей щитовидной железы с помощью 5 выбранных нами микроРНК и алгоритма построения дерева принятия решений C4.5. ФР – фолликулярный рак; ОР – онкоцитарный рак; ПР – папиллярный рак; МР – медуллярный рак; ОА – онкоцитарная аденома; ФА – фолликулярная аденома; ДО – доброкачественное образование

Fig. 2. Comparison of the results of classification of various types of thyroid tumors using the 5 selected microRNAs and decision tree derivation algorithm C4.5. FC – follicular carcinoma; OC – oncocytic carcinoma; PC – papillary carcinoma; MC – medullary carcinoma; OA – oncocytic adenoma; FA – follicular adenoma

кластер содержал 4 образца ФРЩЖ и 3 образца ФАЩЖ, второй кластер – 4 образца ФРЩЖ и 5 образцов ФАЩЖ. Таким образом, на уровне содержания микроРНК кластерный анализ позволил выявить 2 однородные группы опухолей, которые по гистологическим заключениям были классифицированы иначе.

Обсуждение

Частота встречаемости рака в группе Bethesda IV в нашем исследовании составила 25,4 %, что согласуется с данными литературы (26,1 % по данным мета-анализа 2012 г. [1]). С учетом общей заболеваемости раком ЩЖ в Челябинской области (по данным Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, 8,9 случая в год на 100 тыс. населения) ФРЩЖ является довольно редким заболеванием и составляет, по нашим данным, 7,6 % от общего количества прооперированных больных

со злокачественными новообразованиями. Низкая прогностическая точность цитологической категории Bethesda IV (фолликулярная неоплазия) в отношении рака ЩЖ, вероятно, связана с тем, что данный метод исследования не может дифференцировать ФРЩЖ, поскольку такой морфологический диагноз основан на оценке сосудистой инвазии и/или инвазии опухоли в капсулу узла, а это недоступно при помощи цитологического метода [37]. Следует понимать, что у пациентов с узлами в ЩЖ Bethesda IV злокачественные опухоли могут быть представлены ФРЩЖ, фолликулярным вариантом ПРЩЖ, фолликулярными неоплазиями с низким риском злокачественности, в том числе неинвазивной фолликулярной неоплазмой с папиллярноподобными ядерными изменениями ЩЖ (NIFTP). По нашим данным, доля ФРЩЖ в группе пациентов с Bethesda IV составила лишь 11 % (36 из 328 больных раком ЩЖ), основной же тип рака в этой группе – ПРЩЖ (265 (80,8 %) пациентов). Подобная статистика приводится во многих работах, авторы

