

DOI: 10.17650/2222-1468-2022-12-2-71-78



Диагностическая и прогностическая значимость выявления мутаций в генах *BRAF*, *TERT*, *RAS* и транслокаций *RET/PTC* и *PAX8/PPARG* в материале тонкоигольной аспирационной биопсии узлов щитовидной железы IV цитологической категории (Bethesda, 2017)

А.А. Мусаелян^{1,2}, С.В. Лапин¹, В.Д. Назаров¹, Е.С. Козорезова³, С.Л. Воробьев³, С.В. Орлов^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»; Россия, 354376 Краснодарский край, Сочи, Адлерский р-н, с. Веселое, ул. Мира, 177;

³ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики»; Россия, 192283 Санкт-Петербург, ул. Олеко Дундича, 8, корп. 2

Контакты: Арам Ашотович Мусаелян a.musaelyan8@gmail.com

Введение. Тонкоигольная аспирационная биопсия с последующим цитологическим исследованием является «золотым стандартом» в диагностике узлов щитовидной железы. Однако в 1/3 случаев наблюдаются неопределенные результаты (категории III–V по классификации Bethesda Thyroid Classification 2017). Наиболее распространенной и сложной для интерпретации является цитологическая категория IV.

Цель исследования – определение диагностической и прогностической значимости молекулярно-генетического исследования материала тонкоигольной аспирационной биопсии у пациентов с узлами щитовидной железы категории IV по классификации Bethesda (2017).

Материалы и методы. В исследование вошли операционные образцы щитовидной железы, полученные от пациентов, у которых в ходе цитологического исследования выявлена патология цитологической категории IV по классификации Bethesda (2017). Первая группа включала образцы 143 больных с образованиями щитовидной железы, 2-я группа – цитологический материал 45 больных. Мутация V600E в гене *BRAF*, а также мутации в генах *RAS* (*KRAS*, *HRAS*, *NRAS*) выявляли с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции, а транслокации *RET/PTC1*, *RET/PTC3* и *PAX8/PPARG* – с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Для выявления мутаций в промоторной области гена *TERT* применяли секвенирование по Сэнгеру.

Результаты. В 1-й группе распространенность исследуемых мутаций при раке щитовидной железы составила 35,1 %. Из них в 8,8 % случаев наблюдалась мутация V600E в гене *BRAF*, в 24,6 % – мутации в генах *RAS*, в 1,8 % – в гене *TERT*. Мутация C228T в гене *TERT* обнаружена в 1 случае широкоинвазивной гюртлеклеточной карциномы щитовидной железы. Распространенность мутаций в доброкачественных образованиях составила 4,7 %. В них обнаружены также мутации в генах *RAS*. В 1-й группе мутация *BRAF* V600E была связана с наличием экстраклеточной инвазии ($p = 0,024$), сосудистой инвазии ($p = 0,018$) и метастазов в лимфатических узлах ($p = 0,018$). Во 2-й группе при использовании генетической панели чувствительность и специфичность оказались равны 36,4 и 93,9 % соответственно. Прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов составила 66,7 и 81,6 % соответственно. В обеих группах транслокаций *RET/PTC* и *PAX8/PPARG* выявлено не было.

Заключение. Исследуемая молекулярно-генетическая панель обладает высокой специфичностью в отношении карцином и позволяет дополнить цитологическую диагностику материала категории IV по классификации Bethesda. Наличие мутации V600E в гене *BRAF* связано с агрессивным морфологическим паттерном.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, молекулярно-генетическая диагностика, тонкоигольная аспирационная биопсия, Bethesda IV, *BRAF*, *TERT*, *RAS*, *RET/PTC*, *PAX8/PPARG*

Для цитирования: Мусаелян А.А., Лапин С.В., Назаров В.Д. и др. Диагностическая и прогностическая значимость выявления мутаций *BRAF*, *TERT*, *RAS*, *RET/PTC* и *PAX8/PPARG* в материале тонкоигольной аспирационной биопсии

узлов щитовидной железы IV цитологической категории (Bethesda, 2017). Опухоли головы и шеи 2022;12(2):71–8.
DOI: 10.17650/2222-1468-2022-12-2-71-78

Diagnostic and prognostic significance of detecting mutations in the *BRAF*, *TERT*, *RAS*, *RET/PTC*, *PAX8/PPARG* in the material of fine needle aspiration biopsy thyroid nodules in the IV cytological group (Bethesda, 2017)

A.A. Musaelyan^{1,2}, S.V. Lapin¹, V.D. Nazarov¹, E.S. Kozorezova³, S.L. Vorobyev³, S.V. Orlov^{1,2}

¹I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia; 6–8 L'va Tolstogo St., Saint Petersburg 197101, Russia;

²Research Institute of Medical Primatology, 177 Mira St., Veseloe Village, Sochi, Adler Dstr., Krasnodar Territory 354376, Russia;

³National Center of Clinical Morphological Diagnostics; Bld. 2, 8 Oleko Dundicha St., St. Petersburg 192283, Russia

Contacts: Aram Ashotovich Musaelyan a.musaelyan8@gmail.com

Introduction. Fine needle aspiration biopsy followed by cytological examination is the gold standard in the diagnosis of thyroid nodules. However, up to one third of cases represent an indeterminate result (Bethesda Thyroid Classification, 2017) III–V). Among such cases, category IV is the most common and most difficult to interpret (Bethesda, 2017). **The study objective** is to determination of the diagnostic and prognostic significance of the molecular genetic study of the fine needle aspiration biopsy material in patients with thyroid nodules with the cytological category Bethesda, IV.

