

УДК 616.44-006-071-092-018:577.216

ПЕРВЫЙ ОПЫТ ПОЛУЧЕНИЯ микроРНК ИЗ НЕФИКСИРОВАННОЙ ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

*Якубовский С. В.¹, Кипень В. Н.², Фридман М. В.^{1,3}, Кондратович В. А.³,
Буракова А. А.², Добыш О. И.², Лемеш В. А.², Кондратенко Г. Г.¹*

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь;

²Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии
Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь;

³Учреждение здравоохранения «Минский городской клинический онкологический центр»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. МикроРНК — разновидность некодирующих РНК, регулирующих экспрессию множества генов. Показана роль этих молекул в качестве важных диагностических и прогностических маркеров рака различной локализации. До недавнего времени в Беларуси опыт работы с микроРНК отсутствовал. Собственное исследование имело целью восполнить этот пробел.

Использовано 11 образцов опухолевой ткани, а также 11 образцов нормальной ткани щитовидной железы. Выполнено прямое сравнение двух методов выделения микроРНК — сорбционного, на колонке с кремниевым фильтром (LRU-100-50; Biolabmix, Россия), и экстракционного по Хомчинскому (РНК-ЭКСТРАН; «Синтол», Россия). Изучена экспрессия miR-21, miR-31, miR-144, miR-146b, miR-181b, miR-187, miR-199b, miR-200a, miR-200b, miR-205, miR-221, miR-222, miR-375. В ткани папиллярной карциномы выявлена гиперэкспрессия всех изученных микроРНК; в ткани медуллярной карциномы экспрессия miR-21, miR-31, miR-199b и miR-205 была подавлена. Установлена значимая корреляция ($r = 0,773$, $p = 0,00000368$, $R^2 = 0,627$) показателей экспрессии микроРНК при использовании обоих методов, однако применение сорбционного метода позволило получить микроРНК с меньшим содержанием посторонних примесей.

Разработанная методика предоставляет возможность изучать изменение экспрессии микроРНК в опухолевой ткани по отношению к нормальной ткани щитовидной железы. Имеющиеся расхождения в характере изменения экспрессии микроРНК требуют выполнения дальнейших исследований.

Ключевые слова: микроРНК, рак щитовидной железы, щитовидная железа, узлы щитовидной железы, молекулярно-генетические исследования.

Введение. Рак щитовидной железы (РЩЖ) занимает первое место по заболеваемости злокачественными новообразованиями органов эндокринной системы, и его частота постоянно растет. Дифференциальная диагностика узловой формы РЩЖ и прочих опухолевых и опухолеподобных заболеваний нередко приводит к ошибкам в лечебной тактике [1]. Доступность и растущая разрешающая способность ультразвуковых аппаратов приводят к обнаружению все большего количества узловых образований щитовидной железы, что позволило ряду авторов называть это явление «эпидемией» и рассуждать

о гипердиагностике (обнаружение рака на доклинической стадии развития заболевания) и избыточном лечении (нет увеличения продолжительности жизни при том, что снижается ее качество) [1].

Узловые образования щитовидной железы, подозрительные на малигнизацию, подвергаются тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) с последующим цитологическим исследованием полученных клеток [1]. Изучение клеточной морфологии позволяет подтвердить доброкачественный или злокачественный характер узла в 70–75 % случаев, тогда как остальные аспираты

относятся к одной из трех категорий неопределенного (по системе Bethesda) цитологического заключения: Bethesda III, IV и V с ожидаемым риском обнаружения рака на уровне 5–15 %, 20–30 % и 50–75 % соответственно [1]. Относительно низкая ценность цитологического анализа затрудняет выбор оптимального консервативного или хирургического лечения этих пациентов, и многие из них подвергаются хирургическим вмешательствам, которые можно было бы избежать.

