

# Молекулярно-генетическое типирование в практике исследований ТАБ опухолей щитовидной железы

**Команда исследователей: Sergei E. Titov**<sup>1,2,3</sup>, **Evgeniya S. Kozorezova**<sup>4,5</sup>, **Pavel S. Demenkov**<sup>3,6</sup>, **Yulia A. Veryaskina**<sup>1,6</sup>, **Irina V. Kuznetsova**<sup>4</sup>, **Sergey L. Vorobyev**<sup>4</sup>, **Roman A. Chernikov**<sup>7</sup>, **Ilya V. Sleptsov**<sup>7</sup>, **Nataliya I. Timofeeva**<sup>7</sup>, **Mikhail K. Ivanov**<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology, Novosibirsk, Russia.

<sup>2</sup> AO Vector-Best, Novosibirsk, Russia.

<sup>3</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia.

<sup>4</sup> National Center of Clinical Morphological Diagnostics, Saint Petersburg, Russia.

<sup>5</sup> Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Novosibirsk, Russia.

<sup>6</sup> Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia.

<sup>7</sup> Saint Petersburg State University N.I. Progov Clinic of High Medical Technologies, Saint Petersburg, Russia.

Козорезова Е.С., врач-цитопатолог, МИАС,  
заместитель директора по развитию.  
Национальный центр клинической  
морфологической диагностики,  
Санкт-Петербург

## Новообразования щитовидной железы (ЩЖ) Рак щитовидной железы (РЩЖ) Эпидемиология

- Узловой зоб – более 80 %
- Фолликулярные неоплазии – до 10-15 %
- Удельный вес РЩЖ в группе ЗНО в РФ - 2 - 4,5% (2017 - 2019 гг.)
- В РФ по темпу прироста РЩЖ занимает 1 место среди ЗНО (2018 г)
- Заболеваемость/выявляемость РЩЖ растет по всему миру
- Уровень смертности от РЩЖ – не меняется в течение 30 лет

## Диагностика узловых образований ЩЖ

- Пальпация, клинический осмотр
- УЗИ (с оценкой рисков по TIRADS)
- **ЦИ материала ТАБ узлов ЩЖ + The Bethesda (TBSRTC), 2017 = «золотой стандарт» дооперационной диагностики**
- Гистологическое исследование операционного материала ЩЖ (WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs, 2017)



## Недостатки цитологического метода для группы IV по TBSRTC, 2017 характерны

- нет достоверных критериев злокачественности
- невозможно распознать некоторые гистотипы папиллярной карциномы
- субъективная оценка цитологического материала
- невысокая воспроизводимость результатов
- зависимость результата исследования от уровня подготовки и навыков хирурга/УЗИ-специалиста



## The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology (2017)

Диагностическая категория	Риск злокачественности (ROM)	Стандартная тактика ведения
Неинформативный материал	5–10%	Повторная ТАБ под контролем УЗИ
Доброкачественный процесс	0–3%	Клинический и УЗИ-контроль в динамике
Атипия неясного значения	10–30%	Повторная ТАБ под контролем УЗИ, <b>молекулярно-генетическое тестирование</b> или гемитиреоидэктомия
Фолликулярная опухоль(ФО)/подозрение на ФО	25–40%	<b>Молекулярно-генетическое тестирование</b> или гемитиреоидэктомия
Подозрение на злокачественное новообразование ЩЖ	50–75%	Гемитиреоидэктомия или тиреоидэктомия
Злокачественное новообразование ЩЖ	97–99%	Гемитиреоидэктомия или тиреоидэктомия

5

# Нормативная база

To be or not to be?

