

ЖИДКОСТНАЯ БИОПСИЯ ПЛАЗМЫ С ВЫЯВЛЕНИЕМ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ОПУХОЛЕВОЙ ДНК КАК СПОСОБ МАЛОИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Т.И. Рахматуллин¹, М. Джайн¹, Л.М. Самоходская¹, В.А. Животов²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

² Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова, Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Рак щитовидной железы занимает 9-е место по распространённости среди всего населения. Пятилетняя выживаемость при этом заболевании составляет более 98%. Однако у части пациентов наблюдаются случаи быстро прогрессирующего, стойкого к лечению рака, которые не могут быть выявлены на ранней стадии рутинными методами. Одним из методов решения данной проблемы является использование жидкостной биопсии. Эта процедура заключается в анализе опухолевых дериватов (в частности, циркулирующей ДНК) в биологических жидкостях организма. Для выявления опухолевого компонента применяют анализ hotspot-мутаций и паттернов эпигенетической регуляции, характерных для определённого новообразования. Известно, что повышение уровня циркулирующей опухолевой ДНК в плазме крови может на несколько месяцев опережать диагностику по данным МРТ пациентов, а также превосходить конвенциональные биомаркеры, такие как кальцитонин, при медуллярной карциноме щитовидной железы. Кроме того, имеется возможность малоинвазивного установления генотипа опухоли для подбора оптимальной химиотерапии. В данном обзоре обсуждаются современные достижения в области анализа циркулирующей опухолевой ДНК при таких онкологических заболеваниях щитовидной железы, как папиллярная, фолликулярная, медуллярная и анапластическая карциномы.

Ключевые слова: циркулирующая опухолевая ДНК; жидкостная биопсия; рак щитовидной железы; скрининг; оценка ответа на химиотерапию.

Для цитирования:

Рахматуллин Т.И., Джайн М., Самоходская Л.М., Животов В.А. Жидкостная биопсия плазмы с выявлением циркулирующей опухолевой ДНК как способ малоинвазивной диагностики рака щитовидной железы. *Клиническая практика*. 2023;14(3):69–79. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract321281>

Поступила 28.03.2023

Принята 31.07.2023

Опубликована 29.09.2023

ВВЕДЕНИЕ

В 2020 году рак щитовидной железы (ЩЖ) занимал 9-е место по распространённости среди населения планеты [1]. Основу этого заболевания составляют малоинвазивные формы — папиллярная (ПК) и фолликулярная (ФК) карциномы ЩЖ, 5-летняя выживаемость при которых превышает 98% [2, 3]. В то же время у некоторых пациентов наблюдаются случаи устойчивого к терапии или рецидивирующего заболевания, например анапластическая (АК) и медуллярная (МК) карциномы, которые ответственны более чем за половину смертей от всех онкологических заболеваний ЩЖ [4, 5]. С 1974 по 2013 год заболеваемость ПК и ФК росла в среднем на 4,4 и 0,6% в год (а в Южной Корее в период между 1999 и 2016 годами на фоне более частого обследования пациентов — на 11,7–16%), однако заболе-

ваемость АК и ФК за период с 1972 по 2016 год не претерпела значительных изменений [6, 7].

В настоящее время основными методами диагностики рака ЩЖ являются ультразвуковое исследование узлов и метастазов, тонкоигольная аспирационная биопсия, а также анализ сывороточных маркеров (тиреоглобулина, кальцитонина) [8]. Однако стоит отметить, что данные подходы не обладают достаточной чувствительностью для ранней диагностики высокоинвазивных и наиболее опасных опухолей ЩЖ [9–14]. Их выявление происходит на довольно позднем этапе, что и обуславливает высокую смертность, ассоциированную с ними [4, 5, 15]. Именно поэтому необходима разработка новых подходов к диагностике этих заболеваний на ранних стадиях.

Одним из наиболее перспективных методов решения данной проблемы является использование

LIQUID BIOPSY AS A METHOD FOR MINIMALLY INVASIVE DIAGNOSIS OF THYROID CANCER

T.I. Rakhmatullin¹, M. Jain¹, L.M. Samokhodskaya¹, V.A. Zhivotov²

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

² National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Thyroid cancer is the 9th most common cancer in the world. The five-year survival rate for this disease is over 98%. However, in some patients there are cases of rapidly progressive treatment-resistant cancer that cannot be differed from poor-invasive cancer by routine methods. Liquid biopsy could be one of the methods to solve this problem. This procedure consists in the analysis of tumor derivatives (in particular, circulating DNA) in body fluids. The analysis of “hotspot” mutations and patterns of epigenetic regulation, which are usual for neoplasms with a certain genotype, is used to identify the tumor component in the total mass of circulating DNA. The increase of circulating tumor DNA in the plasma is observed several months ahead of the characteristic signs at MR images of patients, and also surpasses conventional biomarkers such as calcitonin in medullary thyroid carcinoma. In addition, a possibility of minimally invasive determination of the tumor genotype by analyzing circulating DNA is important to select the optimal chemotherapy. This review discusses the current advances in the analysis of circulating tumor DNA in thyroid cancers such as papillary, follicular, medullary, and anaplastic carcinomas.

Keywords: cell-free nucleic acids; liquid biopsy; thyroid neoplasms.

For citation:

Rakhmatullin TI, Jain M, Samokhodskaya LM, Zhivotov VA. Liquid Biopsy as a Method for Minimally Invasive Diagnosis of Thyroid Cancer. *Journal of Clinical Practice*. 2023;14(3):69–79. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract321281>

Submitted 28.03.2023

Revised 31.07.2023

Published 29.09.2023

жидкостной биопсии — технологии, позволяющей анализировать содержащиеся в плазме клеточные дериваты. К таким относятся свободные нуклеиновые кислоты, внеклеточные везикулы, циркулирующие опухолевые клетки и т.д. [16]. Среди них фрагменты циркулирующей ДНК (цДНК) представляются наиболее стабильным субстратом для исследования и диагностики рака [17].

ЦИРКУЛИРУЮЩАЯ ДНК

Термин «циркулирующие нуклеиновые кислоты» включает в себя как ядерный, так и митохондриальный компонент ДНК, а также некоторые разновидности РНК. Бесклеточные фрагменты цДНК обычно обладают размером около 135–240 пар оснований, что соответствует длине нуклеосомы [18].

Опухолевые клетки и их окружение являются источником большого количества ядерной цДНК [19, 20]. Долгое время считалось, что основной причиной тому являются апоптоз и некроз клеток опухоли [21, 22]. Действительно, вокруг опухоли формируется гипоксическое микроокружение с пониженным рН, что приводит к гибели клеток: это явление названо эффектом Варбурга [23]. Однако такие условия несут больше вреда для нормальных клеток, поскольку

у них нет эффективного способа борьбы с гипоксией и ацидозом в отличие от опухолевых клеток [24–26].