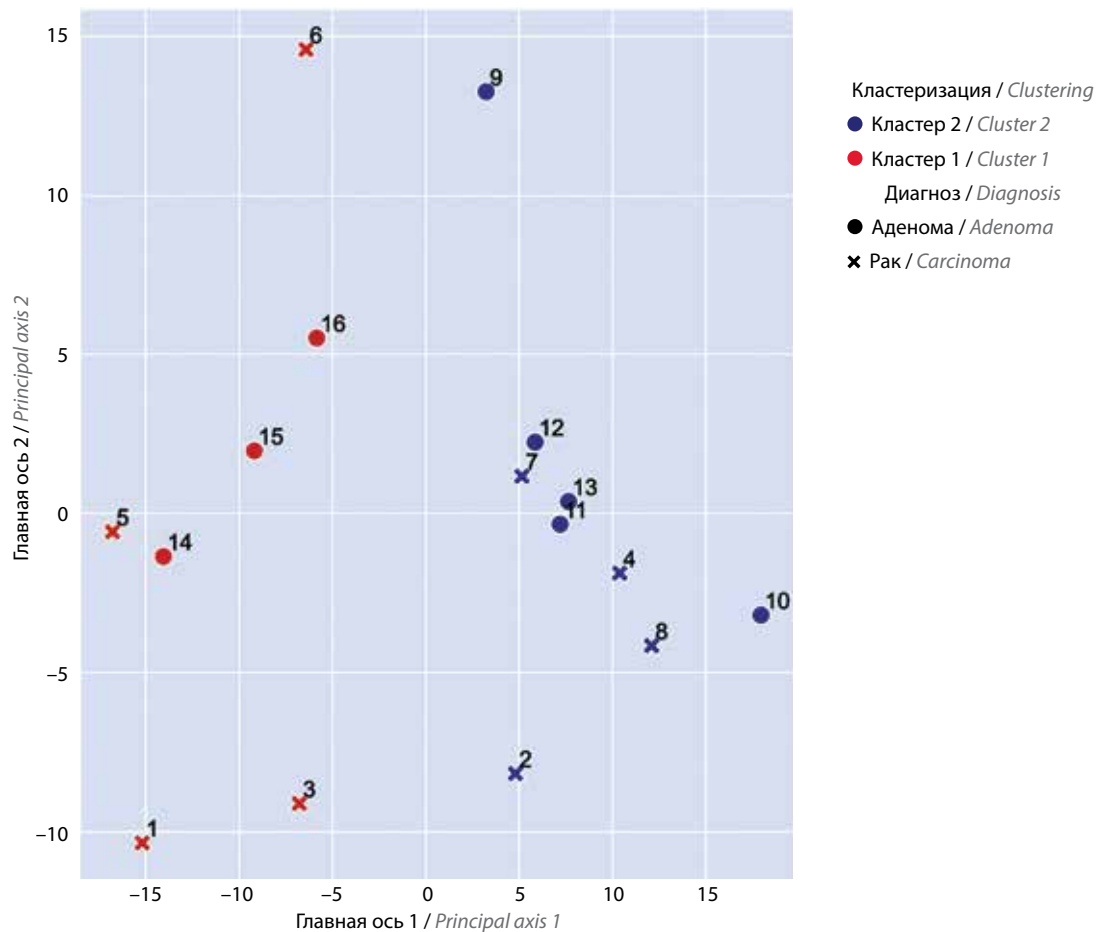


Рис. 3. Результат кластеризации образцов, полученный методом *k*-средних. В качестве осей использованы первые 2 главные компоненты, полученные методом главных компонент

Fig. 3. Result of sample clustering obtained using the *k*-means method. The axes are the first 2 principal components obtained using the principal component analysis

которых связывают данную особенность с частой встречаемостью фолликулярного гистотипа ПРЩЖ [9, 38].

Послеоперационная диагностика ФРЩЖ также может представлять определенные трудности. Известно, что установление диагноза ФРЩЖ нередко является для морфологов непростой задачей, что освещено в обзоре J. Rosai и соавт. [39]. Авторы перечисляют многочисленные морфологические сложности, такие как выбухание опухоли через капсулу ЩЖ, имитирующее капсулярную инвазию, опухолевую контаминацию, имитирующую сосудистую инвазию, и др. Разногласия морфологов при пересмотре случаев ФРЩЖ — также не редкость. Так, в одном исследовании оценивалась точность гистологического заключения 5 врачей-морфологов из разных клиник. Специалисты анализировали данные 41 прооперированного пациента. Согласие 5 патологов в постановке диагноза ФРЩЖ после пересмотра всех препаратов было достигнуто только в 13 (!) случаях, а разногласия наблюдались в 11, 28, 35, 41 и 69 % случаев соответственно [40]. В другом исследовании при пересмотре 66 образцов ФРЩЖ 3 морфо-

логами консенсус в отношении диагноза был достигнут лишь в 19 (29 %) случаях, а в 18 (27 %) первоначальный диагноз «рак» был снят [41].

Перед секвенированием мы пересмотрели гистологические препараты вместе со специалистами экспертного уровня. В 10 (45,5 %) из 22 случаев диагноз «рак ЩЖ» не подтвердился, диагноз ФРЩЖ единодушно был установлен лишь в 8 (36,4 %) случаях (эти образцы были направлены на секвенирование).