МикроРНК представляют собой недавно идентифицированный класс эндогенных некодирующих РНК. Это короткие (18–24 нуклеотида) молекулы, регулирующие экспрессию множества генов на транскрипционной и посттранскрипционной стадиях [2]. Специфичные для каждого гистологического типа РЩЖ-паттерны экспрессии микроРНК были идентифицированы [2]. Вместе с тем было показано, что профиль экспрессии микроРНК в значительной степени зависит от условий окружающей среды и генетико-популяционной структуры исследуемых групп пациентов [3]. Последнее свидетельствует о необходимости изучения молекулярно-генетических характеристик узловых образований у пациентов различной расовой принадлежности и проживающих в разных регионах мира. Кроме того, вариабельность в распространенности РЩЖ в цитологических образцах настолько значительно влияет на показатели диагностической эффективности существующих панелей, что современные клинические протоколы рекомендуют учитывать этот факт в клинической практике конкретного лечебного учреждения [1].

Необходимость изучения молекулярно-генетического ландшафта узловых образований щитовидной железы у населения Республики Беларусь очевидна.

Цель работы — разработка и освоение методики изучения экспрессии микроРНК в ткани щитовидной железы (нефиксированные, замороженные образцы), оценка сопоставимости результатов исследования, проведенного при помощи двух альтернативных наборов для выделения тотальной РНК, включая микроРНК.

Материалы и методы. *Образцы ткани щитовидной железы.* Было исследовано

11 образцов опухолевой ткани ЩЖ (опытная группа), удаленной у пациентов, оперированных по поводу папиллярного (9 образцов) и медуллярного (2 образца) РЩЖ, а также 11 образцов видимо неизменной ткани щитовидной железы у этих же пациентов — контрольная группа.

Выделение РНК. Выделение РНК производилось с использованием двух наборов: LRU-100-50 (Biolabmix, Россия) и РНК-ЭКСТРАН («Синтол», Россия).

Набор LRU-100-50 (Biolabmix, Россия) предназначен для выделения и очистки суммарной РНК и малых форм РНК (до 200 н.т., включая микроРНК). Набор сочетает методы фенол-хлороформной экстракции нуклеиновых кислот и их селективной сорбции на кремниевой мембране. Лизис образца происходит в специальном реагенте «Лира», содержащем фенол и гуанидин тиоцианат. Полученная гомогенная смесь после смешивания с хлороформом разделяется на нижнюю органическую фазу, интерфазу и верхнюю водную фазу. Содержащаяся РНК сорбируется на колонке с кремниевым фильтром в водной фазе.

Принцип выделения РНК с использованием набора РНК-ЭКСТРАН («Синтол», Россия) основан на кислой фенольной экстракции по Хомчинскому, при которой в водной фазе остается только РНК, а ДНК в комплексе с белками переходит в органическую фазу. В качестве лизирующего и денатурирующего клеточные нуклеазы агента используется гуанидина тиоцианат.

Выделение суммарной РНК проводили из $26,82 \pm 12,57$ мг ткани, для каждого пациента исследовалась нормальная (N) и опухолевая (T) ткань. С использованием набора LRU-100-50 (Biolabmix, Россия) средняя концентрация РНК составила $54,81 \pm 18,69$ нг/мкл, с использованием набора РНК-ЭКСТРАН («Синтол», Россия) — $253,47 \pm 129,28$ нг/мкл.

Методика изучения экспрессии микроРНК в ткани щитовидной железы. Этап 1. «Выделение микроРНК». В связи с тем, что сорбционный метод с использованием набора LRU-100-50 (Biolabmix, Россия) позволяет получить микроРНК с меньшим количеством посторонних примесей, нами сформирован итоговый протокол (методика) выделения и очистки суммарной РНК и малых