Именно генетический материал неопухолевых (в особенности имеющих гемопозитическое происхождение) клеток составляет основу общей цДНК при онкологических заболеваниях [27, 28]. Однако увеличение концентрации общей цДНК не является признаком определённого онкологического процесса. Более того, её уровень может статистически не отличаться у пациентов с раком ЩЖ и здоровых людей [29]. Это может объясняться индивидуальными особенностями в скорости деградации цДНК в плазме и её клиренсе печенью и почками [30, 31]. С другой стороны, даже у людей без онкологических заболеваний может происходить увеличение количества цДНК вследствие различных причин: травм, ожогов, воспаления, сепсиса и даже физической нагрузки [32, 33]. По нашему мнению, это делает невозможной диагностику рака лишь на основании анализа общего уровня цДНК, хотя допускает его использование в качестве вспомогательного маркера.

Именно по вышеназванным причинам жидкостная биопсия подразумевает прицельный анализ опухолевого компонента цДНК. Для этого производят исследование так называемых hotspot-мута-

ций, т.е. ключевых, лежащих в основе разных видов рака и характерных для них. Эти альтерации включают в себя как точечные мутации, так и геномные перестройки, например, изменение количества определённых генов или их слияние между собой. Кроме того, для различения нормальной и опухолевой цДНК можно использовать анализ паттернов эпигенетической регуляции, например, метилирование [34]. Анализ мутантных форм цДНК вместо общей цДНК в плазме позволяет гораздо точнее отслеживать течение опухолевого процесса и судить о происхождении, состоянии опухоли и динамике её развития или регрессии [35, 36].

ЖИДКОСТНАЯ БИОПСИЯ ПЛАЗМЫ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОМ РАКЕ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Дифференцированный рак составляет около 95% новообразований ЩЖ [2]. Он представлен папиллярной и фолликулярной карциномами ЩЖ, пятилетняя выживаемость при которых равна примерно 98% [3]. Несмотря на то, что современные методы диагностики позволяют успешно выявлять этот тип рака, зачастую окончательная верификация диагноза производится уже после частичной или тотальной резекции органа. Так, например, частота доброкачественных новообразований среди пациентов, перенёсших тиреоидэктомию по подозрению на наличие злокачественной опухоли ЩЖ, составляет около 70% для новообразований III и VI категорий по классификации Bethesda [37, 38]. При этом известно, что тотальная или частичная резекция ЩЖ оказывает серьёзное влияние на состояние человека, вызывая у него усталость, нарушения сна, потерю аппетита, а также в редких случаях повреждение возвратного гортанного нерва, гортани, трахеи, подкожное кровотечение и т.д. [39].

Самой частой генетической альтерацией при ПК ЩЖ (от 20 до 40%) являются мутации гена *BRAF* (табл. 1). Среди них до 98% занимает мутация *BRAF V600E* [40, 41]. Другими типичными для ПК ЩЖ являются мутации генов *RAS* и *RET*, промотора *TERT* (*pTERT*), а также парное слияние генов *RET+PTC* друг с другом [34, 42]. Кроме того, иногда при ПК можно обнаружить мутации генов *PPM1D*, *CHEK2*, *ARID1B*, *PTEN*, *TP53*, *EIF1AX* и слияния генов *BRAF*, *NTRK1*, *NTRK3*, *ALK*, *THADA* с некими генами без определённых часто встречающихся закономерностей, а также парные слияния *SWI+SNF* и *PAX8+PPARG* [34, 42]. Клетки ФК часто содержат мутации генов *RAS*, *DICER1*, *PTEN*, *pTERT*, *EIF1AX*,

TP53, *PIK3CA*, *EZH1*, *IDH1* и *SPOP* и парное слияние генов *PAX8+PPARG* [34, 42]. Кроме того, известно, что при дифференцированном раке ЩЖ наблюдается изменение метилирования ряда CpG-островков по сравнению с нормальной тканью [43, 44]. Так, для ПК ЩЖ в первую очередь характерно наличие участков гиперметилирования генов *MIG-6*, *SLC26A4*, *COL4A2*, *DACT2*, *RASSF1* и гипометилирования гена *KLK10*, а ФК содержит большое количество участков гиперметилирования в генах *THRβ*, *DLEC1*, *RASSF1*, *ZIC1*, *p16 INK4A* [45–49].

В табл. 2 представлены результаты актуальных исследований, посвящённых анализу цДНК в диагностике дифференцированного рака ЩЖ [50–59]. Наиболее часто в них опухолевую цДНК определяли по наличию мутации *BRAF V600E*. При изучении метилирования цДНК оценивалась эпигенетическая модификация генов *CALCA*, *CDH1*, *TIMP3*, *DAPK*, *RARβ2*, *MGMT* и *DNMT1*.

Чувствительность и специфичность диагностики рака по анализу мутации *BRAF V600E* доходят до 61,54 и 90,91% соответственно [55–57]. В настоящее время доступно лишь небольшое количество исследований, посвящённых диагностике рака ЩЖ на основе анализа мутаций *RAS* с использованием жидкостной биопсии [51]. По данным авторов этих сообщений, обособленный анализ мутаций гена *RAS* характеризуется чувствительностью и специфичностью, достигающими 50,0 и 98,2% соответственно [57]. В исследовании S. Hu и соавт. [59] совместный анализ метилирования генов *CALCA*, *CDH1*, *TIMP3*, *DAPK* и *RARβ2* характеризовался чувствительностью 68% и специфичностью 95% [59]. В исследовании F. Khatami и соавт. [58] были продемонстрированы чувствительность и специфичность 78 и 72% соответственно. Кроме того, было показано, что метилирование промоторных регионов *MGMT* и *DNMT1* ассоциировано с присутствием папиллярной карциномы ЩЖ [58].

ЖИДКОСТНАЯ БИОПСИЯ ПРИ АНАПЛАСТИЧЕСКОМ РАКЕ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Анапластическая карцинома в отличие от фолликулярной и папиллярной карцином составляет всего 1–2% всех злокачественных заболеваний ЩЖ [60]. Несмотря на это, она является причиной гибели до 50% пациентов со всеми злокачественными заболеваниями ЩЖ [4]. Медианная длительность выживания составляет около 4 месяцев, а годовая выживаемость не превышает 20% [4, 15].

Таблица 1 / Table 1

**Частота и характер (%) генетических изменений в опухолях щитовидной железы /
Frequency of types (%) of genetic changes in thyroid tumors**

