

© Team of authors, 2024 / © Коллектив авторов, 2024

3.1.6. Oncology, radiation therapy, 3.1.9. Surgery / 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, 3.1.9. Хирургия

Assessment of the risk of thyroid cancer recurrence using circulating microRNAs

A.B. Alnikin¹, M.A. Engibaryan², A.Yu. Maksimov², A.A. Demidova¹,
N.N. Timoshkina², A.A. Rogachev¹

¹FSBEI HE Rostov State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, Russia

²FSBO National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, Russia

Contacts: Aleksandra Aleksandrovna Demidova – e-mail: alald@inbox.ru

Циркулирующие микроРНК как фактор риска рецидива рака щитовидной железы

А.Б. Альникин¹, М.А. Енгибарян², А.Ю. Максимов², А.А. Демидова¹,
Н.Н. Тимошкина², А.А. Рогачев¹

¹ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, Россия

²ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Контакты: Демидова Александра Александровна – e-mail: alald@inbox.ru

使用循环微RNA评估甲状腺癌复发的风险

A.B. Alnikin¹, M.A. Engibaryan², A.Yu. Maksimov², A.A. Demidova¹,
N.N. Timoshkina², A.A. Rogachev¹

¹FSBEI HE Rostov State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, Russia

²FSBO National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, Russia

通讯作者: Aleksandra Aleksandrovna Demidova – e-mail: alald@inbox.ru

Purpose of the study. To assess the prognostic significance of changes in the expression of microRNAs (miRNAs) in blood serum during the follow-up of patients with malignant tumors of the thyroid gland (thyroid) after radical surgery in order to identify tumors with high and low risk of recurrence.

Material and methods. The study included 138 patients with thyroid nodules identified by ultrasound examination and with an indeterminate cytological report based on fine-needle aspiration biopsy (FNA) (category III-V according to the Bethesda classification). All patients underwent surgical treatment with histological examination of surgical samples of thyroid tissue. Malignant thyroid masses were detected in 63 (45,7%) patients, and benign lesions in 75 (54,3%). Most patients had the initial stages of the malignancy T1-2N0M0 (n=44). The expression of miRNAs was assessed in fine needle aspiration material from the thyroid nodules and in blood serum using real-time PCR. The change in the expression of each miRNA in the substrate was assessed by determining the dCt relative to the reference miRNA-7a (Let-7a). The expression of miRNAs in blood serum was determined over time at 6, 12, 18 months after surgery, and parameters were compared depending on the presence or absence of the disease relapse.

Results. The most pronounced differences in miRNA expression between the samples of benign and malignant thyroid nodules, in the blood serum samples were noted for miRNA-146b, miRNA-222, miRNA-221. During two years of observation, cancer relapse was detected in 7 (11,1%) patients. When thyroid cancer relapsed 6 months after surgery, the expression of miRNA-146b and miRNA-221 increased, while in the absence of relapse it decreased compared to the preoperative level. At the same stage of observation, a unidirectional decrease in the expression of miRNA-222 in the blood serum was established in two subgroups, but the expression value of the marker during disease relapse was higher compared with the relapse-free patients (0,56 [0,25-0,73] versus 0,24 [0,13-0,36], p=0,048). A similar pattern of changes in miRNA expression in the blood was established 12 months after surgery.

Conclusion. Assessment of the expression of miRNA-146b, miRNA-221, and miRNA-222 in blood serum before surgery and 6 and 12 months after surgery has prognostic significance. With an increase in the postoperative level of expression of the studied miRNAs relative to the initial value, the risk of relapse is high, which justifies a subsequent increase in the frequency of postoperative patient examinations.

Key words: thyroid cancer, relapse, microRNA, expression, fine-needle aspiration biopsy, blood serum, molecular genetic study

Conflicts of interest. The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding. There was no funding for this study

For citation: Alnikin A.B., Engibaryan M.A., Maksimov A.Yu., Demidova A.A., Timoshkina N.N., Rogachev A.A. Assessment of the risk of thyroid cancer recurrence using circulating microRNAs. Head and neck. Russian Journal. 2024;12(2):71–79

Doi: 10.25792/HN.2024.12.2.71-79

The authors are responsible for the originality of the data presented and the possibility of publishing illustrative material – tables, drawings, photographs of patients.

Цель исследования. Оценить прогностическую значимость изменения экспрессионной активности микроРНК (миРНК) в сыворотке крови в динамике наблюдения пациентов со злокачественными образованиями щитовидной железы (ЩЖ) после радикальных операций для стратификации опухолей высокого и низкого рисков рецидивирования.

Материал и методы. В исследование были включены 138 пациентов с узловыми образованиями ЩЖ по итогам ультразвукового исследования и неопределенным цитологическим заключением по материалам тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) (III–V категории по классификации Bethesda). Всем больным проводили хирургическое лечение с гистологическим исследованием операционных образцов ткани ЩЖ. У 63 (45,7%) пациентов выявлены злокачественные образования ЩЖ, а у 75 (54,3%) – доброкачественные. По частоте преобладали ($n=44$) начальные стадии злокачественного заболевания T1-2N0M0. Экспрессию миРНК оценивали в тонкоигольном аспирате из узла ЩЖ и в сыворотке крови методом ПЦР в режиме реального времени. Оценка изменения экспрессии каждой миРНК в субстрате проводили путем определения dCt относительно референсной миРНК-7a (Let-7a). Экспрессию миРНК в сыворотке крови определяли в динамике через 6, 12, 18 месяцев после операции и проводили сравнение параметров в зависимости от наличия или отсутствия рецидива заболевания.

Результаты. Наиболее выраженные различия экспрессии миРНК в образцах доброкачественных и злокачественных узлов ЩЖ, сыворотки крови отмечены для миРНК-146b, миРНК-222, миРНК-221. За 2 года наблюдения рецидивы онкологического заболевания выявили у 7 (11,1%) больных. При рецидивировании рака ЩЖ через 6 месяцев после операции экспрессия миРНК-146b и миРНК-221 возрастала, а при отсутствии рецидива снижалась по сравнению с дооперационным уровнем. На этом же этапе наблюдения установлено одностороннее снижение экспрессии миРНК-222 в сыворотке крови в двух подгруппах, но величина экспрессии изучаемого маркера при рецидиве заболевания была выше по сравнению с пациентами с безрецидивным течением болезни: 0,56 [0,25–0,73] против 0,24 [0,13–0,36], $p=0,048$. Аналогичный характер изменения экспрессии миРНК в крови установлен и через 12 месяцев после операции.