ESMO, 2020

## CLINICAL PRACTICE GUIDELINES

### WHO classification for differentiated follicular-derived thyroid carcinomas

Morphological parameters and molecular markers

Tumour type	Morphology	Molecular markers
NIFTP	Encapsulated, clear nuclei, no papillae	RAS, BRAF K601E
Classical papillary carcinoma	Papillae and clear nuclei	BRAF V600E, RET/PTC fus, NTRK fus, ALK fus, 1q amp
Follicular papillary carcinoma	Follicles and clear nuclei	BRAF K601E, RAS, PAX8/PPAR $\gamma$ , EIF1AX, THADA fus, 22q del
Tall, columnar, solid, hobnail papillary carcinoma	Special structural and cell features	BRAF V600E, 1q amp, TERT promoter, TP53, PIK3CA, CTNNB1
Follicular carcinoma	Capsular invasion (MI), vascular invasion > 4 blood vessels (angioinvasive), extrathyroidal invasion (WI)	RAS, PAX8/PPAR $\gamma$ , PTEN, PIK3CA, TSHR, TERT promoter, CNA

### Staging and risk assessment

Risk assessed using the ATA system: low (ERR  $\leq$  5%), intermediate (ERR 6–20%) and high (ERR > 20%)

Poorly differentiated carcinoma	Irregular, convoluted nuclei	hystone methyltransferases, SWI/SNF chromatin remodelling complex
---------------------------------	------------------------------	---



© 2020 ESMO. All rights reserved. esmo.org/Guidelines/Endocrine-and-Neuroendocrine-Cancers/Thyroid-cancer

## Ассоциация Онкологов России, 2020

*Комментарии: При III категории (атипия неясного значения) необходима повторная пункция, по результатам которой уточняются степень риска злокачественности узла и показания к оперативному лечению. Показания к оперативному лечению при III и IV категориях цитологического заключения могут обсуждаться в индивидуальном порядке с пациентом в рамках применения молекулярно-генетических панелей, дающих дополнительную информацию о риске ВДРЩЖ. Тем не менее в связи с крайне ограниченным опытом таких исследований в России группа экспертов на момент публикации этого документа не высказывает мнения ни «за», ни «против» [1, 6]*

Утверждены:  
Общероссийский национальный союз  
"Ассоциация онкологов России"

Одобрены:  
Научный совет Министерства  
Здравоохранения Российской  
Федерации

«26» декабря 2019г.

заключения III, IV и V типов по Bethesda Thyroid Classification, 2009–2017  
рекомендовано молекулярно-генетическое исследование мутаций в гене  
BRAF и иных мутаций (RAS, RET/PTC, PAX8/PPAR- $\gamma$ , TERT и т. д.) [21–25].

Уровень убедительности рекомендаций – В (уровень достоверности  
доказательств – 3)



Национальный Центр  
Клинической  
Морфологической  
Диагностики

# Молекулярно-генетические исследования

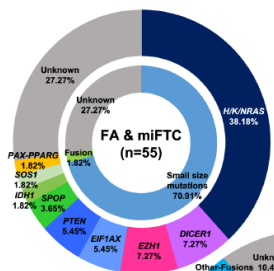
## ДА/НЕТ?

9

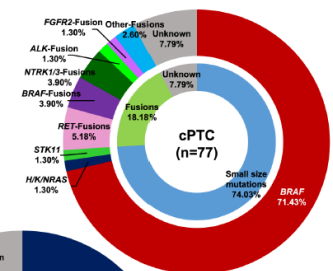
С одной стороны мы уже много знаем, но

С другой – **UNKNOWN**

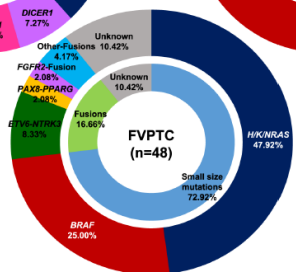
27%



~ 8%



~ 10%



RESEARCH ARTICLE  
**Comprehensive Analysis of the Transcriptional and Mutational Landscape of Follicular and Papillary Thyroid Cancers**