Генетические изменения	Папиллярная карцинома	Фолликулярная карцинома	Анапластическая карцинома	Медуллярная карцинома
Изменения в одном гене	<i>BRAF V600E</i> (60) <i>pTERT</i> (<9) <i>NRAS</i> (8,5) <i>HRAS</i> (<5) <i>KRAS</i> (<5) <i>EIF1AX</i> (<5) <i>PPM1D</i> (<5) <i>CHEK2</i> (<5) <i>ARID1B</i> (<5) <i>PTEN</i> (<5) <i>TP53</i> (<5) <i>EIF1AX</i> (2)	<i>RAS (NRAS, HRAS и KRAS)</i> (40–49) <i>DICER1</i> (10–19) <i>PTEN</i> (10–19) <i>pTERT</i> (10–19) <i>EIF1AX</i> (3–19) <i>TP53</i> (5–9,9) <i>PIK3CA</i> (<5–9) <i>EZH1</i> (<5) <i>IDH1</i> (<5) <i>SPOP</i> (<5)	<i>pTERT</i> (70–79) <i>TP53</i> (60–69) <i>BRAF V600E</i> (30–39) <i>RAS</i> (20–29) <i>PI3K/AKT/mTOR</i> (10–19) <i>ALK</i> (10–19) <i>PTEN</i> (10–19) <i>EIF1AX</i> (5–19) <i>KMT2D</i> (10) <i>NF1/NF2</i> (9) <i>RB1</i> (8) <i>ATM</i> (7) <i>TSHR</i> (5–9,9) <i>DICER1</i> (<5) <i>RET</i> (<5) <i>RBM10</i> (<5) <i>DNMT3A</i> (3)	<i>RET</i> (50–59) <i>RAS</i> (20–29) <i>TP53</i> (<5) <i>BRAF non-V600E</i> (<5)
Слияния	<i>RET+PTC</i> (7) <i>RET</i> (6,3–7) <i>BRAF</i> (<5) <i>PPARG</i> (<5) <i>NTRK1</i> (<5) <i>NTRK3</i> (<5) <i>ALK</i> (<5) <i>THADA</i> (<5) <i>SWI+SNF</i> (<5) <i>PAX8+PPARG</i> (1)	<i>PAX8+PPARG</i> (27) <i>DERL-COX6C</i> (<5)	<i>SWI+SNF</i> (30–39) <i>NTRK</i> (<5) <i>ALK</i> (<5%) <i>NCOA4+RET</i> (<5) <i>NUT+BRD4</i> (<5) <i>KIAA1549+BRAF</i> (<5)	<i>NTRK</i> (<5) <i>SWI+SNF</i> (<5) <i>MYH13+RET</i> (<5) <i>EML4+ALK</i> (<5) <i>GFPT1+ALK</i> (<5)
DNA CNA	20–29%	60–69%	>80%	60–69%
Гиперметилирование	<i>MIG-6</i> (79) <i>SLC26A4</i> (71) <i>COL4A2</i> (41–66) <i>DACT2</i> (64,6) <i>RASSF1</i> (62) <i>TIMP3</i> (53) <i>pPTEN</i> (45,7) <i>Rap1GAP</i> (9–45) <i>p16 INK4A</i> (44) <i>DKK3</i> (38,8) <i>XAF1</i> (35,7) <i>DAPK</i> (34) <i>SLC5A8</i> (33) <i>DLEC1</i> (23) <i>RARB2</i> (22) <i>HOXB4</i> (18) <i>ADAMTS8</i> (18) <i>NIS</i> (<5) <i>RUNX3</i> (<5) <i>REC8</i> (<5) <i>GPX3</i> (<5) <i>NKX2-1</i> (<5)	<i>THRβ</i> (81) <i>DLEC1</i> (56–75) <i>RASSF1</i> (70) <i>ZIC1</i> (67) <i>p16 INK4A</i> (50) <i>SLC26A4</i> (46) <i>KISS1R</i> (17) <i>PTEN</i> (<5)	<i>SLC26A4</i> (71)	<i>RASSF1</i> (80) <i>TSHR</i> (33) <i>ERβ</i> (20)
Гипометилирование	<i>KLK10</i> (<5)	-	<i>TCL1B</i> (64) <i>NOTCH4</i> (45) <i>MAP17</i> (33)	<i>INSL4</i> (60) <i>DPPA2</i> (30) <i>MAP17</i> (38)

Примечание. Изменения в одном гене — генные мутации, которые включают в себя замену, вставку или выпадение нуклеотида в границах одного гена; слияния — частота слияний указанного гена с множеством неких других генов без часто проявляющихся закономерностей, либо частота парных слияний двух указанных генов (пары отмечены знаком «+»), которые встречаются достаточно часто. DNA CNA — изменение числа копий какого-либо гена в геноме. В скобках указана доля пациентов с указанными изменениями от общего числа участников исследования.

Note: Changes in one gene are gene mutations, which include the replacement, insertion or loss of a nucleotide within the boundaries of one gene; fusions are the frequency of fusions of the specified gene with a variety of some other genes without frequently occurring patterns, or the frequency of paired fusions of two specified genes (pairs marked with a “+” sign), which occur quite often. DNA CNA is a change in the number of copies of a gene in the genome. The percentage of patients with these changes from the total number of study participants is indicated in parentheses.

Таблица 2 / Table 2

**Исследования, посвящённые анализу циркулирующей ДНК
в диагностике дифференцированного рака щитовидной железы /
Studies on the analysis of circulating DNA in the diagnosis of differentiated thyroid cancer**

Исследование	Пациенты	Методология	Мишени	Исход
Hotspot-мутации ядерной цДНК				
Condello и соавт. [50]	59 ПК ЩЖ 24 контроль	4 мл плазмы ПЦР-PB	<i>BRAF</i>	ЧМ = 0 СМ = 1 ЧЗ = 0 СЗ = 1
Lupo и соавт. [51]	13 ПК ЩЖ 43 контроль	5 мл плазмы NGS	<i>BRAF, CTNNB1, EGFR, FOXL2, GNAS, KRAS, NRAS, PIK3CA, TP53</i>	ЧМ = 0,091 СМ = 0,95 ЧЗ = 0,077 СЗ = 0,95
Scholarship и соавт. [52]	26 ПК ЩЖ 13 контроль	1 мл плазмы Количественная ПЦР	<i>BRAF</i>	ЧМ = 1 СМ = 1 ЧЗ = 0,308 СЗ = 1
Kwak и соавт. [53]	67 ПК ЩЖ 26 контроль	- ПЦР-PB	<i>BRAF</i>	ЧЗ = 0 СЗ = 1
Chuang и соавт. [54]	14 ПК ЩЖ 9 контроль	- ПЦР-PB	<i>BRAF</i>	ЧМ = 0,6 СМ = 1 ЧЗ = 0,21 СЗ = 1
Kim и соавт. [55]	72 ПК ЩЖ 1 ФК ЩЖ 4 контроль	500 мкл плазмы ПЦР-PB (clamp)	<i>BRAF</i>	ЧМ = 0,061 СМ = 1 ЧЗ = 0,041 СЗ = 1
Jensen и соавт. [56]	57 ПК ЩЖ	600 мкл плазмы цПЦР/цПЦР (COLD-ПЦР)	<i>BRAF</i>	ЧЗ цПЦР = 0,14 ЧЗ цПЦР (COLD-ПЦР) = 0,421
Li и соавт. [57]	59 ПК ЩЖ	10 мл крови QuantStudio™ 3D digital PCR	<i>BRAF</i> <i>NRAS</i>	ЧМ <i>BRAF</i> V600E = 0,615 СМ <i>BRAF</i> V600E = 0,909 ЧЗ <i>BRAF</i> V600E = 0,322 ЧМ <i>NRAS</i> Q61R = 0,5 СМ <i>NRAS</i> Q61R = 0,98 ЧЗ <i>NRAS</i> Q61R = 0,05
Метилирование цДНК				
Khatami и соавт. [58]	57 ПК ЩЖ 45 контроль	6 мл плазмы HRM	<i>MGMT, DNMT1</i>	ЧМ <i>MGMT</i> = 0,78 СМ <i>MGMT</i> = 0,72 ЧМ <i>DNMT</i> = 0,36 СМ <i>DNMT</i> = 0,84
Hu и соавт. [59]	38 ПК и ФК ЩЖ 19 контроль	1 мл сыворотки ПЦР-PB	<i>CALCA, CDH1, TIMP3, DAPK, RARβ2</i>	ЧЗ общая = 0,68 СЗ общая = 0,95

Примечание. ЩЖ — щитовидная железа; ПК — папиллярная карцинома; ФК — фолликулярная карцинома; ПЦР-PB — полимеразная цепная реакция в реальном времени; ЧМ и СМ — чувствительность и специфичность обнаружения мутации по сравнению с данными генотипирования резекционного материала; ЧЗ и СЗ — чувствительность и специфичность определения заболевания по сравнению с данными гистологического исследования резекционного материала.