Materials and methods. The study included surgical thyroid samples obtained from patients whose cytological examination revealed pathology of cytological category IV according to the Bethesda classification (2017). Group 1 included surgical samples from 143 patients with thyroid lesions, and Group 2 – cytological material from 45 patients. Determination of the *BRAF* V600E mutation, mutations in the *RAS* genes (*KRAS*, *HRAS*, *NRAS*) was carried out using allele-specific polymerase chain reaction, and the *RET/PTC1*, *RET/PTC3* and *PAX8/PPARG* translocations were determined using reverse transcription polymerase chain reaction. Sanger sequencing was used to detect mutations in the promoter region of the *TERT* gene.

Results. In Group 1, an overall prevalence of the studied mutations in thyroid cancer was 35.1 %: 8.8 % of cases were mutation *BRAF* V600E, 24.6 % – mutations in the *RAS* genes, 1.8 % – mutation C228T in the *TERT* gene. The C228T mutation in the *TERT* gene was found in 1 case of widely invasive Hurtle cell carcinoma. The prevalence of mutations in benign formations was 4.7 %. Mutations in *RAS* genes were also found in them in Group 1, mutation *BRAF* V600E was associated with the presence of extrathyroid invasion ($p = 0.024$), vascular invasion ($p = 0.018$), and lymph node metastases ($p = 0.018$). In Group 2, using the genetic panel sensitivity and specificity were equal: 36.4 and 93.9 %, respectively. Positive and negative predictive values were 66.7 and 81.6 %, respectively. No *RET/PTC* and *PAX8/PPARG* translocations were found in Groups 1 and 2.

Conclusion. The investigated molecular genetic panel, having a high specificity for carcinomas, will make it possible to supplement the cytological diagnostics of material in the category Bethesda, IV. *BRAF* V600E was associated with an aggressive morphological pattern.

Key words: thyroid cancer, molecular genetic diagnostics, fine needle aspiration biopsy, Bethesda IV, *BRAF*, *TERT*, *RAS*, *RET/PTC*, *PAX8/PPARG*

For citation: Musaelyan A.A., Lapin S.V., Nazarov V.D. et al. Diagnostic and prognostic significance of detecting mutations in the *BRAF*, *TERT*, *RAS*, *RET/PTC*, *PAX8/PPARG* in the material of fine needle aspiration biopsy thyroid nodules in the IV cytological group (Bethesda, 2017). Опухоли головы и шеи = Head and Neck Tumors 2022;12(2):71–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/2222-1468-2022-12-2-71-78

Введение

Широкая доступность и активное использование в клинической практике ультразвукового исследования щитовидной железы (ЩЖ) привели к значительному увеличению частоты обнаружения узловых образований. Это, в свою очередь, обусловило рост числа тонкоигольных аспирационных биопсий (ТАБ) узлов с последующим цитологическим исследованием. За последние 20 лет этот метод исследования стал использоваться в 5–7 раз чаще [1]. Вместе с тем в ЩЖ выявляют все

больше узловых образований с неопределенными цитологическими результатами. Их доля достигает 30 % [2].

Согласно Bethesda Thyroid Classification (Bethesda, 2017), неопределенные цитологические результаты подразделяются на 3 категории (Bethesda III–V) [3]. Одной из самых сложных в интерпретации и наиболее распространенной (около 10 % всех случаев ТАБ) является категория IV – фолликулярная неоплазия или подозрение на нее [4]. Риск наличия злокачественного процесса при данной категории варьирует от 25 до 40 %

[3]. Это обусловлено тем, что дифференциальная диагностика образований, имеющих фолликулярный паттерн, на цитологическом уровне, как правило, невозможна в связи со схожестью картины [5]. Для постановки диагноза «фолликулярная карцинома» необходимо выявить такие характерные признаки данного заболевания, как капсулярная и/или сосудистая инвазия, которые можно обнаружить лишь в ходе полноценного гистологического исследования операционного материала [6].