Seong-Kwon Yoo<sup>1,2\*</sup>, Seungbok Lee<sup>3\*</sup>, Su-jin Kim<sup>4,5\*</sup>, Hyoun-Gun Jee<sup>6\*</sup>, Byoung-Ae Kim<sup>7\*</sup>, Myoung-Chul<sup>8\*</sup>, Young-Shik Sung<sup>9\*</sup>, Sun-Wook Choi<sup>10\*</sup>, Jun-Kyung Won<sup>11\*</sup>, Jung-Kwon Shin<sup>12\*</sup>, Do-Joon Park<sup>13\*</sup>, Jong<sup>14\*</sup>, Kim<sup>15\*</sup>, Kyu Eun Lee<sup>3,4,6\*</sup>, Young-Joo Park<sup>17\*</sup>, Jeong-Sun Park<sup>18,19\*</sup>

<sup>1</sup> Genomic Medicine Institute, Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea, <sup>2</sup> Interdisciplinary Program in Bioinformatics, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea, <sup>3</sup> Department of Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea, <sup>4</sup> Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea, <sup>5</sup> Research Institute, National Medical Center, Seoul, Republic of Korea, <sup>6</sup> Department of Biomedical Sciences, Seoul National University Graduate School, Seoul, Republic of Korea, <sup>7</sup> Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea, <sup>8</sup> Department of Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea, <sup>9</sup> Macrogen Inc., Seoul, Republic of Korea, <sup>10</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea



10

## Молекулярно-генетические исследования узловых образований ЩЖ

Основаны на:

- выявлении соматических мутаций (ThyroSeq®, CBLPath)
- анализе профилей экспрессии множества белок-кодирующих генов (Afirma® Gene Expression Classifier и Genomic Sequencing Classifier, Veracyte)
- микроРНК-профилировании (Rosetta GXReveal, Rosetta Genomics)
- комбинации анализа соматических мутаций и микроРНК (ThyGenX/ThyraMIR, Interpace diagnostics)

11

## Существующие решения

- Система Afirma Genomic Sequencing Classifier (GSC) включает 8 компонентов:
  - ансамблевую модель (подозрение на рак/доброкачественный образец)
  - модуль паращитовидной железы
  - модуль медуллярного рака
  - модуль выявления мутации BRAFV600E (PTC)
  - модули обнаружения транслокаций RET/PTC1 и RET/PTC3 (PTC)
  - индекс фолликулярного содержимого (определяет образцы с низким содержанием клеток ЩЖ)
  - индекс клеток Hurthle и индекс неоплазии из клеток Hurthle
- ThyroSeq v3 состоит из следующих компонентов:
  - выявление клеток паращитовидной железы
  - выявление С-клеток (МТС)
  - выявление клеток не щитовидной железы
  - геномный классификатор (отрицательный/положительный)

## Role of Ancillary Techniques in Thyroid Cytology Specimens

**Table 2.** Comparison of quality control, NIFTP recognition, and prognostic markers for ThyroSeq v3, ThyGeNEXT/ThyraMIR, and Afirma GSC

Quality control parameter	ThyroSeq v3	ThyGeNEXT/ThyraMIR	Afirma GSC
Assessment of thyroid follicular cell content	Yes	Yes	Yes
Marker for parathyroid	Yes	Yes	Yes
Marker for medullary thyroid carcinoma	Yes	Yes	Yes
How NIFTPs are potentially flagged	RAS and RAS-like alterations	RAS and RAS-like alterations	GSC-S (negative for malignancy)
Markers potentially associated with clinically aggressive tumors	TERT promoter mutations, TP53 mutations	TERT promoter mutations	TP53 mutations (Xpression Atlas)

GSC, Gene Sequencing Classifier; GSC-S, "suspicious" by Afirma Gene Sequencing Classifier; NIFTP, noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features.

Цель МГИ – разделить узлы щитовидной железы на «добро» и «зло», но...