Note: ЩЖ — thyroid gland; ПК — papillary carcinoma; ФК — follicular carcinoma; ПЦР-PB — polymerase chain reaction in real time; ЧМ and СМ — sensitivity and specificity of mutation detection compared with the genotyping data of resection material; ЧЗ and СЗ — sensitivity and specificity of disease detection compared with the data of histological examination of resection material.

Для анапластической карциномы ЩЖ характерно большое количество генетических альтераций (см. табл. 1). Наиболее часто мутации возникают в генах *BRAF*, *RAS*, *pTERT*, *TP53* и *PIK3CA*

[60, 61]. Впрочем, они могут присутствовать и в других генах: *ALK*, *PTEN*, *EIF1AX*, *KMT2D* и т.д. [34, 42]. В клетках анапластической карциномы ЩЖ часты слияния генов *NTRK*, *ALK* с неки-

ми генами без определённых закономерностей, а также парные слияния *NCOA4+RET*, *NUT+BRD4*, *KIAA1549+BRAF* и *SWI+SNF* [34, 62]. Имеются также данные о том, что зачастую при данном заболевании промотор гена *SLC26A4* оказывается гиперметилирован, а промоторы генов *TCL1B*, *NOTCH4* и *MAP17* гипометилированы [45, 48].

В табл. 3 представлены немногочисленные данные по изучению диагностического потенциала жидкостной биопсии плазмы при анапластической карциноме ЩЖ [63–66]. Показано, что частота совпадений мутаций генов *TP53*, *NRAS*, *BRAF* и *PIK3CA* между цДНК и опухолевой тканью, как и при анализе пациентов с дифференцированным раком ЩЖ, может достигать более 85% [63–66]. Существуют данные о том, что наличие мутации *PIK3CA* значимо связано с худшей выживаемостью пациентов, тогда как наличие мутации *BRAF* и применение соответствующих лекарственных препаратов-ингибиторов мутантного

белкового продукта позволяет увеличить общую выживаемость [63].

Жидкостная биопсия при анапластической карциноме ЩЖ также может быть полезна при контроле терапии. В исследовании D.M. Allin и соавт. [65] было отмечено, что повышение мутантных *NRAS* и *TP53* на несколько месяцев опережало обнаружение прогрессии опухоли с помощью конвенциональных маркеров. Кроме того, в исследовании P.C. Iyer и соавт. [66] высокие уровни цДНК в 71% случаев предсказывали ответ на лечение.

ЖИДКОСТНАЯ БИОПСИЯ ПРИ МЕДУЛЛЯРНОМ РАКЕ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Медуллярная карцинома ЩЖ, как и анапластическая карцинома ЩЖ, составляет 1–2% всех онкологий ЩЖ, но является причиной смерти до 13% пациентов злокачественными новообразованиями

Таблица 3 / Table 3

Исследования, посвящённые анализу цДНК в диагностике и контроле лечения анапластического рака щитовидной железы / Studies on the cDNA analysis in the diagnosis and treatment of anaplastic thyroid cancer

Исследование	Пациенты	Методология	Мишени	Исход
Qin и соавт. [63]	87 АК ЩЖ	NGS	<i>TP53</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i> <i>EGFR</i> <i>RAS</i> <i>NF1</i> и др.	ЧМ <i>TP53</i> = 0,875 СМ <i>TP53</i> = 0,75 ЧМ <i>BRAF</i> = 0,882 СМ <i>BRAF</i> = 1 ЧМ <i>PIK3CA</i> = 0,8 СМ <i>PIK3CA</i> = 0,957 ЧМ <i>NRAS</i> = 0,6 СМ <i>NRAS</i> = 1
Sandulache и соавт. [64]	23 АК ЩЖ	NGS на платформе Guardant 360	<i>BRAF</i> <i>TP53</i> <i>RAS</i> <i>PIK3CA</i> <i>EGFR</i> и др.	ЧЗ <i>TP53</i> = 0,65 ЧЗ <i>BRAF</i> = 0,48
Allin и соавт. [65]	3 СДК ЩЖ 1 АК ЩЖ	4 мл плазмы цкПЦР	АК ЩЖ: <i>TP53</i> , <i>AKT1</i> , <i>DOCK2</i> СДК: <i>NRAS</i> , <i>TP53</i> , <i>PTEN</i> , <i>NOTCH1</i>	ЧЗ = 1
Iyer и соавт. [66]	44 АК ЩЖ	3 мл плазмы цкПЦР	<i>BRAF</i>	ЧМ = 0,85 СМ = 1 ЧЗ = 0,39

Примечание. ЩЖ — щитовидная железа; АК — анапластическая карцинома; цкПЦР — цифровая капельная полимеразная цепная реакция; NGS — секвенирование нового поколения; ЧМ и СМ — чувствительность и специфичность обнаружения мутации по сравнению с данными генотипирования резекционного материала; ЧЗ и СЗ — чувствительность и специфичность определения заболевания по сравнению с данными гистологического исследования резекционного материала; СДК — слабодифференцированная карцинома.

Note: ЩЖ — thyroid gland; АК — anaplastic carcinoma; цкПЦР — digital droplet polymerase chain reaction; NGS — novel gene sequence; ЧМ and СМ — sensitivity and specificity of mutation detection in comparison with genotyping data of the resection material, ЧЗ and СЗ — sensitivity and specificity of disease detection in comparison with histological analysis of the resected material. In cases where specificity was not provided, the studies did not include a control group.

ЩЖ [5, 67]. Чрезвычайно важно выявлять медуллярную карциному ЩЖ как можно раньше: на стадии T1 десятилетняя выживаемость пациентов может достигать 87,5%, в то время как на стадии T4 она составляет лишь ~60% [5].

Наиболее часто при медуллярной карциноме ЩЖ мутируют гены *RET*, *RAS* и *TP53*. Кроме того, при этом типе рака происходят слияния гена *NTRK* с некими генами без определённых закономерностей, а также парные слияния *MYH13+RET*, *EML4+ALK*, *GFPT1+ALK* и *SWI+SNF* [34, 62] (см. табл. 1). Для медуллярной карциномы ЩЖ характерно гиперметилирование промоторов *RASSF1*, *TSHR*, *ERβ* и гипометилирование *INSL4*, *DDPA2* и *MAP17* [45, 48].