С учетом того, что морфологические различия ФРЩЖ и ФАЩЖ трудноуловимы, ожидания получить какие-то принципиальные различия и на молекулярном уровне были также невелики. После секвенирования 16 гистологических образцов (8 — ФРЩЖ и 8 — ФАЩЖ) выявлены 5 микроРНК (miR-323a, -625, -74, let-7a, let-7c), по которым эти группы различались в наибольшей степени. Однако при проверке на большей выборке с помощью ПЦР относительная экспрессия ни одной из этих микроРНК не смогла с высокой точностью дифференцировать ФРЩЖ и ФАЩЖ. При этом различия для других типов рака ЩЖ мы

получили. Так, при МРЩЖ относительный уровень экспрессии miR-323a оказался практически на 2 порядка выше по сравнению с этим показателем при других опухолях. По сравнению с доброкачественными опухолями при онкоцитарном раке ЩЖ, ПРЩЖ и МРЩЖ в большей степени снижена экспрессия miR-625, при ПРЩЖ — miR-574. Уровень экспрессии 2 микроРНК — let-7a и let-7c — также был ниже в злокачественных опухолях по сравнению с доброкачественными образованиями и ФАЩЖ: в меньшей степени при ФРЩЖ (let-7a — в 1,6 раза, let-7c — в 1,3 раза). При ПРЩЖ уровень экспрессии этих микроРНК уменьшался относительно нормы в 2 раза, при онкоцитарном раке ЩЖ let-7c — в 2,9 раза. Таким образом, все микроРНК, которые мы выбрали по результатам секвенирования, связаны с онкологическим процессом, но ни одна не проявила специфичность для ФРЩЖ.

В ходе работы мы соотносили: 1) постулат, что окончательное деление на ФРЩЖ и ФАЩЖ осуществляется на основании послеоперационного гистологического исследования; 2) гипотезу о том, что решающее значение в развитии ФРЩЖ имеет экспрессия различных микроРНК. Результаты такого соотношения могут быть такими: вариант А — первое и второе верно; вариант Б — первое верно, второе нет; вариант В — первое неверно, второе верно; вариант Г — первое и второе неверны. Для решения поставленной задачи мы применили кластерный анализ — многомерную статистическую процедуру, способную упорядочить объекты в сравнительно однородные группы, которая относится к широкому классу задач «обучения без учителя». Исходя из поставленной задачи, варианты Б и Г не могут привести к формированию 2 кластеров. При варианте А должны сформироваться 2 кластера, в один из

которых попадет ФРЩЖ, а в другой — ФАЩЖ. Мы же получили вариант В, когда сформировались 2 кластера, независимых от гистологического деления. Таким образом, на уровне содержания микроРНК фолликулярные опухоли могут разделяться на группы, отличные от тех, что получаются с помощью морфологического исследования, но клиническое значение такого деления в рамках исследованных критериев представляется неопределенным и, вероятно, сомнительным.