Хотя современные молекулярные тесты **не** направлены на типирование опухолей, считается важным чтобы они могли точно отличать

- узловые поражения ЩЖ (добро/зло)
- медуллярный рак
- поражения паращитовидной железы


## Выявление рака в группах Bethesda III и IV разными тестами (Titov S., 2020)

Тест	Маркеры	Чувствительность, %	Специфичность, %	ПЦПР*, %	ПЦОР*, %	Тестовая выборка
Afirma GEC	Экспрессия 167 генов	95,5	22	29	94	N=1617 (метаанализ)
Afirma GSC + Xpression Atlas	Экспрессия 511 генов, 761 мутация, 130 транслокаций	91	68	49	96	N=190
ThyGenX/ThyraMIR	Мутации 5 генов, 3 транслокации, экспрессия 10 миРНК	89	85	66	96	N=109
Thyroseq v2	Мутации 14 генов, 42 транслокации	84	78	56	94	N=459 (метаанализ)
Thyroseq v3	Мутации 112 генов, >150 транслокаций	94	82	64	98	N=257
Rosetta Reveal	Экспрессия 24 миРНК	85	72	50	94	N=189
mir-THyPe	Экспрессия 11 миРНК	94,6	81	62	98	N=95
ThyroidPrint	Экспрессия 10 генов	91	87	70	97	N=270
Тироид-ИНФО	Экспрессия 1 гена и 3 миРНК, мутация гена BRAF, содержание мтДНК	89	93	81	96	N=122

\* При встречаемости рака в группах Bethesda III+IV - 25%

15

## Собственное исследование



[Advanced](#)
[User Guide](#)


[Cancers \(Basel\)](#). 2021 Jan 11;13(2):237. doi: 10.3390/cancers13020237.


**Preoperative Typing of Thyroid and Parathyroid Tumors with a Combined Molecular Classifier**

Sergei E Titov <sup>1 2 3</sup>, Evgeniya S Kozorezova <sup>4 5</sup>, Pavel S Demenkov <sup>3 6</sup>, Yulia A Veryaskina <sup>1 6</sup>,  
 Irina V Kuznetsova <sup>4</sup>, Sergey L Vorobyev <sup>4</sup>, Roman A Chernikov <sup>4</sup>, Ilya V Slepstov <sup>7</sup>,  
 Nataliya I Timofeeva <sup>4</sup>, Mikhail K Ivanov <sup>1 2</sup>

Affiliations [+ expand](#)

PMID: 33440616 PMCID: PMC7827881 DOI: 10.3390/cancers13020237

FULL TEXT LINKS  
[FULL TEXT OPEN ACCESS](#) 

 [FREE Full text](#)