Исходя из того что узловые образования категории IV по классификации Bethesda могут иметь злокачественный характер, в большинстве случаев проводится гемитиреоидэктомия или тиреоидэктомия. По результатам морфологического исследования операционного материала у 80 % пациентов новообразования оказываются доброкачественными. В некоторых случаях после лобэктомии обнаруживают злокачественный процесс, и объем операции расширяется — выполняется тиреоидэктомия [7]. Проведение избыточных по объему и повторных оперативных вмешательств сопряжено с риском возникновения осложнений, а также со значительными экономическими затратами [8]. Таким образом, необходима более точная предоперационная оценка риска развития злокачественного процесса с целью выработки оптимальной хирургической тактики.

В последнее время прояснилась роль молекулярной биологии при раке ЩЖ, что позволило внедрить в клиническую практику генетическое исследование цитологического материала с целью объективизации онкологического процесса, особенно на предоперационном этапе. Определение точечных мутаций в гене *BRAF*, генах семейства *RAS* (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*), а также транслокаций *RET/PTC1*, *RET/PTC3* и *PAX8/PPARG* у пациентов с узловыми образованиями категорий III–V по Bethesda является одним из наиболее объективных методов оценки риска наличия злокачественной опухоли ЩЖ [9]. При данной патологии наблюдались мутации в промоторном регионе гена *TERT*, которые представляют собой специфичный неблагоприятный прогностический маркер [10]. Однако исследований, посвященных диагностической и прогностической значимости выявления перечисленных мутаций в цитологическом материале категории IV по Bethesda, крайне мало.

Цель исследования — определение диагностической и прогностической значимости молекулярно-генетического тестирования материала ТАБ у пациентов с узлами щитовидной железы категории IV по классификации Bethesda.

Материалы и методы

В исследование вошли операционные образцы ЩЖ, полученные от пациентов, у которых в ходе ци-

тологического исследования выявлена патология категории IV по классификации Bethesda (2017). В 1-ю группу был включен ретроспективно собранный гистологический материал 143 пациентов с образованиями в ЩЖ. В зависимости от результатов гистологического исследования образцы опухолей этой группы были разделены на 2 подгруппы: злокачественные ($n = 57$) и доброкачественные ($n = 86$) образования.

Во 2-ю группу вошли образцы пациентов, у которых были выявлены мутации в цитологическом материале категории IV по классификации Bethesda (2017). Образцы были представлены предметным стеклом с цитологическим материалом или клеточной взвесью жидкостной биопсии. Также по этой группе были собраны данные о гистологическом исследовании операционного материала.

В 1-й группе оценивали распространенность и прогностическую значимость мутаций в генах *BRAF*, *RAS*, *TERT* и транслокаций *RET/PTC1*, *RET/PTC3*, *PAX8/PPARG* в операционном материале. Во 2-й группе анализировали диагностическую значимость молекулярно-генетической панели в материале ТАБ (патология категории IV по классификации Bethesda).

Все пациенты, включенные в исследование, подписали добровольное информированное согласие на сбор биологического материала и клинических данных, а также на проведение молекулярно-генетического исследования. Клинико-эпидемиологическая характеристика пациентов 1-й и 2-й групп представлена в табл. 1.

У всех пациентов, участвующих в исследовании, определяли мутацию V600E в гене *BRAF*, в промоторном регионе гена *TERT*, в 12, 13, 61-м кодонах гена *KRAS*, в 12, 13, 61-м кодонах гена *HRAS* и в 61-м кодоне гена *NRAS*, а также транслокаций *RET/PTC1*, *RET/PTC3* и *PAX8/PPARG*. У больных 1-й группы, у которых были обнаружены мутации в гистологическом материале, дополнительно выявляли данные абберрации в соответствующих архивных предметных стеклах с окрашенным цитологическим материалом.

Экстракция ДНК. Выделение ДНК и РНК из парафиновых блоков проводили с помощью набора AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Перед экстракцией ДНК/РНК из цитологического материала на предметном стекле выполняли снятие образца со стекла с помощью одноразового хирургического лезвия с последующим элюированием лизирующим буфером в эпипендорф.

Начальная часть преаналитического этапа включала центрифугирование клеточной взвеси при 13400 об./мин в течение 5 мин с последующим удалением надосадочной жидкости. Далее выделение ДНК и РНК из 2 типов цитологического материала было общим и проводилось с использованием набора

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика пациентов, включенных в исследование