Заключение. Оценка экспрессии миРНК-146b, миРНК-221 и миРНК-222 в сыворотке крови до операции и через 6 и 12 месяцев после ее выполнения имеет прогностическую значимость. При повышении послеоперационного уровня экспрессии изучаемых миРНК относительного исходного параметра риск рецидива высокий, что является основанием для последующего повышения кратности послеоперационного обследования пациента.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, рецидив, микроРНК, экспрессия, тонкоигольная аспирационная биопсия, сыворотка крови, мониторинг, молекулярно-генетическое исследование

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Для цитирования. Альникин А.Б., Енгибарян М.А., Максимов А.Ю., Демидова А.А., Тимошкина Н.Н., Рогачев А.А. Циркулирующие микроРНК как фактор риска рецидива рака щитовидной железы. Head and neck. Голова и шея. Российский журнал. 2024;12(2):71–79

Doi: 10.25792/HN.2024.12.2.71-79

Авторы несут ответственность за оригинальность представленных данных и возможность публикации иллюстративного материала – таблиц, рисунков, фотографий пациентов.

研究目的: 评估甲状腺恶性肿瘤患者在根治性手术后, 血清中微RNA (miRNA) 表达变化的预后意义, 以识别复发风险高和低的肿瘤。

材料与方法: 本研究包括138名通过超声检查发现甲状腺结节并且细针抽吸活检 (FNA) 细胞学报告不确定 (Bethesda分类III–V类) 的患者。所有患者均接受了手术治疗, 并对甲状腺组织的手术样本进行了组织学检查。在63名 (45.7%) 患者中检测到恶性甲状腺肿块, 75名 (54.3%) 患者为良性病变。大多数患者的恶性病变初期阶段为T1–2N0M0 ($n=44$)。通过实时PCR技术评估了甲状腺结节的细针抽吸材料和血清中miRNA的表达。通过确定相对于参考miRNA–7a (Let–7a) 的dCt值来评估基质中每个miRNA的表达变化。手术后6、12、18个月定期测定血清中miRNA的表达, 并根据疾病复发与否比较参数。

结果：在良性和恶性甲状腺结节样本中，血清样本中miRNA-146b、miRNA-222和miRNA-221的表达差异最为明显。在两年的观察期间，7名（11.1%）患者检测到癌症复发。当甲状腺癌在手术后6个月复发时，miRNA-146b和miRNA-221的表达增加，而在无复发的情况下，则与术前水平相比有所下降。在相同观察阶段，两个亚组中miRNA-222在血清中的表达均呈单向下调，但疾病复发时标记物的表达值高于无复发患者（0.56 [0.25–0.73]对0.24 [0.13–0.36]， $p=0.048$ ）。手术后12个月，血液中miRNA表达的变化模式与此类似。

结论：手术前以及手术后6个月和12个月测定血清中miRNA-146b、miRNA-221和miRNA-222的表达具有预后意义。与初始值相比，术后这些研究miRNA表达水平的增加与复发风险高相关，这证明了增加术后患者检查的频率是合理的。

关键词：甲状腺癌、复发、微RNA、表达、细针抽吸活检、血清、分子遗传学研究。

利益冲突：作者声明没有任何利益冲突。

资助信息：本研究没有获得任何资助。

引用：Alnikin A.B., Engibaryan M.A., Maksimov A.Yu., Demidova A.A., Timoshkina N.N., Rogachev A.A. Assessment of the risk of thyroid cancer recurrence using circulating microRNAs. *Head and neck. Russian Journal.* 2024;12(2):71–79

Doi: 10.25792/HN.2024.12.2.71-79

作者对所呈现数据的原创性和出版插图材料（包括表格、图画、病人照片）的可能性负责。

Введение

Тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) щитовидной железы (ЩЖ) с последующим цитологическим исследованием аспирата относится к высокоинформативным диагностическим методам выявления злокачественных образований [1]. Однако при неопределенном цитологическом заключении, встречающемся в 30% случаев, диагностика рака ЩЖ, а тем более прогноз течения заболевания, крайне затруднительны [2]. Несмотря на благоприятное течение преобладающего числа гистологических типов рака ЩЖ, рецидивы заболевания встречаются в 30% наблюдений [3]. Для формирования прогноза течения злокачественного заболевания кроме стадии болезни и гистологического типа важен учет результатов молекулярно-генетического исследования биоптатов [4, 5]. Однако в отношении рака ЩЖ анализ известных соматических мутаций не предоставляет информации о риске рецидивирования или метастазирования заболевания [6]. Информация такого рода важна для оценки риска развития самой онкологической патологии. Данное обстоятельство обуславливает актуальность поиска новых информативных неинвазивных маркеров для оценки риска рецидивов рака ЩЖ при мониторинге состояния пациентов после выполнения радикальных операций.

МикроРНК (миРНК) представляют собой короткие эндогенные некодирующие молекулы, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне и могут активировать множество онкогенных путей при различных формах рака [7]. МиРНК связываются с соответствующими им транскриптами, препятствуя их трансляции или вызывая их деградацию, тем самым модулируя клеточные пути онкогенеза [8]. Аберрантная экспрессия миРНК часто наблюдается при злокачественных заболеваниях [9]. Следовательно, дифференциальная экспрессия миРНК считается опухолеспецифичным явлением, которое может отражать поведение опухоли [10]. Соответственно, отдельные миРНК имеют клиническое применение в качестве диагностических либо прогностических маркеров или инструментов для оценки стадии или прогрессирования заболевания

[11, 12]. МиРНК через регуляцию сигнальных путей связаны с пролиферацией, инвазией или метастазированием опухолей, что указывает на то, что миРНК могут рассматриваться как прогностические биомаркеры при раке [13]. Циркулирующие миРНК являются идеальными маркерами для неинвазивного контроля течения заболевания, поскольку экспрессия миРНК является опухолеспецифичной и последовательно отражает картину заболевания [14].