ACTIONS

16

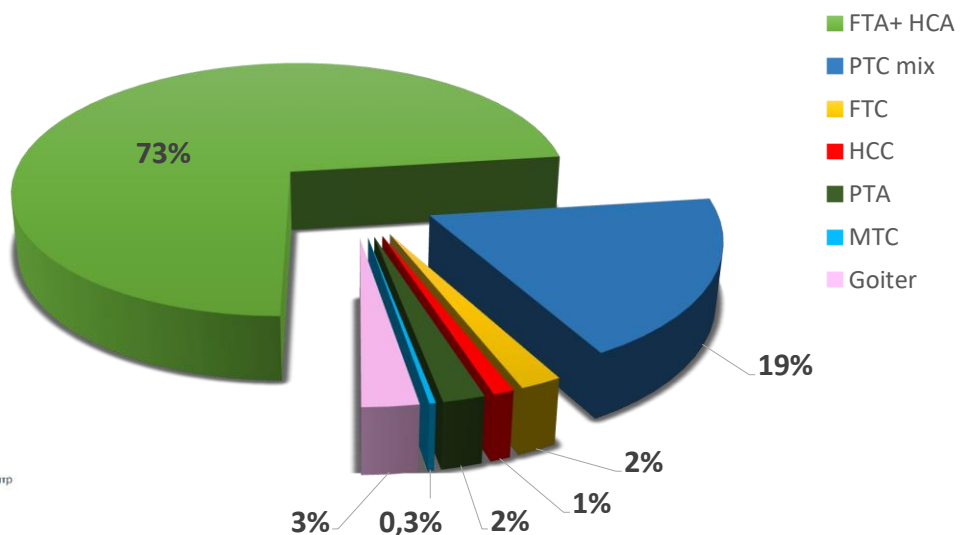


## Анализ данных ЦИ ТАБ образований ЩЖ (НЦКМД, Санкт-Петербург, 2019 год)

2019 год	Узлы ЩЖ (ТМ), n	%	Количество пациентов	%
узел ЩЖ, из них:	<b>40101</b>		<b>28542</b>	
женщины	35396	88,2	25044	87,7
мужчины	4340	10,8	3198	11,3
дети (от 0 до 18 лет)	365	0,91	304	1,0
Bethesda I	2451	6,11	1788	6,26
Bethesda II	29652	73,94	20713	72,57
Bethesda III	3	0,01	3	0,01
Bethesda IV	<b>6375</b>	<b>15,90</b>	<b>4609</b>	<b>16,15</b>
Bethesda V	322	0,80	311	1,09
Bethesda VI	1298	3,24	1118	3,91

17

## Follow up (группа Bethesda IV) Данные НЦКМД, n= 1389 случаев (2019 г.)



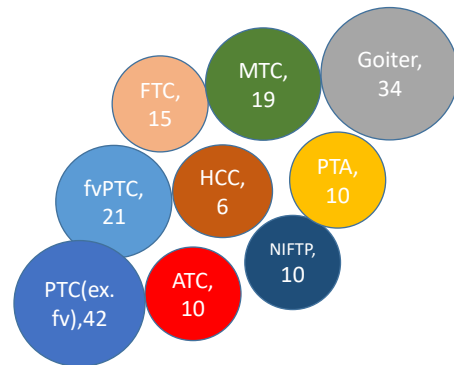
18

## Основная группа и группы сравнения (n=278)

- Основная группа



- Группы сравнения



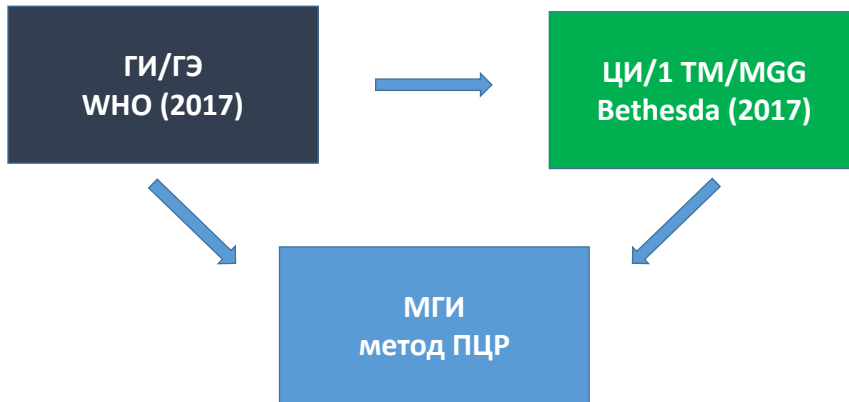
## Данные по пациентам

	No. of samples	Sex, No. (%) of female patients	Age of patients, mean (range)
FTA	111	84 (75,7)	50 (18-73)
FTC	21	15 (71,4)	46 (28-72)
FV-PTC	22	19 (86,3)	53 (18-71)
TCV-PTC	8	5 (62,5)	53 (41-69)
SV-PTC	9	7 (77,7)	37 (18-57)
cPTC	24	19 (79,2)	44 (20-68)
NIFTP	10	7 (70)	50 (29-70)
MTC	19	16 (84,2)	54 (23-80)
ATC	10	8 (80)	70 (50-85)
PTA	10	10 (100)	51 (36-66)
Goiter	34	28 (82,3)	52 (23-72)
<b>All samples</b>	<b>278</b>	<b>218 (78,4)</b>	<b>51 (18-85)</b>

М. – 60 (21,6% случаев), средний возраст 49 (18-73) лет,

Ж – 218 (78,4% случаев), средний возраст 51 (18-85) год.