Table 1. Clinico-morphological characteristic of patients included in the study

Характеристика Characteristic	1-я группа Group 1	2-я группа Group 2
Пол, n (%): Gender, n (%): мужской male женский female	43 (30,1) 100 (69,9)	9 (18,2) 36 (81,8)
Средний возраст на момент постановки диагноза (ИКР), лет Median age at diagnosis (IQR), years	45 (36–55)	41 (35–50)
Размер опухоли: Tumor size: среднее значение ± SD, см mean ± SD, cm ≤1 см, n (%) ≤1 cm, n (%) >1 см, n (%) >1 cm, n (%)	2,29 ± 1,48 25 (17,5) 118 (82,5)	2,11 ± 1,21 8 (18,2) 37 (81,8)
Гистологический тип (код ICD-O), n (%): Histological type (ICD-O code), n (%): папиллярная карцинома papillary thyroid carcinoma (8260/3) папиллярная микрокарцинома papillary microcarcinoma (8341/3) фолликулярный вариант папиллярной карциномы follicular variant of papillary thyroid carcinoma (8340/3) минимально инвазивная minimally invasive (8335/3) широкоинвазивная widely invasive (8330/3) инкапсулированная, с сосудистой инвазией encapsulated angioinvasive (8339/3) гюртлеклеточная карцинома hurthle cell carcinoma (8290/3) низкодифференцированная карцинома poorly differentiated thyroid carcinoma (8337/3) фолликулярная аденома follicular adenoma (8330/0) гюртлеклеточная аденома hurthle cell adenoma (8290/0) диффузно-узловой аденоматозный зоб diffuse adenomatous goiter (N/A)	6 (4,2) 3 (2,1) 24 (16,7) 11 (7,7) 4 (2,8) 1 (0,7) 6 (4,2) 1 (0,7) 65 (45,5) 17 (11,9) 5 (3,5)	1 (2,2) 1 (2,2) 9 (20,0) 0 (0) 0 (0) 0 (0) 0 (0) 26 (57,9) 2 (4,4) 6 (13,3)
Стадия pT, n (%): pT stage, n (%): pT1a pT1b pT2 pT3	19 (33,3) 18 (31,6) 17 (29,8) 3 (5,3)	5 (45,5) 5 (45,5) 1 (9,0) 0 (0)
Поражение лимфатических узлов, n (%): Lymph node, n (%): pN0 pN1	54 (94,7) 3 (5,3)	10 (90,9) 1 (9,1)

Экстрагиреоидная инвазия, n (%): Extrathyroidal extension, n (%): нет no да yes	48 (84,2) 9 (15,8)	8 (72,7) 3 (27,3)
Сосудистая инвазия, n (%): Vascular embolism invasion, n (%): нет no да yes	54 (94,7) 3 (5,3)	10 (90,9) 1 (9,1)
Мультифокальность, n (%): Multifocality, n (%): нет no да yes	51 (89,5) 6 (10,5)	7 (63,6) 4 (36,4)

Примечание. ИКР – интерквартильный размах; SD – стандартное отклонение.

Note. IQR – interquartile range; SD – standard deviation.

реагентов «РеалБест экстракция 100» (АО «Вектор-Бест», Россия) согласно инструкции производителя. Оценка количества и качества нуклеиновой кислоты, полученной в ходе экстракции из блоков и цитологических образцов, осуществлялась с помощью спектрофотометра BioDrop UV/VIS (SERVA, Германия).

Детекция aberrаций в исследуемых генах. Определение мутации V600E в гене *BRAF* осуществлялось с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом кривых плавления [11]. Кроме того, для увеличения специфичности и чувствительности реакции была изменена последовательность аллель-специфических праймеров: добавлено искусственное несоответствие в предпоследнем основании. Амплификация в ходе ПЦР была выполнена с использованием набора iTaq Universal SYBR® Green (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Исследование мутаций в промоторном регионе гена *TERT* выполнялось с помощью секвенирования по Сэнгеру. Амплификация промоторного участка, включавшего мутации C228T и C250T, проведена с использованием ранее описанных праймеров [12]. Полимеразная цепная реакция осуществлялась в 20 мкл реакционной смеси, включавшей 10 мкл FailSafe™ PCR 2x PreMix J (Lucigen, США): по 0,5 мкл праймеров и 0,5 мкл полимеразы DreamTaq™ Hot Start (Thermo Fisher Scientific, США). Условия ПЦР были следующими: 1 цикл при 95 °C в течение 5 мин с последующими 37 циклами амплификации (95 °C в течение 45 с, 68 °C в течение 45 с, 72 °C в течение 2 мин) и элонгацией при 72 °C в течение 30 мин. Последовательность амплифицированного участка определялась с использованием смыслового и антисмыслового праймеров

при помощи капиллярного электрофореза в анализаторе ABI3500 (Applied Biosystems, США) при стандартных условиях согласно инструкции производителя.

Определение мутаций в генах семейства *RAS* проводили с помощью набора Thyroid Cancer Mutation Detection (Entrogen, США), а исследование транслокаций *RET/PTC* и *PAX8/PPARG* – с использованием тест-системы Thyroid Cancer Fusion Gene Detection Kit (Entrogen, США).