форм РНК (включая микроРНК) из ткани щитовидной железы (нефиксированные, замороженные образцы), который состоит из последовательных действий: 1) гомогенизировать образец в реагенте «Лири» до получения однородной смеси; 2) центрифугировать лизат в течение 10 мин при 10 000 g; 3) перенести супернатант в чистую пробирку и добавить 200 мкл хлороформа; 4) перемешивать на вортексе в течение 15 с; инкубировать 5 мин, периодически перемешивая вручную; 5) центрифугировать в течение 10 мин. После центрифугирования смесь разделится на нижнюю фазу (органическую), интерфазу и верхнюю фазу (водная); 6) аккуратно перенести водную фазу, содержащую РНК, в чистую пробирку; 7) к водной фазе добавить равный объем 96–99 % этанола, перемешать пипетированием, нанести не более 700 мкл образца на спин-колонку (если образовался осадок, то его также нанести на колонку). Центрифугировать в течение 30 с. Фильтрат внести в спин-колонку повторно. Центрифугировать в течение 30 с. Фильтрат удалить; 8) нанести на спин-колонку 500 мкл буфера для промывки (с этанолом). Центрифугировать 30 с, фильтрат удалить; 9) повторить п. 8; 10) центрифугировать спин-колонку в течение 3 мин для полного удаления следов этанола; 11) перенести спин-колонку в новую пробирку на 1,5 мл. Аккуратно нанести на центр фильтра спин-колонки 60 мкл буфера для элюции. Инкубировать 1 мин при температуре 37 °С. Центрифугировать 2 мин. Фильтрат содержит очищенную РНК и следовые количества ДНК. Провести обработку препарата ДНКазой.

Этап 2. «Обратная транскрипция». Внести в пробирку на 0,2 мл: 5 мкл образца РНК, 0,2 мкл 10 нмоль раствора специфического праймера для микроРНК, 2,5 мкл 10ЧТГ буфера, 0,5 мкл смеси дНТФ (конечная концентрация каждого дНТФ — 500 мкМ), 1,5 мкл MgCl₂ (конечная концентрация —

3 мМ), 0,2 мкл ArtMMLV ревертазы (количество в реакции — 40 единиц активности фермента). Довести объем до 25 мкл с использованием воды, свободной от нуклеаз. Перемешать содержимое пробирки пипетированием. Инкубировать в течение 60 мин при 42 °С. Нагреть до 95 °С в течение 5 мин для инактивации фермента.

Этап 3. «Количественная ПЦР». Внести в пробирку 10,0 мкл буфера ArtMix (конечная концентрация — ×1, референсный краситель ROX входит в состав буфера), 0,4 мкл 10 нмоль раствора F-праймера (конечная концентрация — 200 нМ), 0,4 мкл 10 нмоль раствора R-праймера (конечная концентрация — 200 нМ), матрица кДНК — 2 мкл, 0,04 мкл EvaGreen (конечная концентрация — 0,2 мкМ). Довести объем до 20 мкл с использованием воды, свободной от нуклеаз. Перемешать содержимое пробирки пипетированием. Программа амплификации: 2 мин — 95 °С, 40 циклов: 10 с — 95 °С, 60 с — 60 °С. Далее следует этап плавления ампликонов (Melt Curve Stage), с помощью которого осуществляли оценку специфичности ПЦР: последовательное повышение температуры в диапазоне 60–95 °С (0,15 °С/с) с одновременным считыванием сигнала флуоресценции.

Этап 4. «Расчет изменения уровня экспрессии микроРНК». Для анализа графиков, полученных при проведении количественной ПЦР, использован метод прямого сравнения графиков Cp (crossing point), который реализован в программе LinRegPCR v.11.0 [4]. Оценку изменения уровня экспрессии микроРНК в опытном образце по отношению к контрольному вычисляли по стандартной формуле [5].

Анализ экспрессии микроРНК. В образцах опухолевой и нормальной ткани определяли содержание 13 микроРНК, которые были выбраны для исследований на основании анализа литературных данных (таблица 1).