## Материалы и методы

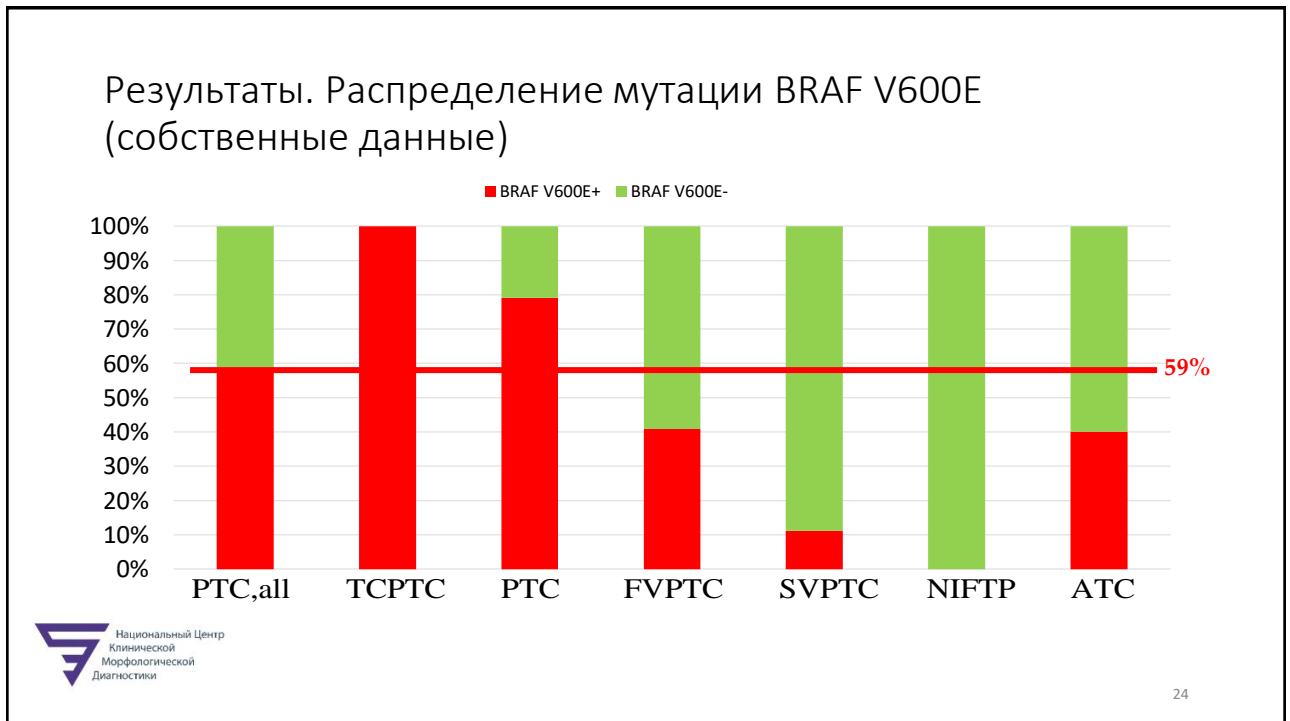