Исследований, посвящённых применению жидкостной биопсии при медуллярной карциноме ЩЖ, сравнительно мало (табл. 4) [65, 68]. В отличие от описанных ранее опухолей, для медуллярной карциномы уже существует эффективный лабораторный биомаркер — кальцитонин, позволяющий обнаружить даже опухоль размером менее миллиметра [69]. Чувствительность и специфичность диагностики на основе измерения его стимулированного уровня достигают 95 и 100% соответственно [70, 71]. Тем не менее анализ цДНК для неинвазивного генотипирования опухоли может оказаться ценным дополнением к измерению уровней кальцитонина. Продемонстрировано, что выявление у пациентов с медуллярной

карциномой ЩЖ цДНК с мутациями генов *RET* и *BRAF* было ассоциировано с наличием метастазов, высокой опухолевой нагрузкой и в целом менее благоприятным прогнозом [65, 68]. Кроме того, уровень *RET M918T* в плазме предсказывает прогрессирование медуллярной карциномы ЩЖ более точно, чем время удвоения кальцитонина, и иногда обратно коррелирует с уровнем кальцитонина [68].

ОБСУЖДЕНИЕ

Ключевым достоинством жидкостной биопсии, разумеется, является сравнительная неинвазивность. Кроме того, уже сейчас анализ цДНК показывает большую точность в обнаружении рецидивов, чем анализ прочих лабораторных биомаркеров [65]. Способность данной технологии к обнаружению генов резистентности полезна для быстрого реагирования на изменение опухолевого фенотипа и возникновение невосприимчивости новообразования к текущей терапии [72]. Тем не менее она остаётся несовершенной, что приводит к большому разбросу чувствительности. В первую очередь это обусловлено отсутствием стандартных подходов к анализу опухолевой цДНК в плазме, в результате чего методологию в ряде рассмотренных работ можно признать неоптимальной. Так, зачастую выделение ДНК происходило из 1–4 мл плазмы (см. табл. 2–4), хотя заявленные авторами наборы реагентов для выделения ДНК позволя-

Таблица 4 / Table 4

Исследования, посвящённые анализу цДНК в диагностике медуллярного рака щитовидной железы / Studies of the cDNA analysis in the diagnosis and treatment monitoring of medullary thyroid cancer

Исследование	Пациенты	Методология	Мишень	Исход
Allin и соавт. [65]	14 МК ЩЖ	4 мл плазмы цкПЦР	ПК: <i>BRAF</i> , <i>NRAS</i> , <i>AKT1</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>VHL</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>APC</i> . ФК: <i>NRAS</i> , <i>TP53</i> , <i>PTEN</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>HRAS</i> , <i>ARID1A</i> , <i>KRAS</i> , <i>APC</i> , <i>ATM</i> . МК: <i>RET</i> , <i>BRAF</i> , <i>HRAS</i>	ЧЗ = 0,86
Cote и соавт. [68]	50 МК ЩЖ	3 мл плазмы ЦкПЦР	<i>RET</i> M918T	ЧМ в мл = 0,4 СМ в мл = 1 ЧЗ в мл = 0,27

Примечание. ЩЖ — щитовидная железа; МК — медуллярная карцинома; цкПЦР — цифровая капельная полимеразная цепная реакция; ЧМ и СМ — чувствительность и специфичность обнаружения мутации по сравнению с данными генотипирования резекционного материала; ЧЗ и СЗ — чувствительность и специфичность определения заболевания по сравнению с данными гистологического исследования резекционного материала; ПК — папиллярная карцинома; ФК — фолликулярная карцинома.

Note: ЩЖ — thyroid gland; МК — medullary carcinoma; цкПЦР — digital drip polymerase chain reaction; ЧМ and СМ — sensitivity and specificity of mutation detection compared with genotyping data of resection material; ЧЗ and СЗ — sensitivity and specificity of disease determination compared with histological examination data of resection material; ПК — papillary carcinoma; ФК — follicular carcinoma.

ли выделить цДНК из объёма до 5 мл без потери эффективности экстракции [73]. Тем самым происходила потеря от 20 до 80% общей цДНК, что могло быть причиной ложноотрицательных результатов.

При анализе опухолевой цДНК в ряде исследований применялся метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, которая имеет ограничения при работе в диапазоне низких концентраций ДНК, а также слабую устойчивость к ингибиторам ПЦР, в то время как цифровая капельная ПЦР лишена вышеперечисленных недостатков [74]. Именно с этим может быть связана неоптимальная чувствительность в части рассмотренных работ [51, 53, 54]. Кроме того, низкая чувствительность могла быть связана с низким разнообразием анализируемых маркеров. В основном авторы анализировали мутации всего нескольких генов: *BRAF*, *TP53*, *NRAS*. Их частота в карциномах ЩЖ в совокупности не достигает 100%, т.е. не позволяет добиться охвата всей популяции пациентов [34]. Перспективными мишенями для анализа могли бы быть мутации промотора *TERT*, частота встречаемости которых в низкодифференцированных опухолях достигает 43–65% [34, 75]. Это особенно важно, поскольку опухоль, одновременно позитивная по мутациям промотора *TERT* и *BRAF*, является гораздо более опасной для пациента [75].

Малочисленные исследования, посвящённые анализу эпигенетической регуляции, также не характеризовались высокой точностью. Во многом это может быть связано с тем, что бисульфитная конверсия, использовавшаяся в ряде рассмотренных работ [58, 59], приводит к деградации до 90% нуклеиновых кислот [55, 58, 76]. Учитывая и без того незначительное количество опухолевой цДНК в плазме, даже небольшие её потери могут быть критическими для анализа [77, 78]. Возможно, для жидкостной биопсии более предпочтительно использование чувствительных к метилированию рестриктаз, которые позволяют избежать неспецифической рестрикции [78]. Наконец, низкая чувствительность жидкостной биопсии может быть обусловлена малым содержанием или даже отсутствием опухолевой ДНК в изымаемой периферической крови. Её концентрация может быть больше в смывах тонкоигольной аспирационной биопсии, что используется в диагностических молекулярных тестах, таких как ThyroSeq и Afirma GSC [79–81]. Их чувствительность и специфичность в перифериче-

ской крови, по сравнению с таковыми при анализе опухолевой ДНК, достигали 99 и 75% соответственно [81]. Однако стоит отметить, что тонкоигольная аспирационная биопсия может вызывать ряд осложнений, включающих в себя боль, кровоизлияния, воспаления места аспирации, а также в редких случаях паралич возвратного гортанного нерва, острый и отсроченный транзиторный отёк ЩЖ, дисфагию, постаспирационный тиреотоксикоз и т.д. [82]. Кроме того, выполнение тонкоигольной аспирационной биопсии подразумевает более высокий уровень оснащения процедурного кабинета и квалификации специалиста, чем взятие периферической крови, что потенциально может ограничивать потенциал к сбору биоматериала для отправки на молекулярно-генетическое тестирование в лечебно-профилактические учреждения, удалённые от региональных центров.