Таблица 1 — Перечень исследованных микроРНК

МикроРНК	Индивидуальный номер*	Хромосомная локализация**
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	chr17: 59841266-59841337 [+]
hsa-miR-31-5p	MIMAT0000089	chr9: 21512115-21512185 [-]
hsa-miR-144-5p	MIMAT0004600	chr17: 28861533-28861618 [-]
hsa-miR-146b-5p	MIMAT0002809	chr10: 102436512-102436584 [+]
hsa-miR-181b-5p	MIMAT0000257	chr1: 198858873-198858982 [-]

Окончание табл. 1

МикроРНК	Индивидуальный номер*	Хромосомная локализация**
hsa-miR-187-3p	MIMAT0000262	chr18: 35904818-35904926 [-]
hsa-miR-199b-5p	MIMAT0000263	chr9: 128244721-128244830 [-]
hsa-miR-200a-3p	MIMAT0000682	chr1: 1167863-1167952 [+]
hsa-miR-200b-3p	MIMAT0000318	chr1: 1167104-1167198 [+]
hsa-miR-205-5p	MIMAT0000266	chr1: 209432133-209432242 [+]
hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	chrX: 45746157-45746266 [-]
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	chrX: 45747015-45747124 [-]
hsa-miR-375-3p	MIMAT0000728	chr2: 219001645-219001708 [-]

 * <https://www.mirbase.org/>.

** GRCh38.

Для синтеза кДНК на матрице микроРНК использовали набор ArtMMLV Total (АртБиоТех, Беларусь) с применением специфичных олигонуклеотидов (праймеров). Реакцию обратной транскрипции проводили в двух повторах для каждого образца с последующим объединением полученных смесей. Далее проводили ПЦР в двух повторах для каждого образца с использованием мастер-микса ArtMix (АртБиоТех, Беларусь) на амплификаторе QuantStudio 5 (Applied Biosystems, США). Для нормализации результатов экспрессии микроРНК использовали малую РНК U6, стабильно экспрессирующуюся в нормальной и опухолевой тканях. В качестве интеркалирующего красителя использовали EvaGreen (Jena Bioscience, Германия). Далее следовал этап плавления ампликонов (Melt Curve Stage), с помощью которого осуществляли первичную оценку специфичности ПЦР. Для итоговой оценки специфичности ПЦР ампликоны разделяли электрофорезом в 2,0%-м агарозном геле при напряжении 100 В в течение 60 мин. В качестве интеркалирующего красителя использовали бромистый этидий (EtBr, Ethidium bromide). Результаты электрофореза документировали с помощью системы E-Box CX5 (Vilber, Германия), программное обеспечение E-Box CX5 TS Edge 18.01. В результате для всех генетических маркеров было показано наличие специфического ампликона, неспецифические продукты амплификации отсутствовали. Воспроизводимость определялась путем двукратного определения экспрессии микроРНК в одном и том же образце, вычислении среднего, и определении разницы между значениями, которая не должна превышать 0,5 цикла.

Статистический анализ. Для анализа графиков, полученных при проведении ПЦР, использован метод прямого сравнения графиков Cp (crossing point), который реализован в программе LinRegPCR v.11.0 [4]. Оценку изменения уровня экспрессии микроРНК в опытном образце по отношению к контрольному вычисляли по стандартной формуле [5].

С целью оценки сопоставимости результатов изучения экспрессии микроРНК при помощи наборов LRU-100-50 (Biolabmix, Россия) и РНК-ЭКСТРАН («Синтол», Россия) выполнялся корреляционный анализ по Спирмену. Значения изменений экспрессии микроРНК были нормализованы с использованием преобразования к натуральному логарифму. Статистический анализ данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel 2019 и SPSS v.20.0 (IBM, США).

Источники финансирования. Исследование выполнено в рамках государственной программы научных исследований (ГПНИ) «Биотехнологии-2», подпрограмма 3.2 «Геномика, эпигеномика, биоинформатика», задание «Изучение молекулярногенетического профиля узловых образований щитовидной железы» № ГР 20220367 от 28.03.2022 (сроки выполнения 2022–2023 гг.).

Этическая экспертиза. Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике УО «Белорусский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (протокол № 9 от 23 марта 2022 г.).