Заключение

Выбор стратегии лечения при опухолях ЩЖ как в цитопатологии, так и в гистопатологии зачастую основывается на балансе вероятностей. К принятию решения о назначении операции у пациентов с цитологическим заключением «фолликулярная неоплазия», а также о послеоперационном ведении больных с гистологическими заключениями ФРЩЖ или «фолликулярная опухоль с неопределенным злокачественным потенциалом» необходимо подходить персонализированно. Практикующие врачи, занимающиеся хирургическим лечением опухолей ЩЖ, хорошо об этом знают. Морфологические критерии и клинические рекомендации обновляются регулярно, а пациенты с названными послеоперационными диагнозами зачастую получают противоположные рекомендации и прогнозы от различных специалистов. В настоящее время с уверенностью можно утверждать лишь то, что проблема как дооперационной, так зачастую и послеоперационной диагностики ФРЩЖ остается открытой и требует принятия более точных решений. Одним из них, несомненно, является продолжение поиска специфических молекулярно-генетических маркеров или (в большей степени) их пока не установленных сочетаний.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. 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: 10.1159/000339959
2. Cibas E.S., Ali S.Z. The 2017 Bethesda System for reporting thyroid cytopathology. *Thyroid* 2017;27(11):1341–6. DOI: 10.1089/thy.2017.0500
3. Schneider D.F., Cherney Stafford L.M., Brys N. et al. Gauging the extent of thyroidectomy for indeterminate thyroid nodules: an oncologic perspective. *Endocr Pract* 2017;23(4):442–50. DOI: 10.4158/EP161540.OR
4. Stewardson P., Eszlinger M., Paschke R. Diagnosis of endocrine disease: usefulness of genetic testing of fine-needle aspirations for diagnosis of thyroid cancer. *Eur J Endocrinol* 2022;187(3):R41–52. DOI: 10.1530/EJE-21-1293
5. Patel K.N., Yip L., Lubitz C.C. et al. The American Association of Endocrine Surgeons Guidelines for the definitive surgical management of thyroid disease in adults. *Ann Surg* 2020;271(3):e21–93. DOI: 10.1097/SLA.0000000000003580
6. Silaghi C.A., Lozovanu V., Georgescu C.E. et al. Thyroseq v3, Afirma GSC, and microRNA panels versus previous molecular tests in the preoperative diagnosis of indeterminate thyroid nodules: a systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:649522. DOI: 10.3389/fendo.2021.649522
7. Wang M.M., Beckett K., Douek M. et al. Diagnostic value of molecular testing in sonographically suspicious thyroid nodules. *J Endocr Soc* 2020;4(9):bvaa081. DOI: 10.1210/endo/bvaa081
8. Azizi G., Keller J.M., Mayo M.L. et al. Shear wave elastography and Afirma™ gene expression classifier in thyroid nodules with indeterminate cytology: a comparison study. *Endocrine* 2018;59(3):573–84. DOI: 10.1007/s12020-017-1509-9
9. Patel K.N., Angell T.E., Babiarz J. et al. Performance of a genomic sequencing classifier for the preoperative diagnosis of cytologically indeterminate thyroid nodules. *JAMA Surg* 2018;153(9):817–24. DOI: 10.1001/jamasurg.2018.1153
10. Титов С.Е., Лукьянов С.А., Козорезова Е.С. и др. Валидация дооперационной диагностики злокачественных опухолей щитовидной железы с помощью молекулярного классификатора. *Вопросы онкологии* 2022;68(6):741–51. DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-6-741-751
Titov S.E., Lukyanov S.A., Kozorezova E.S. et al. Validation