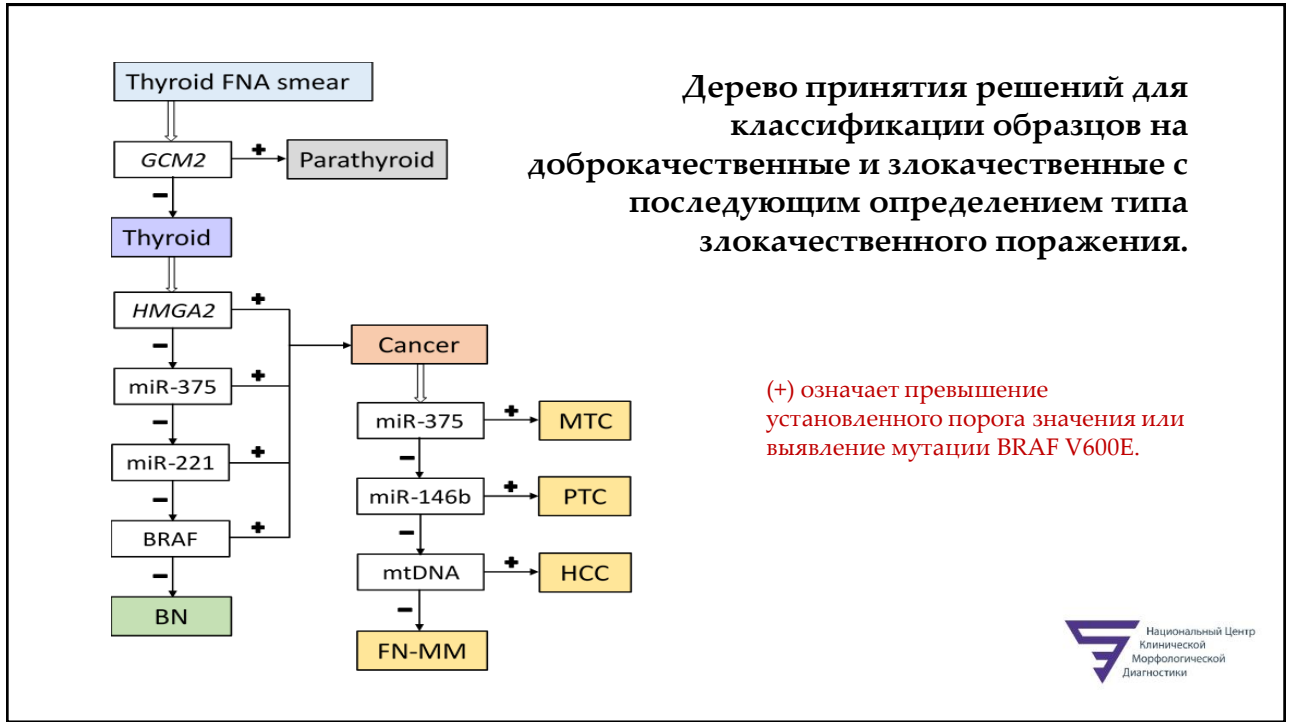