Результаты и их обсуждение. Изменение экспрессии микроРНК в ткани щитовидной железы. Результаты определения содержания

микроРНК в образцах опухоли по отношению к нормальной ткани относительно нормализатора U6 (с учетом эффективности ПЦР) представлены на рисунках 1 и 2.

При использовании набора РНК-ЭКСТРАН все изученные микроРНК продемонстрировали тенденцию к гиперэкспрессии в ткани папиллярной карциномы, в то время как в ткани медуллярной карциномы экспрессия miR-21, miR-31, miR-199b,

miR-200b и miR-205 была подавлена (рисунок 1).

Исходя из полученных данных (рисунок 2), при использовании набора LRU-100-50, все изученные микроРНК также продемонстрировали тенденцию к гиперэкспрессии в ткани папиллярной карциномы, в то время как в ткани медуллярной карциномы экспрессия miR-21, miR-31, miR-199b и miR-205 была подавлена.

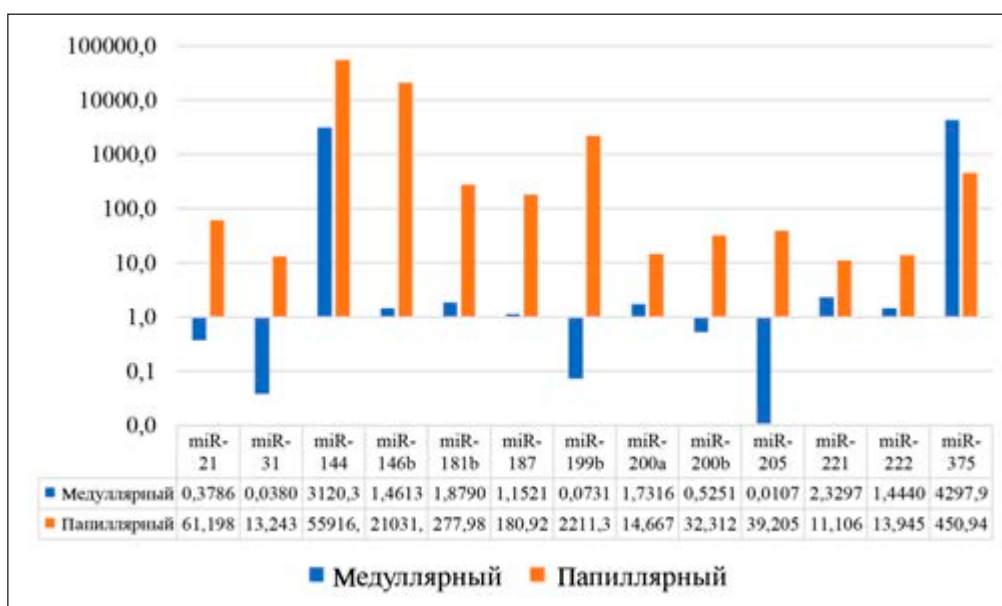


Рисунок 1 — Анализ экспрессии микроРНК в опухолевой ткани щитовидной железы с использованием набора РНК-ЭКСТРАН («Синтол», Россия)