В ранее проведенных исследованиях выявлено, что определенные миРНК имеют повышенную или сниженную экспрессию при раке ЩЖ по сравнению со здоровым контролем [15,16]. Таким образом, миРНК в различных биологических средах могут быть использованы для реализации диагностических задач.

Целью данного исследования было оценить прогностическую значимость изменения экспрессионной активности миРНК в сыворотке крови в динамике наблюдения пациентов со злокачественными образованиями ЩЖ после радикальных операций для стратификации опухолей высокого и низкого риска рецидивирования.

Материал и методы

В исследование включены 138 пациентов с узловыми образованиями ЩЖ по итогам ультразвукового исследования (УЗИ) и неопределенным цитологическим заключением по материалам ТАБ (III–V категории по классификации Bethesda). Число мужчин составило 44 (31,9%), а женщин – 94 (68,1%). Возраст пациентов колебался от 39 до 76 лет, в среднем составив 48,9±2,8 года.

Критерии включения пациентов в исследование: узловые образования ЩЖ по результатам УЗИ, неопределенное цитологическое заключение по материалам ТАБ (III–V категории по классификации Bethesda), хирургическое лечение с гистологическим исследованием операционных образцов ткани ЩЖ.

Критерии исключения: специфическое противоопухолевое лечение на момент исходного исследования миРНК в крови и в операционных образцах ткани, онкологические заболевания иной локализации.

По итогам гистологического исследования операционных образцов ЩЖ у 63 (45,7%) пациентов выявлены злокачественные образования ЩЖ, а у 75 (54,3%) – доброкачественные образования. Среди злокачественных образований ЩЖ по гистологическому типу выделяли папиллярную карциному – 32 (50,8%), фолликулярную карциному – 13 (20,6%), фолликулярный вариант папиллярной карциномы – 12 (19,1%), медуллярную карциному – 6 (9,5%). По частоте преобладали начальные стадии заболевания T1-N0M0 (n=44). Более поздние стадии рака ЩЖ (T3a) были диагностированы у 19 (30%) больных.

Среди доброкачественных образований ЩЖ (n=75) преимущественно встречалась фолликулярная аденома (n=71) и в редких случаях – оксифильная аденома (n=4).

По результатам молекулярно-генетического исследования аспирата у пациентов со злокачественными образованиями ЩЖ (n=63) отсутствие мутаций V600E гена BRAF, а также генов NRAS, HRAS, KRAS установлено у 31 (49,2%) пациента, а наличие мутаций – у 32 (50,8%) больных.

УЗИ ЩЖ осуществляли на аппарате Minifocus 1402 фирмы «BK Medical» (Дания) датчиком, работающим с частотой 12 МГц.

При ТАБ использовали одноразовые иглы 21G (длина 5 см) и иглы 20G (длина 10 см) в зависимости от глубины залегания узла. Цитологический материал на стекле высушивали естественным образом и окрашивали по Майн–Грюнвальду–Гимзе, а далее исследовали с помощью световой микроскопии.

Заключение об отсутствии мутаций V600E гена BRAF, а также генов NRAS, HRAS, KRAS, хромосомных перестроек RET/PTC и

PAX8/PPARG формировали по итогам молекулярно-генетического исследования аспирата методом обратной гибридизации продуктов мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью диагностической панели ThyGenX TEST (Interpace Diagnostics, США).

Экспрессию миРНК оценивали в тонкоигольной аспирате из узла ЩЖ и в сыворотке крови. Тотальную миРНК выделяли с помощью набора реагентов PureLink RNA Mini Kit (Thermo Scientific, США). Общую концентрацию и оценку качества выделенной РНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США). Путем обратной транскрипции получали кДНК, используя набор компании «Альгимед-Техно» (Беларусь). Оценка изменения экспрессии каждой миРНК в субстрате исследовалась методом dCt относительно референсной миРНК-7a (Let-7a) (dCt=2(Ct миРНК-X – Ct миРНК-7a)).

Гистологическое исследование операционных образцов расценивали как «золотой стандарт» диагностики, с которым сравнивали результаты оценки экспрессии миРНК в цитологическом материале и сыворотке крови до операции.

С целью предварительного начального профайлинга опухолю-ассоциированных миРНК для ЩЖ были приготовлены т.н. «пулы». Из 75 образцов РНК, полученных из доброкачественных узлов ЩЖ, смешанных в эквимольных количествах, готовили пул «доброкачественных узлов ЩЖ». Аналогично объединяли РНК в пул «злокачественные узлы» от 63 больных.

Экспрессию миРНК в сыворотке крови определяли в динамике через 6, 12, 18 месяцев после операции. В течение 2 лет

Таблица 1. Экспрессия миРНК (Ме [25-75]) в образцах доброкачественных и злокачественных узлов ЩЖ. Нормализация относительно референсной miR-7a
Table 1: MiRNA expression (Me [25-75]) in samples of benign and malignant thyroid nodules. Normalization relative to the reference miR-7a