Таким образом, несмотря на высокую специфичность, метод жидкостной биопсии плазмы по цДНК на сегодняшний день обладает сравнительно низкой чувствительностью для диагностики онкологических заболеваний ЩЖ. Для первичной диагностики более предпочтителен анализ опухолевых нуклеиновых кислот в совокупности с цитологическим исследованием биоматериала, полученного при тонкоигольной аспирационной биопсии, совместная чувствительность и специфичность которых составляют около 80,1 и 100% соответственно [80, 83]. Для увеличения диагностического потенциала жидкостной биопсии необходимы расширение панели биомаркеров для выявления опухолевой цДНК, а также оптимизация и стандартизация процедуры выделения цДНК и её анализа. Впрочем, уже сейчас одной из наиболее перспективных точек приложения жидкостной биопсии плазмы может являться мониторинг рецидивов и контроль ответа на терапию. В ряде исследований продемонстрировано её превосходство над рутинно применяемыми подходами [65, 68, 84]. Данный метод может быть особенно эффективен, когда генотип опухоли пациента заведомо известен. В таком случае выявление цДНК, несущей мутантный аллель, после хирургического вмешательства может свидетельствовать о рецидиве опухоли или наличии метастазов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод жидкостной биопсии цДНК имеет ряд преимуществ перед УЗИ и тонкоигольной аспирационной биопсией ЩЖ, ключевыми из которых яв-

ляются малая инвазивность и высокая специфичность. Кроме того, информация, полученная при этом анализе, может облегчить прогнозирование заболевания и подбор противоопухолевой терапии. Несмотря на малое количество релевантных клинических исследований, жидкостная биопсия представляется весьма многообещающим методом диагностики и контроля эффективности терапии рака ЩЖ. Следующими этапами в развитии данной технологии должны стать стандартизация и оптимизация всех этапов анализа цДНК, а также расширение списка исследуемых маркеров для увеличения охвата генотипов опухолей в популяции пациентов с раком ЩЖ.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках государственного задания Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. *Т.И. Рахматуллин* — поисково-аналитическая работа, написание текста статьи, обсуждение результатов исследования; *М. Джайн, Л.М. Самоходская, В.А. Животов* — обработка и обсуждение результатов исследования, написание текста статьи. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. The study was carried within the state assignment of Lomonosov Moscow State University.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. *T.I. Rakhmatullin* — search and analytical work, writing the text of the article, discussion of the results of the study; *M. Jain, L.M. Samokhodskaya, V.A. Zhivotov* — processing and discussion of the results of the study, writing the text of the article. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis of literature, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Cancer Today. Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, World, both sexes, all ages (excl. NMSC). Accessed: February 6, 2023. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020>.
2. Rossi ED, Pantanowitz L, Hornick JL. A worldwide journey of thyroid cancer incidence centred on tumour histology. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2021;9(4):193–194. doi: 10.1016/S2213-8587(21)00049-8
3. Survival Rates for Thyroid Cancer. Accessed March 15, 2023. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/thyroid-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>.
4. Kasemsiri P, Chaisakgreenon P, Vatanasapt P, et al. Survival benefit of intervention treatment in advanced anaplastic thyroid cancer. *Int J Surg Oncol.* 2021;2021. doi: 10.1155/2021/5545127
5. Sahli ZT, Canner JK, Zeiger MA, Mathur A. Association between age and disease specific mortality in medullary thyroid cancer. *Am J Surg.* 2021;221(2):478. doi: 10.1016/J.AMJSURG.2020.09.025
6. Lim H, Devesa SS, Sosa JA, et al. Trends in thyroid cancer incidence and mortality in the United States, 1974–2013. *JAMA.* 2017;317(13):1338–1348. doi: 10.1001/JAMA.2017.2719
7. Oh CM, Lim J, Jung YS, et al. Decreasing trends in thyroid cancer incidence in South Korea: What happened in South Korea? *Cancer Med.* 2021;10(12):4087. doi: 10.1002/CAM4.3926
8. Filetti S, Durante C, Hartl D, et al. Thyroid cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2019;30(12):1856–1883. doi: 10.1093/ANNONC/MDZ400
9. Giovanella L, Ceriani L, Garo ML. Is thyroglobulin a reliable biomarker of differentiated thyroid cancer in patients treated by lobectomy? A systematic review and meta-analysis. *Clin Chem Lab Med.* 2022;60(7):1091–1100. doi: 10.1515/CCCLM-2022-0154
10. Jingzhu Z, Xiangqian Z, Ming G, et al. Clinical challenges with calcitonin-negative medullary thyroid carcinoma: Three case reports and a review of the literature. *Ann R Coll Surg Engl.* 2022;104(3):221–230. doi: 10.1308/rcsann.2020.7118
11. Algeciras-Schimnich A. Thyroglobulin measurement in the management of patients with differentiated thyroid cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2018;55(3):205–218. doi: 10.1080/10408363.2018.1450830
12. Santos AC, Horta M. Fast-growing cervical mass: Anaplastic thyroid carcinoma. *BMJ Case Rep.* 2018;2018:bcr2017223578. doi: 10.1136/bcr-2017-223578
13. Trimboli P, Giannelli J, Marques B, et al. Head-to-head comparison of FNA cytology vs. calcitonin measurement in FNA washout fluids (FNA-CT) to diagnose medullary thyroid carcinoma. A systematic review and meta-analysis. *Endocrine.* 2022;75(1):33–39. doi: 10.1007/s12020-021-02892-x
14. Pálsdóttir K, Fridsten S, Blomqvist L, et al. Interobserver agreement of transvaginal ultrasound and magnetic resonance imaging in local staging of cervical cancer. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2021;58(5):773–779. doi: 10.1002/UOG.23662
15. Zhou W, Yue Y, Zhang X. Radiotherapy plus chemotherapy leads to prolonged survival in patients with anaplastic thyroid cancer compared with radiotherapy alone regardless of surgical resection and distant metastasis: A retrospective population study. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;(12):1–10. doi: 10.3389/FENDO.2021.748023
16. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid biopsy: From discovery to clinical application. *Cancer Discov.* 2021;11(4):858–873. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-1311
17. Pös O, Biró O, Szemes T, Nagy B. Circulating cell-free nucleic acids: Characteristics and applications. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(7):937–945. doi: 10.1038/S41431-018-0132-4
18. Jiang P, Chan CW, Chan KC, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(11):E1317–E1325. doi: 10.1073/PNAS.1500076112
19. Salvianti F, Giuliani C, Petrone L, et al. Integrity and quantity of total cell-free DNA in the diagnosis of thyroid cancer: Correlation with cytological classification. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1350. doi: 10.3390/IJMS18071350