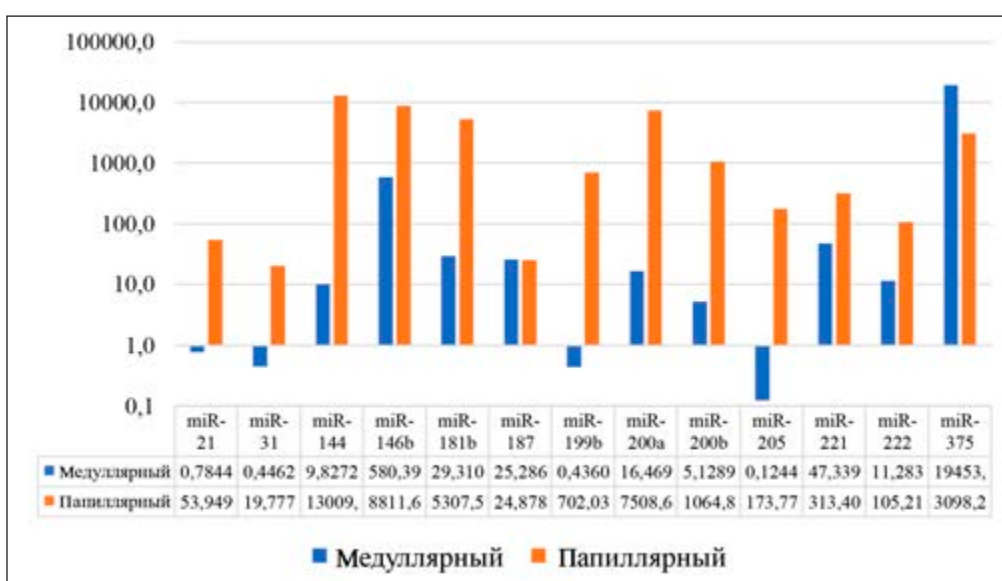


Рисунок 2 — Анализ экспрессии микроРНК в опухолевой ткани щитовидной железы с использованием набора LRU-100-50 (Biolabmix, Россия)

При сравнении значений C_p (crossing point), рассчитанных в программе LinRegPCR v.11.0, было выявлено, что для большинства анализируемых микроРНК C_p на 0,1–0,5 относительные единицы меньше в случае использования набора для выделения LRU-100-50, что может свидетельствовать о меньшем количестве посторонних примесей, ингибирующих ПЦР, в получаемом образце микроРНК.

Оценка сопоставимости результатов изучения экспрессии микроРНК в ткани щитовидной железы. Парные значения (для двух наборов) изменения экспрессии микроРНК, нормализованные с использованием преобразования к натуральному логарифму, представлены на рисунке 3. В результате, коэффициент ранговой корреляции Спирмена составил 0,773 ($p = 0,00000368$), коэффициент детерминации $R^2 = 0,627$ (рисунок 3).

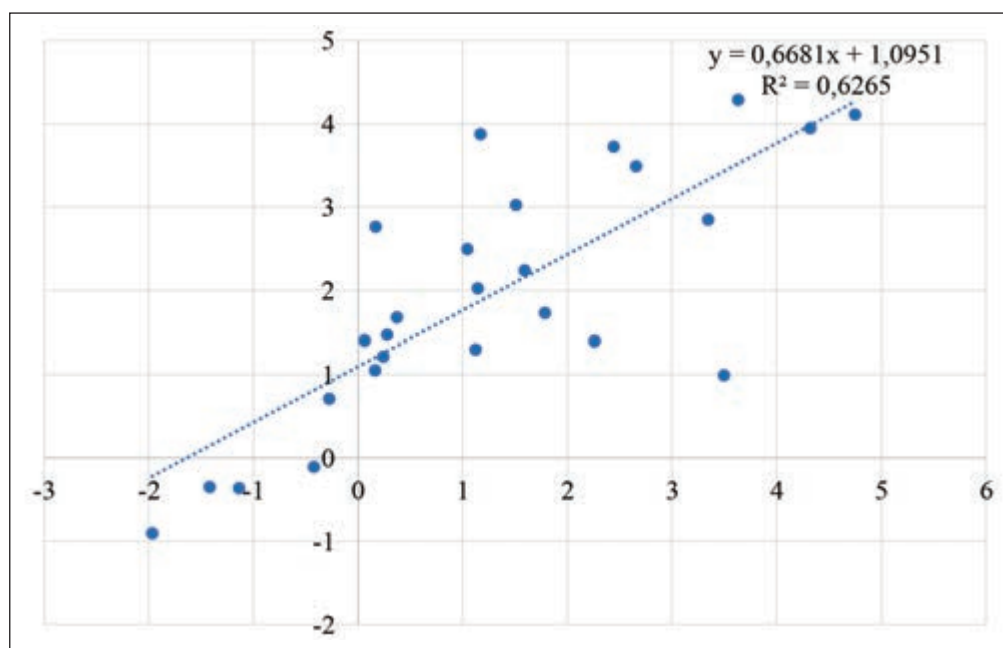


Рисунок 3 — Корреляция результатов анализа экспрессии микроРНК, выполненного при помощи двух наборов для выделения РНК