миРНК- miRNA-	Доброкачественные опухоли (n=75) Benign tumors (n=75)	Злокачественные опухоли (n=63) Malignant tumors (n=63)	dCtso/dCtдо dCtmt/dCtbt	p
7-2-3p	1,07 [0,9–1,17]	0,48 [0,39–1,03]	0,7	0,012
30d	0,89 [0,75–1,04]	0,46 [0,28–0,57]	0,5	0,034
139-5p	1,23 [1,04–1,45]	3,95 [3,44–4,31]	3,1	<0,001
145-5p	1,17 [1,01–1,32]	4,10 [3,63–5,06]	3,6	<0,001
146b	0,82 [0,72–0,91]	9,56 [8,54–10,16]	11,3	<0,001
148b-3p	1,70 [1,4–1,97]	5,29 [4,73–5,68]	3,2	<0,001
155	1,62 [1,34–1,94]	8,39 [7,39–9,44]	5,2	<0,001
182	1,34 [1,01–1,51]	3,54 [2,62–3,97]	2,6	0,004
183	1,33 [1,04–1,48]	3,31 [3,07–3,74]	2,6	0,008
199a-5p	1,26 [1,03–1,4]	0,72 [0,23–1,32]	0,7	0,002
199a-3p	1,06 [0,82–1,62]	0,81 [0,68–0,9]	0,7	0,009
187	1,29 [1,15–1,45]	5,63 [4,81–6,28]	4,3	<0,001
197	1,72 [1,36–2,26]	5,08 [4,07–6,09]	2,9	<0,001
221	1,47 [1,26–1,73]	11,35 [10,38–12,09]	7,6	<0,001
222	1,52 [1,4–1,69]	15,07 [13,81–16,46]	9,9	<0,001
224	1,76 [1,42–2,11]	6,38 [5,68–6,88]	3,6	<0,001
455-3p	1,17 [0,98–1,36]	0,47 [0,42–0,64]	0,4	0,003
455-5p	1,18 [1,1–1,45]	0,69 [0,6–0,81]	0,6	0,005
484	0,95 [0,78–1,15]	2,90 [2,06–3,22]	2,8	<0,001
542-5p	1,22 [1,02–1,43]	0,54 [0,33–0,86]	0,5	0,006
574-3p	1,32 [1,05–1,7]	0,16 [0,14–0,2]	0,1	<0,001
885-5p	1,32 [1,16–1,48]	22,87 [20,74–23,44]	17,2	<0,001

Примечание. Ме – медиана, [25–75] – межквартильный диапазон, dCtso/dCtдо – относительный показатель экспрессии или кратность изменения экспрессии миРНК в ткани злокачественной опухоли по отношению к аналогичному показателю в доброкачественной опухоли.

Note. Me – median, [25-75] – interquartile range, dCtmt/dCtbt – relative expression value or fold change in the tissue miRNA expression in malignant tumor in relation to the benign tumor.

Таблица 2. Экспрессия миРНК (Me [25-75]) в сыворотке крови у пациентов с доброкачественными и злокачественными образованиями ЩЖ. Нормализация относительно референсной miR-7a
Table 2. miRNA expression (Me [25-75]) in the serum of patients with benign and malignant thyroid nodules. Normalization relative to the reference miR-7a

миРНК- miRNA-	Доброкачественные опухоли (n=75) Benign tumors (n=75)	Злокачественные опухоли (n=63) Malignant tumors (n=63)	dCt30/dCtдо dCtmt/dCtbt	p
885-5p	1,01 [0,89–1,17]	1,19 [1,04–1,27]	1,18	0,583
146b	0,99 [0,86–1,13]	1,25 [1,11–1,48]	1,26	0,045
222	1,13 [0,94–1,28]	2,45 [1,59–2,76]	2,17	<0,001
221	0,08 [0,02–0,15]	0,22 [0,13–0,37]	2,75	0,036

Примечание. Me – медиана, [25–75] – межквартильный диапазон, dCt30/dCtдо – относительный показатель экспрессии или кратность изменения экспрессии миРНК в крови у пациентов с раком ЩЖ по отношению к аналогичному показателю больных с доброкачественными образованиями.
 Note. Me - median, [25-75] - interquartile range, dCtmt/dCtbt - relative expression value or fold change in the blood miRNA expression in patients with thyroid cancer in relation to the patients with benign tumors.

после радикального хирургического вмешательства выявляли наличие рецидивов онкологического заболевания. В качестве рецидивов рассматривали случаи местного рецидива, поражение регионарных лимфоузлов, отдаленные метастазы. Сведения о динамике экспрессии миРНК в сыворотке крови сопоставляли в двух подгруппах пациентов в зависимости от наличия или отсутствия рецидива онкологического заболевания.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью модулей описательной статистики, логистического регрессионного анализа программы Statistica 12.0 (StatSoft, США).

Результаты

По результатам сравнительного анализа экспрессионной активности 170 миРНК диагностической панели ПЦР miRCURY LNA miRNA в ТАБ ЩЖ были выявлены статистически значимые изменения относительно 22 миРНК в злокачественных и доброкачественных образованиях ЩЖ: миРНК-7-2-3p, -30d, -139-5p, -145-5p, -146b, -148b-3p, -155, -182, -183, -199a-5p, -199a-3p, -187, -197, -221, -222, -224, -455-3p, -455-5p, -484, -542-5p, -574-3p, -885-5p (табл. 1).

Наиболее выраженные различия экспрессии миРНК в образцах доброкачественных и злокачественных узлов ЩЖ отмечены для четырех миРНК – миРНК-885-5p, миРНК-146b, миРНК-222, миРНК-221. Относительный показатель или кратность изменения экспрессии миРНК в ткани злокачественной опухоли по отношению к аналогичному показателю в доброкачественной опухоли для миРНК-885-5p составил 17,2 ($p < 0,001$), миРНК-146b – 11,3 ($p < 0,001$), миРНК-222 – 9,9 ($p < 0,001$) и миРНК-221 – 7,6 ($p < 0,001$) (табл. 1). Экспрессия четырех миРНК до операции была исследована и в образцах сыворотки крови (табл. 2). Установлено, что экспрессия трех маркеров – миРНК-146b, миРНК-222 и миРНК-221 в крови у больных злокачественными опухолями была выше ($p < 0,05$) по сравнению с пациентами с доброкачественной патологией ЩЖ.

МиРНК экспрессируются не только в клетках, включая опухолевые, но и образуют циркулирующий пул в различных жидких средах организма (кровь, синовиальная жидкость, плевральная жидкость, десневая жидкость и др.). В крови циркулирующие миРНК в отличие от матричных РНК связаны с белками, заключены в эндосомы или микровезикулы, что объясняет их устойчивость к нуклеазам. Циркулирующие миРНК не являются прямыми продуктами жизнедеятельности опухолевых клеток, поэтому отдельные молекулы при злокачественных заболеваниях могут одновременно сверхэкспрессироваться как в опухолевых клет-

ках, так и в кровотоке (миРНК-146b, миРНК-222 и миРНК-221), а другие миРНК дифференциально экспрессируются только в опухолевых клетках (миРНК-885-5p).