20. Thakur S, Tobey A, Daley B, et al. Limited Utility of circulating cell-free DNA Integrity as a diagnostic tool for differentiating between malignant and benign thyroid nodules with indeterminate cytology (Bethesda Category III). *Front Oncol.* 2019;9:905. doi: 10.3389/FONC.2019.00905
21. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, et al. Cell-free DNA in human blood plasma: Length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas.* 1998;17(1):89–97. doi: 10.1097/00006676-199807000-00012
22. Hu Z, Chen H, Long Y, et al. The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021;157:103166. doi: 10.1016/J.CRITREVONC.2020.103166
23. Liberti MV, Locasale JW. The warburg effect: How does it benefit cancer cells? *Trends Biochem Sci.* 2016;41(3):211. doi: 10.1016/J.TIBS.2015.12.001
24. Lee J, Chang JY, Kang YE, et al. Mitochondrial energy metabolism and thyroid cancers. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2015;30(2):117–123. doi: 10.3803/ENM.2015.30.2.117
25. Starenki D, Sosonkina N, Hong SK, et al. Mortalin (GRP75/HSPA9) promotes survival and proliferation of thyroid carcinoma cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9). doi: 10.3390/IJMS20092069
26. McKenzie S, Kyrianiou N. Apoptosis evasion: The role of survival pathways in prostate cancer progression and therapeutic resistance. *J Cell Biochem.* 2006;97(1):18. doi: 10.1002/JCB.20634
27. Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(45):16368. doi: 10.1073/PNAS.0507904102
28. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(8):1057. doi: 10.1080/15384047.2019.1598759
29. Caglar O, Cilgin B, Eroglu M, Cayir A. Evaluation of circulating cell free DNA in plasma as a biomarker of different thyroid diseases. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2020;86(3):321–326. doi: 10.1016/J.BJORL.2018.12.008
30. Khier S, Gahan PB. Hepatic clearance of cell-free DNA: Possible impact on early metastasis diagnosis. *Mol Diagn Ther.* 2021;25(6):677–682. doi: 10.1007/S40291-021-00554-2
31. Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, et al. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *Int J Cancer.* 2013;133(2):346–356. doi: 10.1002/IJC.28030
32. Stawski R, Walczak K, Kosielski P, et al. Repeated bouts of exhaustive exercise increase circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA without development of tolerance in healthy men. *PLoS One.* 2017;12(5). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0178216
33. Khatami F, Tavangar SM. Liquid biopsy in thyroid cancer: New insight. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2018;12(3):234–247
34. Agarwal S, Bychkov A, Jung CK. Emerging biomarkers in thyroid practice and research. *Cancers (Basel).* 2021;14(1):204. doi: 10.3390/CANCERS14010204
35. Wan JC, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(4):223–238. doi: 10.1038/NRC.2017.7
36. Fussey JM, Bryant JL, Batis N, et al. The clinical utility of cell-free DNA measurement in differentiated thyroid cancer: A systematic review. *Front Oncol.* 2018;8:132. doi: 10.3389/FONC.2018.00132
37. Kraus-Fischer G, Alvarado-Bachmann R, de Rienzo-Madero B, et al. [Correlation between the Bethesda system for thyroid nodules and post-thyroidectomy histopathological diagnosis. (In Spanish).] *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2020;58(2):114–121. doi: 10.24875/RMIMSS.M20000008
38. Bayrak BYa, Eruyar AT. Malignancy rates for Bethesda III and IV thyroid nodules: A retrospective study of the correlation between fine-needle aspiration cytology and histopathology. *BMC Endocr Disord.* 2020;20(1):48. doi: 10.1186/S12902-020-0530-9
39. Bongers PJ, Greenberg CA, Hsiao R, et al. Differences in long-term quality of life between hemithyroidectomy and total thyroidectomy in patients treated for low-risk differentiated thyroid carcinoma. *Surgery.* 2020;167(1):94–101. doi: 10.1016/J.SURG.2019.04.060
40. Celik M, Bulbul BY, Ayturk S, et al. The relation between BRAFV600E mutation and clinicopathological characteristics of papillary thyroid cancer. *Med Glas (Zenica).* 2020;17(1):30–34. doi: 10.17392/1086-20
41. Ritterhouse LL, Barletta JA. BRAF V600E mutation-specific antibody: A review. *Semin Diagn Pathol.* 2015;32(5):400–408. doi: 10.1053/J.SEMDP.2015.02.010
42. Acuña-Ruiz A, Carrasco-López C, Santisteban P. Genomic and epigenomic profile of thyroid cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2023;37(1):101656. doi: 10.1016/J.BEEM.2022.101656
43. Yao Y, Xu P, Ying T, et al. Integrative analysis of DNA methylation and gene expression identified follicular thyroid cancer-specific diagnostic biomarkers. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;12:736068. doi: 10.3389/FENDO.2021.736068/FULL
44. Gu P, Zeng Y, Ma W, et al. Characterization of the CpG island methylator phenotype subclass in papillary thyroid carcinoma. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:1008301. doi: 10.3389/FENDO.2022.1008301/FULL
45. Rodríguez-Rodero S, Delgado-Álvarez E, Díaz-Naya L, Martín Nieto A, Menéndez Torre E. Epigenetic modulators of thyroid cancer. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2017;64(1):44–56. doi: 10.1016/J.ENDINU.2016.09.006
46. Mancikova V, Buj R, Castelblanco E, et al. DNA methylation profiling of well-differentiated thyroid cancer uncovers markers of recurrence free survival. *Int J Cancer.* 2014;135(3):598–610. doi: 10.1002/IJC.28703
47. Alvarez-Nuñez F, Bussaglia E, Mauricio D, et al. PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid.* 2006;16(1):17–23. doi: 10.1089/THY.2006.16.17
48. Zarkesh M, Zadeh-Vakili A, Azizi F, et al. Altered epigenetic mechanisms in thyroid cancer subtypes. *Molecular Diagnosis Therapy.* 2017;22(1):41–56. doi: 10.1007/S40291-017-0303-Y
49. Asa SL, Ezzat S. The epigenetic landscape of differentiated thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;469:3–10. doi: 10.1016/J.MCE.2017.07.012
50. Condello V, Macerola E, Ugolini C, et al. Analysis of circulating tumor DNA does not improve the clinical management of patients with locally advanced and metastatic papillary thyroid carcinoma. *Head Neck.* 2018;40(8):1752–1758. doi: 10.1002/HED.25155
51. Lupo M, Guttler R, Geck Z, et al. Is measurement of circulating tumor dna of diagnostic use in patients with thyroid nodules? *Endocr Pract.* 2018;24(5):453–459. doi: 10.4158/EP-2017-0213
52. Scholarship W, Bhupendrabhai PK, Nichols AC, Bhupendrabhai K. Detection of circulating thyroid tumor DNA in patients with thyroid nodules. Published online 2015. Accessed: February 27, 2022. Available from: <https://ir.lib.uwo.ca/etd/3644/>.
53. Kwak JY, Jeong JJ, Kang SW, et al. Study of peripheral BRAF(V600E) mutation as a possible novel marker for papillary thyroid carcinomas. *Head Neck.* 2013;35(11):1630–1633. doi: 10.1002/HED.23195
54. Chuang TC, Chuang AY, Poeta L, et al. Detectable BRAF mutation in serum DNA samples from patients with papillary thyroid carcinomas. *Head Neck.* 2010;32(2):229–234. doi: 10.1002/HED.21178
55. Kim BH, Kim IJ, Lee BJ, et al. Detection of plasma BRAF(V600E) mutation is associated with lung metastasis in papillary thyroid carcinomas. *Yonsei Med J.* 2015;56(3):634–640. doi: 10.3349/YMJ.2015.56.3.634
56. Jensen K, Thakur S, Patel A, et al. Detection of BRAFV600E in liquid biopsy from patients with papillary thyroid cancer is associated with tumor aggressiveness and response to therapy. *J Clin Med.* 2020;9(8):1–12. doi: 10.3390/JCM9082481
57. Li H, Zhao J, Zhang J, et al. Detection of ctDNA in the plasma of patients with papillary thyroid carcinoma. *Exp Ther Med.* 2019;18(5):3389–3396. doi: 10.3892/ETM.2019.7997
58. Khatami F, Teimoori-Toolabi L, Heshmat R, et al. Circulating ctDNA methylation quantification of two DNA methyl transferases in papillary thyroid carcinoma. *J Cell Biochem.* 2019; 120(10):17422–17437. doi: 10.1002/JCB.29007