## Диагностический тест

- анализ экспрессии мРНК онкогена *HMGA2* и гена *GCM2*
- 3 разных миРНК: -146b, -221, -375
- соотношение митохондриальной и ядерной ДНК
- определение мутации BRAF V600E
- определение мутаций RAS, RET/PTC1, RET/PTC3, PAX8/PPAR-γ\*\*

\* Анализ данных NIFTP и АТС не вошел в текущее исследование

\*\* Данные не вошли в текущее исследование



## Результаты

- ↑ уровня экспрессии *HMGA2* характерно для РТС, FTC, NIFTP\*, но не характерно для МТС, НСС и РТА
- ↑ уровня экспрессии *HMGA2* при АТС в 80%
- детекция мРНК гена *GCM2* только в образцах РТА (100%)
- ↑↑↑ отношение мтДНК/ядНК в НСС (среднее для НСС – 17940)
- ↑↑ содержание миРНК-146b при РТС, ↑ при АТС и NIFTP
- ↑ содержание миРНК-221 при НСС
- ↑↑↑ содержание миРНК-375 при медуллярном раке

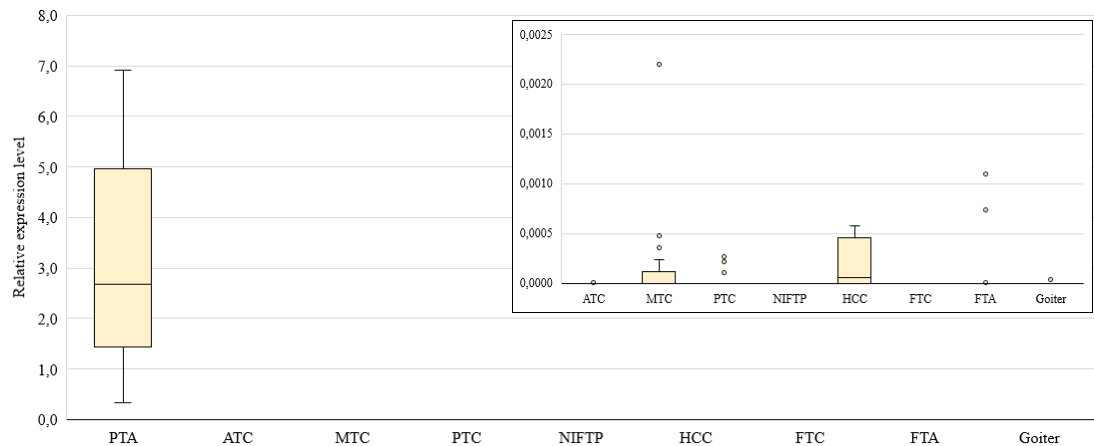
## Результаты

- ↑ уровня экспрессии *HMGA2* среди FTA в 8 (7.2%)
- в группе FTA 100 из 111 образцов типированы, как FTA (90.1%)
- 100% РТА дифференцированы, исключены из группы FN-MM
- **9.9% FTA** при МГИ отнесены в «злокачественную» группу **FN-MM**

### Стратификация образцов ЩЖ:

МТС (100%); РТС (93.6%), НСС (100%); FTC (66.7%); goiters (97%)

## Экспрессия мРНК гена GCM2 в опухолях паращитовидных желез, щитовидной железы и неопухолевых процессах



## Диагностические характеристики МГ классификатора при типировании злокачественных опухолей ЩЖ (доверительный интервал 95%)

	Cancer, n=103	MTC, n=19	PTC, n=63	FTC, n=15	HCC, n=6
Чувствительность, %	<b>91.7</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>94.4</b>	<b>99.6</b>
Специфичность, %	<b>93.2</b>	<b>100.0</b>	<b>93.6</b>	<b>66.7</b>	<b>100.0</b>
Точность, %	<b>92.3</b>	<b>100.0</b>	<b>98.4</b>	<b>92.7</b>	<b>99.6</b>
PPV, %	<b>88.9</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>43.5</b>	<b>85.7</b>
NPV, %	<b>95.0</b>	<b>100.0</b>	<b>97.9</b>	<b>97.8</b>	<b>100.0</b>

## Диагностические характеристики МГ классификатора при типировании злокачественных опухолей ЩЖ (доверительный интервал 95%)

	Cancer, n=103	MTC, n=19	PTC, n=63	FTC, n=15	HCC, n=6
Чувствительность, %	91.7	100.0	100.0	94.4	99.6
Специфичность, %	93.2	100.0	93.6	66.7	100.0
Точность, %	92.3	100.0	98.4	92.7	99.6
PPV, %	88.9	100.0	100.0	43.5	85.7
NPV, %	95.0	100.0	97.9	97.8	100.0

## Ограничения метода

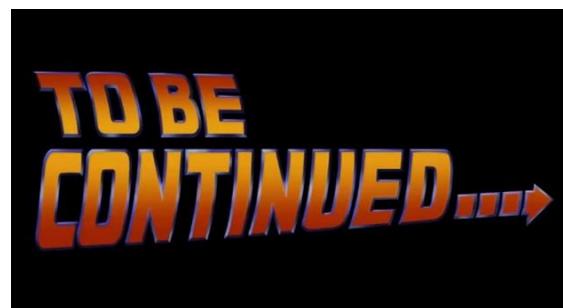
- Экспрессия *HMGA2* бывает повышена и в индолентных опухолях типа NIFTP\*
- Не вполне ясен профиль молекулярных маркеров для SVPTC
- NIFTP\* и FTC – самый высокий % расхождения МГИ и данных гистологии
  - 40% образцов NIFTP по данным МГИ «злокачественные»
  - специфичность выявления FTC 66.7% vs 93-100% для других карцином
  - 33 % FTC попали в доброкачественную группу (4 из 5 неправильно определенных – это miFTC)
- Нужны дополнительные маркеры для диагностики PDTC, ATC

\* требует уточнений



31

## Молекулярно-генетические исследования Да/Нет ?



32



Спасибо за внимание!