Статистический анализ. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 8.2 (GraphPad Software Inc., США). Были определены медиана с интерквартильным размахом для возраста пациентов на момент постановки диагноза и среднее значение со стандартным отклонением для размера опухоли. Для сравнения качественных характеристик применяли точный тест Фишера, для выявления диагностической значимости исследуемых генов – метод Уилсона – Брауна. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Исследование гистологического материала (1-я группа)

По результатам молекулярно-генетического тестирования гистологического материала мутации в генах *BRAF*, *TERT*, *KRAS*, *NRAS*, *HRAS* были обнаружены в 35,1 % (20/57) случаев карцином ЩЖ. Распространенность aberrаций в исследуемых генах при доброкачественных новообразованиях составила 4,7 %: 2 случая при фолликулярной и 2 – при гюртлеклеточной аденоме. Транслокаций *RET/PTC* и *PAX8/PPARG* в исследуемых образцах обнаружено не было. У всех пациентов 1-й группы с наличием мутаций в исследуемых генах

аналогичная aberrация была выявлена и в архивном цитологическом материале, что обуславливает 100 % сопоставимость операционного и цитологического образцов, полученных от 1 пациента.

***BRAF*.** Мутация V600E в гене *BRAF* была обнаружена исключительно при карциномах ЩЖ (8,8 % случаев: в 3 случаях папиллярной карциномы, в 1 – фолликулярном варианте папиллярной карциномы и в 1 – низкодифференцированной карциномы ЩЖ) (табл. 2).

***RAS*.** Распространенность мутаций в генах семейства *RAS* при карциномах ЩЖ составила 24,6 % (14/57). При фолликулярном варианте папиллярной карциномы мутации в этих генах наблюдалась в 37,5 % (9/24) случаев, при фолликулярной карциноме – в 25,0 % (4/16), при гюртлеклеточной карциноме – в 16,7 % (1/6). Все выявленные мутации в генах данного семейства затрагивают только 61-й кодон. Наиболее часто встречался aberrантный геном *NRAS*: в 50,0 % (7/14) случаев всех *RAS*-положительных случаев карцином. Менее распространенными были мутации в генах *HRAS* (35,7 %) и *KRAS* (14,3 %).

Также мутации в генах данного семейства были выявлены и при доброкачественных опухолях ЩЖ: в 4,7 % (4/86) случаев. В 2 случаях фолликулярной аденомы обнаружена синонимичная мутация Q61R в гене *HRAS*, в 2 случаях гюртлеклеточной аденомы – мутация Q61R в гене *NRAS* и мутация G12C в гене *KRAS*.

***TERT*.** Распространенность мутаций в промоторном регионе гена *TERT* при раке ЩЖ составила 1,8 % (1/57), при гюртлеклеточной карциноме – 16,7 % (1/6). В ходе секвенирования на момент постановки диагноза была обнаружена мутация C228T в промоторном регионе гена *TERT* у пациентки 40 лет с широкоинвазивной гюртлеклеточной карциномой T2N0M0 (I стадии),

Таблица 2. Распространенность мутаций в генах *BRAF*, семейства *RAS* и *TERT* при разных гистологических типах образований щитовидной железы, %

Table 2. The prevalence of mutations in the *BRAF*, *RAS* and *TERT* genes in different histological types of thyroid tumors, %

Аберрантный ген Aberrant gene	ПК PTC	ФВПК FVPTC	ГКК HCC	ФК FTC	НДК PDTC	ГКА HCA	ФА FA
<i>BRAF</i>	33,3 (3/9)	4,2 (1/24)	0 (0/6)	0 (0/16)	100 (1/1)	0 (0/17)	0 (0/65)
<i>RAS</i>	0 (0/9)	37,5 (9/24)	16,7 (1/6)	25,0 (4/16)	0 (0/1)	11,8 (2/17)	3,1 (2/65)
<i>TERT</i>	0 (0/9)	0 (0/24)	16,7 (1/6)	0 (0/16)	0 (0/1)	0 (0/17)	0 (0/65)
Всего Total	33,3 (3/9)	41,7 (10/24)	33,3 (2/6)	25,0 (4/16)	100 (1/1)	11,8 (2/17)	3,1 (2/65)

Примечание. ПК – папиллярная карцинома; ФВПК – фолликулярный вариант папиллярной карциномы; ГКК – гюртлеклеточная карцинома; ФК – фолликулярная карцинома; НДК – низкодифференцированная карцинома; ГКА – гюртлеклеточная аденома; ФА – фолликулярная аденома.

Note. PTC – papillary thyroid carcinoma; FVPTC – follicular variant papillary thyroid carcinoma; HCC – hurthle cell carcinoma; FTC – follicular thyroid carcinoma; PDTC – poorly differentiated thyroid carcinoma; HCA – hurthle cell adenoma; FA – follicular adenoma.

которая микроскопически характеризовалась очаговой инвазией в капсулу.

Прогностическая значимость. Было показано, что мутации в гене *BRAF* ассоциированы с наличием экстра-тиреоидной инвазии ($p = 0,024$), сосудистой инвазии ($p = 0,018$) и метастазов в лимфатические узлы ($p = 0,018$). При этом не обнаружено взаимосвязи мутаций в генах *RAS* и данных морфологических особенностей ($p > 0,05$). Не продемонстрировано статистически значимой связи между мутациями в генах *BRAF*, семейства *RAS* и клинико-морфологическими особенностями: возрастом, полом, категорией Т, стадией по классификации Tumor, Nodus, Metastasis (TNM), наличием мультифокальности и рецидива заболевания ($p > 0,05$).