- of preoperative diagnosis of malignant thyroid tumors using a molecular classifier. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2022;68(6):741–51. (In Russ.).
DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-6-741-751
11. Xing M., Liu R., Liu X. et al. BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence. *J Clin Oncol* 2014;32(25):2718–26. DOI: 10.1200/JCO.2014.55.5094
 12. Xing M. Clinical utility of RAS mutations in thyroid cancer: a blurred picture now emerging clearer. *BMC Med* 2016;14:12. DOI: 10.1186/s12916-016-0559-9
 13. Song Y.S., Park Y.J. Genomic characterization of differentiated thyroid carcinoma. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2019;34(1):1–10. DOI: 10.3803/EnM.2019.34.1.1
 14. De Martino M., Esposito F., Capone M. et al. Noncoding RNAs in thyroid-follicular-cell-derived carcinomas. *Cancers (Basel)* 2022;14(13):3079. DOI: 10.3390/cancers14133079
 15. Macfarlane L.A., Murphy P.R. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Curr Genomics* 2010;11(7):537–61. DOI: 10.2174/138920210793175895
 16. Santiago K., Chen Wongworawat Y., Khan S. Differential microRNA-signatures in thyroid cancer subtypes. *J Oncol* 2020;2020:2052396. DOI: 10.1155/2020/2052396
 17. Wojtas B., Ferraz C., Stokowy T. et al. Differential miRNA expression defines migration and reduced apoptosis in follicular thyroid carcinomas. *Mol Cell Endocrinol* 2014;388(1–2):1–9. DOI: 10.1016/j.mce.2014.02.011
 18. Stokowy T., Wojtaś B., Fajarewicz K. et al. miRNAs with the potential to distinguish follicular thyroid carcinomas from benign follicular thyroid tumors: results of a meta-analysis. *Horm Metab Res* 2014;46(3):171–80. DOI: 10.1055/s-0033-1363264
 19. Weber F., Teresi R.E., Broelsch C.E. et al. A limited set of human microRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(9):3584–91. DOI: 10.1210/jc.2006-0693
 20. 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):10343–59. DOI: 10.18632/oncotarget.23130
 21. Titov S., 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
 22. Titov S.E., Kozorezova E.S., Demenkov P.S. et al. Preoperative typing of thyroid and parathyroid tumors with a combined molecular classifier. *Cancers* 2021;13(2):237. DOI: 10.3390/cancers13020237
 23. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
 24. Titov S.E., Ivanov M.K., Karpinskaya E.V. et al. miRNA profiling, detection of BRAF V600E mutation and RET-PTC1 translocation in patients from Novosibirsk oblast (Russia) with different types of thyroid tumors. *BMC Cancer* 2016;16:201. DOI: 10.1186/s12885-016-2240-2
 25. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005;33(20):e179. DOI: 10.1093/nar/gni178
 26. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods* 2001;25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
 27. 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(20):2170–83. DOI: 10.1002/sim.2677
 28. Pérez-Ortiz M., Torres-Jiménez M., Gutiérrez P.A. et al. Fisher score-based feature selection for ordinal classification: a social survey on subjective well-being. In: *Hybrid Artificial Intelligent Systems*. Ed. by F. Martínez-Álvarez, A. Troncoso, H. Quintián, E. Corchado. HAIS 2016. Lecture Notes in Computer Science. Vol. 9648. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-32034-2_50
 29. Kononenko I., Šimec E., Robnik-Sikonja M. Overcoming the myopia of inductive learning algorithms with RELIEFF. *Applied Intelligence* 1997;7(1):39–55. DOI: 10.1023/A:1008280620621
 30. Li J., Cheng K., Wang S. et al. Feature selection. *ACM Computing Surveys* 2017;50(6):1–45. DOI: 10.1145/3136625
 31. Bylesjö M., Rantalainen M., Cloarec O. et al. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J Chemometrics* 2006;20(8–10):341–51. DOI: 10.1002/cem.1006
 32. Thevenot E., Roux A., Xu Y. et al. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses. *J Proteome Res* 2015;14(8):3322–35. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00354
 33. Tenenhaus M. *La régression PLS*. Paris, Editions Technip, 1998.
 34. Ricco R. TANAGRA: a free software for research and academic purposes. *Proceedings of EGC'2005, RNTI-E-3*. (In French). Available at: https://www.researchgate.net/publication/220786300_TANAGRA_un_logiciel_gratuit_pour_l'enseignement_et_la_recherche
 35. Quinlan J.R. *C4.5: programs for machine learning*. San Francisco: Morgan Kaufmann Publishers Inc; 1993.
 36. Зиновьев А.Ю. Визуализация многомерных данных. Красноярск: Издательство КГТУ, 2000.
 37. Zinoviev A.Yu. Visualization of multidimensional data. Krasnoyarsk, KSTU Publishing House, 2000. (In Russ.).
 38. McHenry C.R., Phitayakorn R. Follicular adenoma and carcinoma of the thyroid gland. *Oncologist* 2011;16(5):585–93. DOI: 10.1634/theoncologist.2010-0405
 39. Valderrabano P., Leon M.E., Centeno B.A. et al. Institutional prevalence of malignancy of indeterminate thyroid cytology is necessary but insufficient to accurately interpret molecular marker tests. *Eur J Endocrinol* 2016;174(5):621–9. DOI: 10.1530/EJE-15-1163
 40. Rosai J., Kuhn E., Carcangiu M.L. Pitfalls in thyroid tumour pathology. *Histopathology* 2006;49:107–20. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2006.02451.x
 41. Franc B., de la Salmonière P., Lange F. et al. Interobserver and intraobserver reproducibility in the histopathology of follicular thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 2003;34(11):1092–100. DOI: 10.1016/s0046-8177(03)00403-9
 42. Cipriani N.A., Nagar S., Kaplan S.P. et al. Follicular thyroid carcinoma: how have histologic diagnoses changed in the last half-century and what are the prognostic implications? *Thyroid* 2015;25(11):1209–16. DOI: 10.1089/thy.2015.0297