Далее у 63 пациентов с раком ЩЖ экспрессию циркулирующих миРНК определяли после выполнения радикальной операции каждые 6 месяцев в течение двух лет. За 2 года наблюдения рецидивы онкологического заболевания выявили у 7 (11,1%) больных: у 4 больных медуллярной карциномой, 2 пациентов с фолликулярным и у одного больного папиллярным раком ЩЖ. Отмечали местные рецидивы, поражение шейных и подключичных лимфатических узлов, один отдаленный метастаз в легкие в сроки, начиная от 6 месяцев после операции. Ретроспективно рассчитывали величины экспрессии миРНК в крови в динамике наблюдения с учетом наличия или отсутствия рецидива заболевания у пациентов (табл. 3).

По итогам анализа было выявлено, что при рецидивировании рака ЩЖ через 6 месяцев после операции экспрессия миРНК-146b и миРНК-221 возрастала, а при отсутствии рецидива снижалась по сравнению с дооперационным уровнем. На этом же этапе наблюдения установлено однонаправленное снижение экспрессии миРНК-222 в сыворотке крови в двух подгруппах, но величина экспрессии изучаемого маркера при рецидиве заболевания была выше по сравнению с пациентами с безрецидивным течением болезни: 0,56 [0,25–0,73] против 0,24 [0,13–0,36], $p = 0,048$. Аналогичный характер изменения экспрессии миРНК в крови установлен и через 12, а также 18 месяцев после операции. Различная динамика накопления изучаемых миРНК в сыворотке крови больных после операции может быть связана как с дифференциальным уровнем их гиперэкспрессии в тканях, так и с уровнем их связывания с белками в циркулирующих жидкостях, различной востребованностью для регуляции клеточной пролиферации, инвазии опухолевых клеток, эпителиально-мезенхимального перехода и других процессов, связанных с прогрессированием заболевания.

Оценка относительного изменения экспрессии миРНК в крови после операции по сравнению с исходной величиной, выраженная в процентном соотношении, ненадежна, поскольку зависит от исходного абсолютного значения показателя. В связи с этим кратность изменения экспрессии маркеров была прологарифмирована, что стандартизировало динамику параметров. Относительный индекс изменения экспрессии миРНК-146b, миРНК-222 и миРНК-221 через 6 и 12 месяцев после операции по сравнению с исходным уровнем представлен на рисунке.

Таблица 3. Динамика экспрессии миРНК (Ме [25–75]) в сыворотке крови у пациентов с со злокачественными образованиями ЩЖ после операции с учетом рецидива заболевания
 Table 3: Dynamics of miRNA expression (Me [25–75]) in serum of patients with thyroid malignancies after surgery with regard to the disease recurrence

миРНК- miRNA-	Этап Stage	Больные раком ЩЖ (n=63) Thyroid cancer patients		p1
		Рецидив+ (n=7) Relapse+ (n=7)	Рецидив- (n=56) Relapse- (n=56)	
146b	Исходно Baseline	1,27 [1,14–1,38]	1,22 [1,13–1,33]	0,876
	Через 6 мес. After 6 months	1,58 [1,36–1,82]*	0,21 [0,12–0,38]*	0,041
	Через 12 мес. After 12 months	1,46 [1,22–1,61]*	0,25 [0,14–0,39]*	0,032
	Через 18 мес. After 18 months	1,49 [1,35–1,67]*	0,40 [0,21–0,56]*°	0,354
222	Исходно Baseline	2,87 [2,13–3,59]	2,31 [2,10–2,56]	0,327
	Через 6 мес. After 6 months	0,56 [0,25–0,73]*	0,24 [0,13–0,36]*	0,048
	Через 12 мес. After 12 months	1,94 [1,63–2,35]*°	0,27 [0,15–0,40]*	0,036
	Через 18 мес. After 18 months	2,05 [1,72–2,34]*°	0,33 [0,24–0,52]*	0,001
221	Исходно Baseline	0,23 [0,17–0,33]	0,17 [0,06–0,25]	0,163
	Через 6 мес. After 6 months	0,54 [0,41–0,68]*	0,05 [0,01–0,12]	0,368
	Через 12 мес. After 12 months	0,45 [0,35–0,66]*	0,08 [0,04–0,15]	0,049
	Через 18 мес. After 18 months	0,51 [0,42–0,74]*	0,14 [0,11–0,17]	0,648

Примечание. Ме – медиана, [25–75] – межквартильный диапазон, p1 – доверительная вероятность различия между подгруппами в зависимости от наличия или отсутствия рецидива, * – статистически значимые различия относительно исходного уровня, ° – статистически значимые различия относительно показателя на этапе 6 мес. после операции.

Note. Me - median, [25-75] - interquartile range, p1 - confidence level of difference between subgroups depending on the presence or absence of recurrence, * - statistically significant differences from the baseline, ° - statistically significant differences from the value at 6 months postoperatively.

У больных раком ЩЖ наиболее выраженные изменения в крови при рецидивировании заболевания отмечены для уровня миРНК-221 и миРНК-146b (рис. 1).

Таким образом, изменение экспрессии миРНК-146b, миРНК-222 и миРНК-221 в биоптате и сыворотке крови информативно для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных образований ЩЖ до операции. С высоким риском рецидивирования рака ЩЖ было сопряжено повышение экспрессии миРНК-146b и миРНК-221 в сыворотке крови через 6 месяцев после операции. При низком риске рецидивов рака ЩЖ после операции экспрессия миРНК-146b и миРНК-221 снижалась относительно исходного уровня.