Исследование цитологического материала (2-я группа)

Во 2-й группе при использовании диагностической молекулярно-генетической панели, включавшей *BRAF* V600E, *TERT*, *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *RET/PTC1*, *RET/PTC3*, *PAX8/PPARG*, чувствительность и специфичность для пациентов с цитологической категорией IV по классификации Bethesda составили 36,4 % (95 % доверительный интервал (ДИ) 10,9–69,2 %) и 93,9 % (95 % ДИ 79,8–99,3 %) соответственно (табл. 3). Прогностическая ценность положительного результата оказалась равна 66,7 % (95 % ДИ 29,7–90,4 %), а прогностическая ценность отрицательного результата – 81,6 % (95 % ДИ 73,8–87,5 %). Наибольшей специфичностью в отношении карцином ЩЖ для категории IV по классификации Bethesda обладала мутация V600E в гене *BRAF*, при которой данный показатель составил 100 % (95 % ДИ 89,4–100,0 %). В свою очередь, специфичность для мутаций в генах семейства *RAS* была 93,9 % (95 % ДИ 79,8–99,3 %). При этом в цитологическом материале мутаций в промоторном регионе гена *TERT* и транслокаций *RET/PTC1*, *RET/PTC3*, *PAX8/PPARG* обнаружено не было.

Обсуждение

Несмотря на то что гемитиреоидэктомия рекомендуется пациентам с узлами ЩЖ с промежуточным риском злокачественности, более чем в 50 % случаев патология цитологической категории IV по Bethesda представляет собой доброкачественное образование. Это обуславливает необходимость применения более точных диагностических подходов. В российских клинических рекомендациях Минздрава России (2020), а также рекомендациях по ведению пациентов с узлами ЩЖ и дифференцированным раком ЩЖ Американской тиреоидологической ассоциации (American Thyroid Association, 2015) подчеркивается важность молекулярно-генетического тестирования в случаях патологий промежуточных цитологических категорий III–V по Bethesda [7, 13]. В настоящее время не достигнут консенсус в отношении наиболее оптимальной диагностической тест-системы. В ходе многочисленных исследований была изучена диагностическая роль мутации V600E в гене *BRAF* для этих цитологических категорий, однако ограниченная чувствительность данного гена требует одновременного анализа и других молекулярно-генетических маркеров.

В 1-й группе мутация V600E в гене *BRAF* была специфична в отношении карциномы ЩЖ. Распространенность этой мутации при категории IV по Bethesda составила 8,8 %. В метаанализе P. Trimboli и соавт. было показано, что частота встречаемости мутации *BRAF* V600E при промежуточных цитологических категориях составляет 4–6 % (95 % ДИ 1–10,8 %) [14]. Низкая чувствительность данного маркера обусловлена более редкой встречаемостью классического варианта папиллярной карциномы при категории IV по Bethesda [14]. Распространенность мутации V600E в гене *BRAF* при папиллярной карциноме составила 33,3 %, при фолликулярном варианте данной патологии – 4,2 %. Схожие результаты для этих гистологических типов были продемонстрированы в ряде европейских исследований [15].

Таблица 3. Диагностические характеристики молекулярно-генетических маркеров при категории Bethesda IV в 1-й и 2-й группах

Table 3. Diagnostic characteristics of molecular genetic markers in Bethesda IV in the category of Bethesda IV in Groups 1 and 2.

Маркер Marker	Чувствительность (95 % ДИ), % Sensitivity, (95 % CI), %	Специфичность (95 % ДИ), % Specificity, (95 % CI), %	Прогностическая ценность положительного результата (95 % ДИ), % Positive predictive value (95 % CI), %	Прогностическая ценность отрицательного результата (95 % ДИ), % Negative predictive value (95 % CI), %
<i>BRAF</i>	9,1 (0,23–41,3)	100 (89,4–100,0)	100 (51,3–100,0)	76,7 (73,2–79,9)
<i>RAS</i>	27,3 (6,0–61,0)	93,9 (79,8–99,3)	60,0 (22,3–88,7)	79,5 (72,8–84,9)
Комплексная панель Complex panel	36,4 (10,9–69,2)	93,9 (79,8–99,3)	66,7 (29,7–90,4)	81,6 (73,8–87,5)

Примечание. ДИ – доверительный интервал.

Note. CI – confidence interval.

Также в 1-й группе мутация V600E в гене *BRAF* была связана с агрессивными клинико-морфологическими особенностями, такими как наличие метастазов в лимфатических узлах, экстрагиреодная и сосудистая инвазия. Не было показано взаимозависимости данной мутации и наличия рецидива заболевания. Однако, согласно результатам метаанализа Н. G. Vuong и соавт., абберация в гене *BRAF* статистически значимо увеличивала риск рецидива заболевания, но при этом не была связана с более короткой болезнью-специфической выживаемостью [16].