Таким образом, несмотря на имеющуюся разницу в экспрессии микроРНК, определенную с использованием двух наборов, нормализованные данные статистически значимо и высоко скоррелированы, что подтвердило наше предположение. В то же время для объяснения причин некоторых расхождений потребуются дальнейшие исследования с использованием синтетических микроРНК и построения калибровочных прямых, отражающих зависимость C_p от количества матрицы.

В дальнейших исследованиях данный протокол (методика) будет адаптирован для оценки экспрессии микроРНК при анализе фиксированных формалином и залитых парафином гистологических препаратов и фиксированных цитологических препаратов.

Аберрантная экспрессия микроРНК играет важную роль в пролиферации, дифференцировке, инвазии, миграции и апоптозе раковых клеток, что дает возможность использования микроРНК в дифференциальной диагностике узловых образований щитовидной железы.

В ходе данного исследования была разработана методика выделения микроРНК из замороженной нефиксированной ткани щитовидной железы и изучена экспрессия ряда микроРНК, выбранных на основании анализа научных литературных данных как наиболее характерных для карцином щитовидной железы и играющих значительную роль в процессах канцерогенеза.

Экспрессия miR-21 является одной из наиболее важных онкогенных микроРНК в

процессе канцерогенеза. Была установлена корреляция сверхэкспрессии miR-21 в ткани папиллярной карциномы с экстрагистреоидным распространением, метастазами в лимфатические узлы. В ткани медуллярной карциномы также наблюдаются значительно более высокие уровни экспрессии miR-21, чем в нормальной ткани щитовидной железы, что говорит о том, что miR-21 действует как проонкогенная микроРНК [6]. Как видно из полученных нами данных (см. рисунки 1, 2), оба использованных набора позволили зафиксировать гиперэкспрессию miR-21 в ткани папиллярной карциномы, что соответствует доступным нам научным литературным данным. В то же время в образцах медуллярной карциномы отмечалось снижение экспрессии miR-21, что не согласуется с данными других авторов, однако может быть следствием небольшой выборки.

MiR-31 также является хорошо известной проонкогенной микроРНК. Считается, что ее гиперэкспрессия влияет на активность элементов сигнального MAPK-каскада (mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемой протеинкиназы), что приводит к возникновению папиллярной карциномы. Продемонстрирована корреляция экспрессии miR-31 с агрессивным течением папиллярного рака, в частности локальным рецидивом и лимфогенным метастазированием. Вместе с тем функция miR-31 является тканеспецифичной, и при ряде злокачественных новообразований, включая медуллярный рак щитовидной железы, продемонстрировано снижение ее экспрессии. Оба использованных набора позволили зафиксировать гиперэкспрессию miR-31 в ткани папиллярной карциномы и сниженную экспрессию в ткани медуллярного рака.

Экспрессия miR-144 является еще одной микроРНК, экспрессия которой усиливается или подавляется в зависимости от вида ткани. Показано, что miR-144 в ткани папиллярной карциномы ингибирует клеточную пролиферацию, блокируя сигнальный путь Hippo, регулирующий пролиферацию и апоптоз клеток, в то время как в ткани медуллярной карциномы эффекты miR-144, по-видимому, обусловлены активацией PI3K/Akt сигнального каскада. В ткани папиллярной карциномы ранее было продемонстрировано

снижение экспрессии miR-144. Напротив, в ткани медуллярной карциномы наблюдалась ее гиперэкспрессия, что дало возможность предложить miR-144 в качестве диагностического маркера медуллярного рака щитовидной железы. Оба набора (см. рисунки 1, 2) зафиксировали гиперэкспрессию miR-144 во всех исследованных образцах, что согласуется с научными литературными данными лишь при медуллярной карциноме.