В ранее проведенных исследованиях выявлено, что миРНК-221 и -222 сверхэкспрессируются в раковых клетках карциномы ЩЖ и связаны с агрессивными опухолями, неблагоприятными клиническими характеристиками заболевания [17, 18]. Молекула миРНК-146b играет важную роль в прогрессировании опухоли, подавляя BRCA1 [19]. МиРНК-222 и -221 способствуют миграции и инвазии раковых клеток [20]. Существует выраженная корреляция между уровнями миРНК в сыворотке крови и опухолевой ткани для различных опухолей [9] и рака ЩЖ в частности [15, 18]. В проведенном нами исследовании установлен факт многократно повышенной экспрессии миРНК-885-5p, миРНК-146b, миРНК-222, миРНК-221 в аспирационном биоптате у больных раком ЩЖ с одновременным превышением

параметра в сыворотке крови для миРНК-146b, миРНК-222 и миРНК-221.

Полученные результаты свидетельствуют, что повышение экспрессионной активности миРНК-146b, -222 и -221 в крови у больных раком ЩЖ сопряжено с риском рецидива. Данный комплекс дифференциально экспрессируемых миРНК обнаруживается в кровотоке пациентов с раком ЩЖ и способствует выявлению высокого риска прогрессирования заболевания.

Заключение

Профилирование экспрессии миРНК имеет не только диагностическую ценность, но позволяет мониторировать, а также прогнозировать прогрессирование злокачественного процесса в ЩЖ. Полученные результаты исследования являются основанием для рекомендации оценивать экспрессию миРНК-146b, миРНК-221 и миРНК-222 в сыворотке крови у больных раком ЩЖ до операции, а также через 6 и 12 месяцев после ее выполнения с помощью метода ПЦР в режиме реального времени. При повышении послеоперационного уровня экспрессии миРНК-146b и миРНК-221 через 6 и 12 месяцев, а для миРНК-222 спустя 12 месяцев относительно исходного параметра риск рецидива рассматривать как высокий с последующим повышением кратности послеоперационного обследования больных. Через 18 месяцев различия экспрессии миРНК-146b, миРНК-

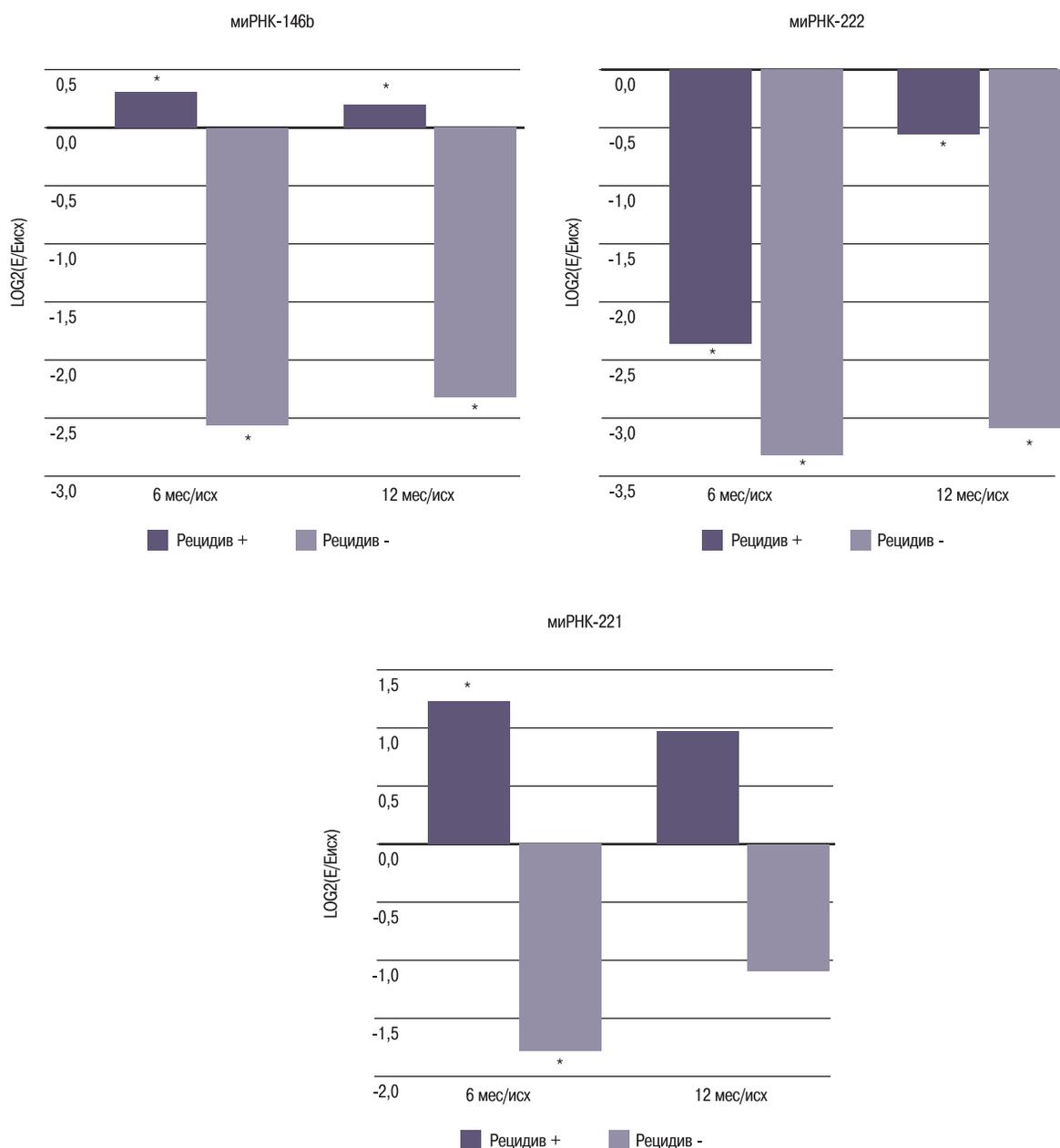


Рис. 1. Относительный индекс изменения экспрессии миРНК-146b, миРНК-222 и миРНК-221 через 6 и 12 месяцев после операции по сравнению с исходным уровнем (\log_2 отношения экспрессии миРНК после операции к экспрессии до операции) у больных злокачественными образованиями ЩЖ с учетом рецидива заболевания.

* – статистически значимое отличие по сравнению с исходным уровнем.