59. Hu S, Ewertz M, Tufano RP, et al. Detection of serum deoxyribonucleic acid methylation markers: A novel diagnostic tool for thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(1):98–104. doi: 10.1210/JC.2005-1810
60. Molinaro E, Romei C, Biagini A, et al. Anaplastic thyroid carcinoma: From clinicopathology to genetics and advanced therapies. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(11):644–660. doi: 10.1038/NREND0.2017.76
61. Landa I, Ibrahimasic T, Boucai L, et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J Clin Invest.* 2016;126(3):1052–1066. doi: 10.1172/JCI85271
62. Yakushina VD, Lerner LV, Lavrov AV. Gene fusions in thyroid cancer. *Thyroid.* 2018;28(2):158–167. doi: 10.1089/thy.2017.0318
63. Qin Y, Wang JR, Wang Y, et al. Clinical utility of circulating cell-free DNA mutations in anaplastic thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2021;31(8):1235–1243. doi: 10.1089/THY.2020.0296
64. Sandulache VC, Williams MD, Lai SY, et al. Real-Time genomic characterization utilizing circulating cell-free DNA in patients with anaplastic thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2017;27(1):81–87. doi: 10.1089/THY.2016.0076
65. Allin DM, Shaikh R, Carter P, et al. Circulating tumour DNA is a potential biomarker for disease progression and response to targeted therapy in advanced thyroid cancer. *Eur J Cancer.* 2018;(103):165–175. doi: 10.1016/J.EJCA.2018.08.013
66. Iyer PC, Cote GJ, Hai T, et al. Circulating BRAF V600E cell-free DNA as a biomarker in the management of anaplastic thyroid carcinoma. *JCO Precis Oncol.* 2018;(2):1–11. doi: 10.1200/PO.18.00173
67. Wells SA, Asa SL, Dralle H, et al. Revised American thyroid association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2015;25(6):567–610. doi: 10.1089/THY.2014.0335
68. Cote GJ, Evers C, Hu MI, et al. Prognostic significance of circulating RET M918T mutated tumor DNA in patients with advanced medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(9):3591–3599. doi: 10.1210/JC.2017-01039
69. Machens A, Dralle H. Biomarker-based risk stratification for previously untreated medullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(6):2655–2663. doi: 10.1210/JC.2009-2368
70. Fugazzola L, di Stefano M, Censi S, et al. Basal and stimulated calcitonin for the diagnosis of medullary thyroid cancer: Updated thresholds and safety assessment. *J Endocrinol Invest.* 2021;44(3):587. doi: 10.1007/S40618-020-01356-9
71. Kartal Baykan E, Erdoğan M. Basal and pentagastrin-stimulated calcitonin cut-off values in diagnosis of preoperative medullary thyroid cancer. *Turk J Med Sci.* 2021;51(2):650. doi: 10.3906/SAG-2003-182
72. Solomon BJ, Tan L, Lin JJ, et al. RET solvent front mutations mediate acquired resistance to selective RET inhibition in RET-Driven malignancies. *J Thorac Oncol.* 2020;15(4):541–549. doi: 10.1016/J.JTHO.2020.01.006
73. QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook, QIAGEN. Accessed: July 20, 2022. Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=0c4b31ab-f4fb-425f-99bf-10ab9538c061&lang=en>.
74. Taylor SC, Laperriere G, Germain H. Droplet digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: From variable nonsense to publication quality data. *Scientific Reports* 2017;7(1):2409. doi: 10.1038/s41598-017-02217-x
75. Liu R, Xing M. TERT Promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2016;23(3):R143. doi: 10.1530/ERC-15-0533
76. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: Systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(13):65–65. doi: 10.1093/NAR/29.13.E65
77. Liu Y, Siejka-Zielińska P, Velikova G, et al. Bisulfite-free direct detection of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at base resolution. *Nat Biotechnol.* 2019;37(4):424–429. doi: 10.1038/S41587-019-0041-2
78. Martisova A, Holcakova J, Izadi N, et al. DNA methylation in solid tumors: Functions and methods of detection. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):4247. doi: 10.3390/IJMS22084247
79. About ThyroSeq. ThyroSeq International. Accessed: February 6, 2023. Available from: <https://thyroseqinternational.com/about-thyroseq>.
80. Silaghi CA, Lozovanu V, Georgescu CE, 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/FULL
81. Afirma Thyroid Molecular Diagnostics. Accessed: February 6, 2023. Available from: <https://www.afirma.com/>.
82. Polyzos SA, Anastasilakis AD. Clinical complications following thyroid fine-needle biopsy: A systematic review. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;71(2):157–165. doi: 10.1111/J.1365-2265.2009.03522.X
83. Cao H, Kao RH, Hsieh MC. Comparison of core-needle biopsy and fine-needle aspiration in screening for thyroid malignancy: A systematic review and meta-analysis. *Curr Med Res Opin.* 2016;32(7):1291–1301. doi: 10.1185/03007995.2016.1170674
84. Zane M, Agostini M, Enzo MV, et al. Circulating cell-free DNA, SLC5A8 and SLC26A4 hypermethylation, BRAFV600E: A non-invasive tool panel for early detection of thyroid cancer. *Biomed Pharmacother.* 2013;67(8):723–730. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2013.06.007

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Рахматуллин Тагир Ирекович;

адрес: Россия, Москва, 119991,

Ломоносовский пр-т, д. 27, корп. 1;

ORCID: 0000-0002-4601-3478;

eLibrary SPIN: 7068-1678;

e-mail: Tagir.rakhmatullin@internet.ru

Соавторы:

Джайн Марк;

ORCID: 0000-0002-6594-8113;

eLibrary SPIN: 3783-4441; e-mail: jain-mark@outlook.com

Самоходская Лариса Михайловна, к.м.н., доцент;

ORCID: 0000-0001-6734-3989;

eLibrary SPIN: 5404-6202; e-mail: slm@fbm.msu.ru

Животов Владимир Анатольевич, к.м.н., доцент;

eLibrary SPIN: 3383-6547; e-mail: opb0321@gmail.com

AUTHORS' INFO

The author responsible for the correspondence:

Tagir I. Rakhmatullin;

address: 27/1 Lomonosovskii prospekt,

119991 Moscow, Russia;

ORCID: 0000-0002-4601-3478;

eLibrary SPIN: 7068-1678;

e-mail: Tagir.rakhmatullin@internet.ru

Co-authors:

Mark Jain;

ORCID: 0000-0002-6594-8113;

eLibrary SPIN: 3783-4441; e-mail: jain-mark@outlook.com

Larisa M. Samokhodskaya, MD, PhD, Associate Professor;

ORCID: 0000-0001-6734-3989;

eLibrary SPIN: 5404-6202; e-mail: slm@fbm.msu.ru

Vladimir A. Zhivotov, MD, PhD, Associate Professor;

eLibrary SPIN: 3383-6547; e-mail: opb0321@gmail.com