Мутации в генах семейства *RAS* были обнаружены в 24,6 % случаев карциномы ЩЖ в 1-й группе – преимущественно при фолликулярном варианте папиллярной карциномы (37,5 %) и при дифференцированной фолликулярной карциноме (25 %). Распространенность данных мутаций при аденоме составила 4,7 %. Схожие данные были продемонстрированы в ряде зарубежных работ [17]. Не показано взаимосвязи наличия мутации в генах *RAS* и агрессивного клинико-морфологического паттерна, что также согласуется с данными метаанализа Н. G. Vuong и соавт. [16].

Мутации в промоторном регионе гена *TERT* были обнаружены исключительно при карциноме ЩЖ (в 1,8 % случаев). По данным литературы, распространенность этих мутаций составляет 5,5–16,5 % [18]. Более низкая их встречаемость может быть обусловлена использованием менее чувствительного метода детекции, а также популяционными особенностями или недостатками выборки для исследований. Так, В. А. Качко и соавт. в ходе исследования 90 образцов высокодифференцированных карцином не обнаружили мутаций в гене *TERT*, как и транслокаций *RET/PTC1*, *RET/PTC3*

и *PAX8/PPARG*, что, вероятно, также обусловлено популяционными особенностями и малой выборкой [19].

Во 2-й группе чувствительность комплексной молекулярно-генетической панели для промежуточных цитологических категорий составила 36,4 %. При этом распространенность мутаций, включенных в данную панель, в 1-й группе оказалась схожей – 35,1 %. В ходе крупного проспективного исследования чувствительность аналогичной панели для группы пациентов с патологией цитологической категории IV по Bethesda составила около 57 % [20]. Такое различие обусловлено обнаружением транслокаций *RET/PTC1*, *RET/PTC3* и *PAX8/PPARG*. При этом специфичность комплексной панели составила 93,9 %, что нашло отражение в описанном исследовании, в котором значение этого показателя оказалось равным 97 % [20]. Для мутации V600E в гене *BRAF* как отдельного маркера специфичность составила 100 %, для мутаций в генах семейства *RAS* при карциноме ЩЖ – 93,9 %, что незначительно превышает данный статистический показатель в группе с цитологической категорией IV по Bethesda, продемонстрированный в работе Y. Nikiforov и соавт. [19].

Заключение

Мутация V600E в гене *BRAF* и мутации в промоторном регионе гена *TERT* обладают специфичностью в отношении карциномы ЩЖ. Мутация V600E в гене *BRAF* взаимосвязана с агрессивным клинико-морфологическим течением заболевания. Обнаружение мутаций в комплексной молекулярно-генетической панели при наиболее сложной в интерпретации категории IV по классификации Bethesda обуславливает высокую вероятность наличия злокачественного процесса.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Valderrabano P., McIver B. Evaluation and management of indeterminate thyroid nodules: the revolution of risk stratification beyond cytological diagnosis. *Cancer Control* 2017;24(5):1073274817729231–1073274817729231. DOI: 10.1177/1073274817729231.
2. Partyka K.L., Trevino K., Randolph M.L. et al. Risk of malignancy and neoplasia predicted by three molecular testing platforms in indeterminate thyroid nodules on fine-needle aspiration. *Diagn Cytopathol* 2019;47(9):853–62. DOI: 10.1002/dc.24250.
3. Cibas E.S., Ali S.Z. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid* 2017;17(11):1341–6. DOI: 10.1089/thy.2017.0500.
4. Steward D.L., Carty S.E., Sippel R.S. et al. Performance of a multigene genomic classifier in thyroid nodules with indeterminate cytology: a prospective blinded multicenter study. *JAMA Oncol* 2019;5(2):204–12. DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.4616.
5. Ravella L., Lopez J., Descotes F. et al. Cytological features and nuclear scores: diagnostic tools in preoperative fine-needle aspiration of indeterminate thyroid nodules with *RAS* or *BRAF* K601E mutations? *Cytopathology* 2021;32(1):37–44. DOI: 10.1111/cyt.12904.
6. WHO classification of tumours of endocrine organs. Ed. by G. Klöppel, A. Couvelard, R.H. Hruban et al. Lyon, Fr World Heal Organ, 2017.
7. Haugen B.R., Alexander E.K., Bible K.C. et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: the American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26(1):1–133. DOI: 10.1089/thy.2015.0020.
8. Bardet S., Goardon N., Lequesne J. et al. Diagnostic and prognostic value of a 7-panel mutation testing in thyroid nodules with indeterminate cytology: the SWEETMAC study. *Endocrine* 2021;71(2):407–17. DOI: 10.1007/s12020-020-02411-4.
9. Nikiforov Y.E., Buddinger P.W., Thompson L.D. Diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid: a comprehensive guide for practicing thyroid pathology. 3rd edn. 2020.
10. Penna G.C., Vaisman F., Vaisman M. et al. Molecular markers involved in tumorigenesis of thyroid carcinoma: focus on aggressive histotypes. *Cytogenet Genome Res* 2016;