Figure 1. Relative index of miRNA-146b, miRNA-222, and miRNA-221 expression changes 6 and 12 months after surgery compared with the baseline (\log_2 of the ratio of miRNA expression after surgery to pre-surgery expression) in patients with malignant tumors of the thyroid depending on the disease recurrence status.

* - statistically significant difference compared with the baseline.

221 и миРНК-222 в подгруппах в зависимости от наличия или отсутствия рецидива достигают максимума, но предсказательная значимость исследований в отдаленный период снижается ввиду удлинения срока наблюдения за пациентами. В связи с этим прогноз развития рецидива заболевания рекомендуется формировать на основе оценки динамики экспрессии миРНК-146b, миРНК-221 и миРНК-222 в первые 12 месяцев после операции.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Titov S., Demenkov P.S., Lukyanov S.A. Preoperative detection of malignancy in fine needle aspiration cytology (FNAC) smears with indeterminate cytology (Bethesda III, IV) by a combined molecular classifier. *J. Clin. Pathol.* 2020;73(11):722–7. Doi: 10.1136/jclinpath-2020-206445.
2. Steward D.L., Carty S.E., Sippel R.S. Performance of a multigene genomic classifier in thyroid nodules with indeterminate cytology: a prospective

- blinded multicenter study. *JAMA. Oncol.* 2019;5:204–12. Doi: 10.1001/jamaoncol.2018.4616.
3. Рогова М.О., Мартиросян Н.С., Трухина Л.В. и др. Рак щитовидной железы: ретроспективный анализ прооперированных пациентов (опыт одного центра). *Мед. совет.* 2020;9:283–8. Doi: 10.21518/2079-701X-2020-9-283-288 [Rogova M.O., Martirosian N.S., Trukhina L.V., et al. Thyroid cancer: retrospective study of patients with surgical treatment, a single-center experience. *Med. Sov.* 2020;(9):283–8 (In Russ.)].
 4. Сергийко С.В., Лукьянов С.А., Титов С.Е., Верякина Ю.А. Молекулярно-генетическое тестирование в дифференциальной диагностике узловых образований щитовидной железы с цитологическим заключением фолликулярная опухоль Bethesda IV. *Практическая медицина.* 2019;17(4):149–52. Doi: 10.32000/2072-1757-2019-4-149-152. [Sergiyko S.V., Lukyanov S.A., Titov S.E., Ver'yaskina Yu.A. Molecular-genetic testing in differential diagnostics of node lesions in thyroid gland with cytological conclusion of «follicular tumor Bethesda IV». *Praktich. Med.* 2019;17(4):149–52 (In Russ.)].
 5. Lupo M.A., Walts A.E., Sistrunk J.W. Multiplatform molecular test performance in indeterminate thyroid nodules. *Diagn. Cytopathol.* 2020;48(12):1254–64. Doi: 10.1002/dc.24564.
 6. Nikiforova M.N., Mercurio S., Wals A., et al. Analytical performance of the ThyroSeq v3 genomic classifier for cancer diagnosis in thyroid nodules. *Cancer.* 2018;124:1682–90. Doi: 10.1002/cncr.31245.
 7. Семина Е.В., Рысенкова К.Д., Трояновский К.Э. и др. МикроРНК в онкологии: от механизмов регуляции экспрессии генов до перепрограммирования метастатической ниши. *Биохимия.* 2021;86(5):672–88. Doi: 10.31857/S0320972521050055. [Semina E.V., Rysenkova K.D., Troyanovskiy K.E., et al. MicroRNA in oncology: from mechanisms of gene expression regulation to reprogramming of the metastatic niche. *[Biohimiya (Biochemistry).* 2021;86(5):672–688 (In Russ.)].
 8. Сердюкова О.С., Титов С.Е., Малахина Е.С., Рымар О.Д. МикроРНК – перспективные молекулярные маркеры обнаружения рака в узлах щитовидной железы. *Клин. и эксперим. тиреологидология.* 2018;14(3):140–8. <https://doi.org/10.14341/ket9774>. [Serdyukova O.S., Titov S.E., Malahina E.S., Ryamar O.D. MicroRNAs are promising molecular markers for detecting cancer in thyroid nodules. *Klin. Eksp. Tireoidol.* 2018;14(3):140–8 (in Russ.)].
 9. Брага Э.А., Пронина И.В., Филиппова Е.А. и др. Функциональная и клиническая значимость метилирования и экспрессии группы генов микроРНК в опухолях больных метастатическим раком яичников. *Клин. лабораторная диагностика.* 2023;68(1):56–64. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-1-56-64>. [Braga E.A., Pronina I.V., Filippova E.A., et al. Functional and clinical significance of the miRNA gene group methylation and expression in tumors from patients with metastatic ovarian cancer. *Clin. Lab. Diagn.* 2023;68(1):56–64 (in Russ.)].
 10. Лукьянов С.А., Сергийко С.В., Ильина Т.Е. Посттранскрипционные микроРНК в диагностике и персонализации лечения больных опухолями щитовидной железы: обзор литературы. *Пермский медицинский журнал.* 2022;39(5):80–92. Doi: 10.17816/pmj3958092. [Lukyanov S.A., Sergiyko S.V., Ilyina T.E. Posttranscriptional MicroRNAs in diagnostics and personalization of treatment in patients with thyroid tumors: literary review. *Perm. Med. J.* 2022;39(5):80–92 (In Russ.)].
 11. Pishkari S., Paryan M., Hashemi M., et al. The role of microRNAs in different types of thyroid carcinoma: a comprehensive analysis to find new miRNA supplementary therapies. *J. Endocrinol. Invest.* 2018;41(3):269–83. Doi: 10.1007/s40618-017-0735-6.
 12. Silaghi C.A., Lozovanu V., Georgescu C.E. 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.
 13. Park J.H.L., Kim S.H.K., Jeon S., et al. MicroRNA Profile for Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Thyroid Cancer. *Cancers.* 2021;13:632. Doi: 10.3390/cancers13040632.
 14. Лукьянов С.А., Сергийко С.В., Титов С.Е. и др. Стратификация риска рецидива папиллярного рака щитовидной железы на основании результатов молекулярно-генетических исследований. *Опухоли головы и шеи.* 2020;10(1):93–100. Doi: 10.17650/2222-1468-2020-10-1-93-100. [Lukyanov S.A., Sergiyko S.V., Titov S.E., et al. Stratification of papillary thyroid cancer relapse risk based on the results of molecular genetic studies. *Head and Neck Tumors. (HNT).* 2020;10(1):93–100 (In Russ.)].
 15. Bonneau E., Neveu B., Kostantin E., et al. How close are miRNAs from clinical practice? a perspective on the diagnostic and therapeutic market. *EJIFCC.* 2019;30(2):114–27.
 16. Santiago K., Chen Wongworawat Y., Khan S. Differential MicroRNA-Signatures in Thyroid Cancer Subtypes. *J. Oncol.* 2020;2020:2052396. Doi: 10.1155/2020/2052396.
 17. Титов С.Е., Иванов М.К., Цивликова Е.В. и др. Анализ относительной экспрессии гена HMG2 и онкогенной микроРНК-221 в цитологических препаратах, полученных при тонкоигольной аспирационной биопсии узлов щитовидной железы. *Успехи молекулярной онкологии.* 2017;4:24–31. Doi: 10.17650/2313-805X-2017-4-4-24-31. [Titov S.E., Ivanov M.K., Civiikova E.V., et al. Analysis of the relative expression of the HMG2 gene and oncogenic microRNA-221 in cytological preparations obtained by fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *Uspekhi Mol. Onkol.* 2017;4:24–31 (In Russ.)].
 18. Yoruker E.E., Terzioğlu D., Teksoz S., et al. MicroRNA Expression Profiles in Papillary Thyroid Carcinoma, Benign Thyroid Nodules and Healthy Controls. *J. Cancer.* 2016;7(7):803–9. Doi: 10.7150/jca.13898.
 19. Garcia A., Buisson M., Bertrand P., et al. Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO. Mol. Med.* 2011;3279–90. Doi: 10.1002/emmm.201100136.
 20. Князева М.С., Забегина Л.М., Сидина Е.И. и др. Особенности профиля экспрессии микроРНК ткани анапластического рака щитовидной железы. *Вопр. онкологии.* 2021;67(1):70–6. Doi: 10.37469/0507-3758-2021-67-1-70-76. [Knyazeva M.S., Zabegina L.M., Sidina E.I. et al. Micro expression profiling of anaplastic thyroid cancer. *Vopr. Onkol.* 2021;67(1):70–6 (In Russ.)].