Вклад авторов

С.Е. Титов: разработка концепции и дизайна исследования, получение данных для анализа, интерпретация данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

С.А. Лукьянов: разработка концепции и дизайна исследования, сбор клинических данных, получение данных для анализа, интерпретация данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

С.В. Сергийко: разработка концепции и дизайна исследования, техническая и административная поддержка, руководство исследованием;

Е.С. Козорезова, Т.Е. Ильина: разработка концепции и дизайна исследования, валидация диагноза, получение данных для анализа;

Ю.А. Веряскина: получение данных для анализа, проверка подлинности данных;

С.Л. Воробьев: валидация диагноза, получение данных для анализа, написание текста статьи.

Authors' contribution

S.E. Titov: development of the concept and design of the study, obtaining data for analysis, interpretation of data, review of publications on the topic of the article, article writing;

S.A. Lukyanov: development of the concept and design of the study, collection of clinical data, obtaining data for analysis, interpretation of data, review of publications on the topic of the article, article writing;

S.V. Sergiyko: development of the research concept and design, technical and administrative support, research management;

E.S. Kozorezova, T.E. Ilyina: development of the concept and design of the study, validation of the diagnosis, obtaining data for analysis;

Yu.A. Veryaskina: obtaining data for analysis, verifying the authenticity of data;

S.L. Vorobyov: validation of the diagnosis, obtaining data for analysis, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.Е. Титов / S.E. Titov: <https://orcid.org/0000-0001-9401-5737>

С.А. Лукьянов / S.A. Lukyanov: <https://orcid.org/0000-0001-5559-9872>

С.В. Сергийко / S.V. Sergiyko: <https://orcid.org/0000-0001-6694-9030>

Ю.А. Веряскина / Yu.A. Veryaskina: <https://orcid.org/0000-0002-3799-9407>

Т.Е. Ильина / T.E. Ilyina: <https://orcid.org/0000-0003-4186-8108>

Е.С. Козорезова / E.S. Kozorezova: <https://orcid.org/0000-0002-3659-7510>

С.Л. Воробьев / S.L. Vorobyov: <https://orcid.org/0000-0002-7817-9069>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания (Единая государственная информационная система учета научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ гражданского назначения, № 121040100268-9) и за счет гранта Российского научного фонда (грант № 20-14-00074-П).

Funding. The research was carried out within the framework of the state task (Unified State information system for accounting of research, development and technological works for civil purposes, No. 121040100268-9) and at the expense of a grant from the Russian Science Foundation (grant No. 20-14-00074-P).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 3 от 18.04.2019).

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 South Ural State Medical University, Ministry of Health of Russia.

All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 17.08.2023. **Принята к публикации:** 11.11.2023.

Article submitted: 17.08.2023. **Accepted for publication:** 11.11.2023.