- 150(3–4):194–207.
DOI: 10.1159/000456576.
11. Jarry A., Masson D., Cassagnau E. et al. Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the *BRAF* mutation V600E. *Mol Cell Probes* 2004;18(5):349–52.
DOI: 10.1016/j.mcp.2004.05.004.
 12. Liu T., Brown T.C., Juhlin C.C. et al. The activating *TERT* promoter mutation C228T is recurrent in subsets of adrenal tumors. *Endocr Relat Cancer* 2014;21(3):427–34. DOI: 10.1530/ERC-14-0016.
 13. Бельцевич Д.Г., Мудунов А.М., Ванушко В.Э. и др. Дифференцированный рак щитовидной железы. Современная онкология 2020;22(4):30–44.
DOI: 10.26442/18151434.2020.4.200507. [Bel'tsevich D.G., Mudunov A.M., Vanushko V.E. et al. Differentiated thyroid cancer. *Sovremennaya onkologiya = Journal of Modern Oncology* 2020;22(4):30–44. DOI: 10.26442/18151434.2020.4.200507 (In Russ.)].
 14. Trimboli P., Treglia G., Condorelli E. et al. *BRAF*-mutated carcinomas among thyroid nodules with prior indeterminate FNA report: a systematic review and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2016; 84(3):315–20. DOI: 10.1111/cen.12806.
 15. Pongsapich W., Chongkolwatana C., Pongvarin N. et al. *BRAF* mutation in cytologically indeterminate thyroid nodules: after reclassification of a variant thyroid carcinoma. *Onco Targets Ther* 2019;12:1465–73.
DOI: 10.2147/OT.TS190001.
 16. Vuong H.G., Duong U.N.P., Altibi A.M.A. et al. A meta-analysis of prognostic roles of molecular markers in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Connect* 2017;6(3):R8–17.
DOI: 10.1530/EC-17-0010.
 17. Prete A., Borges de Souza P., Censi S. et al. Update on fundamental mechanisms of thyroid cancer. *Front Endocrinol* 2020;11:102.
DOI: 10.3389/fendo.2020.00102.
 18. Decaussin-Petrucci M., Descotes F., Depaeppe L. et al. Molecular testing of *BRAF*, *RAS* and *TERT* on thyroid FNAs with indeterminate cytology improves diagnostic accuracy. *Cytopathology* 2017;28(6):482–7.
DOI: 10.1111/cyt.12493.
 19. Качко В.А., Ванушко В.Э., Платонова Н.М. и др. Возможности использования свободно циркулирующей ДНК плазмы крови в дооперационной диагностике при новообразованиях щитовидной железы. *Проблемы эндокринологии* 2019;65(6):400–7. [Kachko V.A., Vanushko V.E., Platonova N.M. et al. The possibility of using freely circulating DNA blood plasma in preoperative diagnosis of thyroid tumors. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*. 2019;65(6):400–7. (In Russ.)]. DOI: 10.14341/probl11311).
 20. Nikiforov Y.E., Ohori N.P., Hodak S.P., et al. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(11):3390–7.
DOI: 10.1210/jc.2011-1469.

Вклад авторов

А.А. Мусаелян: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, оформление иллюстративного материала, статистический анализ, написание текста статьи;
С.В. Лапин: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;
В.Д. Назаров: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных;
С.Л. Воробьев, Е.С. Козорезова: обзор публикаций по теме статьи, сбор данных, анализ полученных данных, научное редактирование статьи;
С.В. Орлов: идея и разработка дизайна, научное редактирование текста, руководство исследованием.

Authors' contribution

A.A. Musaelyan: development of research design, review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained, design of illustrative material, statistical analysis, article writing;
S.V. Lapin: development of research design, review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained;
V.D. Nazarov: research design development, analysis of the data obtained;
S.L. Vorobyev, E.S. Kozorezova: review of publications on the topic of the article, data collection, analysis of the data obtained, scientific editing of the article;
S.V. Orlov: idea and design development, scientific text editing, research management.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.А. Мусаелян / A.A. Musaelyan: <https://orcid.org/0000-0002-7570-2256>

С.В. Лапин / S.V. Lapin: <https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>

В.Д. Назаров / V.D. Nazarov: <https://orcid.org/0000-0002-9354-8790>

С.В. Орлов / S.V. Orlov: <https://orcid.org/0000-0001-6080-8042>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики и прав пациентов. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study was approved by the local Ethics Committee of the I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 19.10.2021. **Принята к публикации:** 01.11.2021.

Article submitted: 19.10.2021. **Accepted for publication:** 01.11.2021.