Поступила 20.12.2023

Получены положительные рецензии 12.02.24

Принята в печать 05.03.24

Received 20.12.2023

Positive reviews received 12.02.24

Accepted 05.03.24

Вклад авторов. М.А. Енгибарян, А.Ю. Максимов – концепция и дизайн исследования. А.Б. Альникин, А.А. Рогачев – сбор и обработка материала. А.А. Демидова – статистическая обработка данных. А.Б. Альникин – написание текста. Н.Н. Тимошкина, А.Ю. Максимов – редактирование.

Contribution of the authors. M.A. Engibaryan, A.Yu. Maksimov – concept and design of the study. A.B. Alnikin, A.A. Rogachev – collection and processing of the material. A.A. Demidova – statistical data processing. A.B. Alnikin – writing the text. N.N. Timoshkina, A.Yu. Maksimov – editing.

Информация об авторах

Альникин Александр Борисович – к.м.н., доцент, главный врач клиники ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ. Адрес: 344022 Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29; e-mail: alnikin_ab@rostgmu.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6853-766X>.

Енгибарян Марина Александровна – д.м.н., профессор, заведующая отделением опухолей головы и шеи, ФГБУ НМИЦ онкологии Минздрава РФ. Адрес: 344019

Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63; e-mail: rmioi@list.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7293-2358>.

Максимов Алексей Юрьевич – д.м.н., профессор, заместитель генерального директора ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава РФ. Адрес: 344019 Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63; e-mail: aleksei.maxim0w@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1397-837X>.

Демидова Александра Александровна – д.м.н., доцент, заведующая кафедрой медицинской физики, математики и информационных технологий ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ. Адрес: 344022 Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29; e-mail: alald@inbox.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3545-9359>.

Тимошкина Наталья Николаевна – к.биол.н., заведующая лабораторией молекулярной онкологии ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава РФ. Адрес: 344019 Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63; e-mail: n_timoshkina@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6358-7361>.

Рогачев Артем Андреевич – врач-хирург хирургического отделения, ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ. Адрес: 344022 Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29; e-mail: artem.rogachev.92.92@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-0881-5732>.

Information about the authors:

Alexander Borisovich Alnikin – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Chief Physician of the Clinic, Rostov State Medical University of the Ministry of Health

of the Russian Federation. Address: 29 Nakhichevansky pereulok, 344022 Rostov-on-Don; e-mail: alnikin_ab@rostgmu.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6853-766X>.

Marina Aleksandrovna Engibaryan – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Head and Neck Tumors, FSBO National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation. Address: 63 14 Liniya str., 344019 Rostov-on-Don; e-mail: rmioi@list.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7293-2358>.

Alexey Yurievich Maksimov – Doctor of Medical Sciences, Professor, Deputy General Director, FSBO National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation. Address: 63 14 Liniya str., 344019 Rostov-on-Don; e-mail: aleksei.maxim0w@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1397-837X>.

Aleksandra Aleksandrovna Demidova – Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Medical Physics, Mathematics and Information Technologies, Rostov State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. Address: 29 Nakhichevansky pereulok, 344022 Rostov-on-Don; e-mail: alald@inbox.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3545-9359>.

Natalya Nikolaevna Timoshkina – Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Oncology, FSBO National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation. Address: 63 14 Liniya str., 344019 Rostov-on-Don; e-mail: n_timoshkina@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6358-7361>.

Artem Andreevich Rogachev – Surgeon, Surgical Department, Rostov State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. Address: 29 Nakhichevansky pereulok, 344022 Rostov-on-Don; e-mail: artem.rogachev.92.92@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-0881-5732>.