Механизм действия проонкогенной микроРНК miR-146b заключается в усилении клеточной пролиферации путем модуляции синтеза трансформирующего фактора роста бета (Transforming growth factor beta, TGF-beta). Для miR-146b характерна гиперэкспрессия в ткани папиллярного РЩЖ; она является независимым фактором риска при папиллярной карциноме наряду со стадией процесса и наличием лимфогенных метастазов. Для медуллярного рака щитовидной железы данная микроРНК не рассматривается в качестве диагностически значимой. Проведенные нами исследования позволили зафиксировать гиперэкспрессию miR-146b (см. рисунки 1, 2) в ткани папиллярной карциномы обоими использованными наборами, что соответствует литературным данным. Однако в случае медуллярной карциномы отмечены разнонаправленные тенденции в оценке степени экспрессии miR-146b: набор для выделения РНК LRU-100-50 продемонстрировал гиперэкспрессию данной микроРНК, в то время как РНК-ЭКСТРАН показал отсутствие существенных изменений в экспрессии, что в большей степени соответствует данным научной литературы [7].

Экспрессия miR-181b была одна из первых микроРНК, гиперэкспрессия которой была описана при папиллярном раке. Экспрессия этой микроРНК усиливает пролиферацию опухолевых клеток за счет подавления белка СВХ7, который действует как супрессор опухолевого роста. При медуллярном раке щитовидной железы в доступной литературе не обнаружено данных о значимом изменении экспрессии miR-181b [7]. Согласно данным, представленным на рисунках 1, 2, с помощью обоих наборов выявлена гиперэкспрессия miR-181b в ткани папиллярной карциномы, что согласуется со сведениями других исследователей, представленными в специальной литературе.

Для папиллярной карциномы miR-187 также является проонкогенной; она стимулирует клеточную пролиферацию и предотвращает апоптоз раковых клеток. При медуллярном раке лишь в одном доступном нам исследовании удалось выявить значимое увеличение экспрессии miR-187 [7], но наблюдалась эта гиперэкспрессия лишь у 25 % пациентов. В наших исследованиях оба использованных набора позволили установить гиперэкспрессию miR-187 в ткани папиллярной карциномы. В ткани медуллярной карциномы наблюдалась разнонаправленная тенденция: набор для выделения РНК LRU-100-50 продемонстрировал экспрессию данной микроРНК, сопоставимую с результатами, полученными для папиллярной карциномы, в то время как РНК-ЭКСТРАН показал отсутствие существенных изменений в ее экспрессии.

Экспрессия miR-199b является известной противоопухолевой микроРНК, экспрессия которой снижается как при папиллярной и фолликулярной, так и в некоторых исследованиях — при медуллярной карциноме [1]. С помощью обоих наборов нами зафиксирована гиперэкспрессия miR-199b в ткани папиллярной карциномы, что не согласуется с доступными литературными данными, но подтверждено подавление ее экспрессии в ткани медуллярной карциномы.

Семейство miR-200a/b/c относится к супрессорным, уменьшение их экспрессии увеличивает содержание фактора роста опухолей β (TGF β) и стимулирует миграцию и инвазию клеток опухоли, что наблюдается при анапластическом и метастатическом медуллярном раке щитовидной железы. При высокодифференцированном раке щитовидной железы, а некоторыми исследователями и при медуллярной карциноме [1] установлено повышение экспрессии микроРНК, относящихся к этому семейству. При использовании обоих наборов нами выявлена гиперэкспрессия miR-200a/b в ткани папиллярной карциномы, но были продемонстрированы противоположные результаты при исследовании образцов ткани медуллярной карциномы.

Относительно недавно установлено, что miR-205 проявляет супрессорные функции по отношению к ткани папиллярной карциномы путем подавления ангиогенеза и кле-

точной пролиферации. В ряде исследований ранее было выявлено усиление экспрессии данной микроРНК в ткани папиллярной карциномы, а также снижение ее экспрессии в ткани медуллярной карциномы [1]. Оба использованных набора позволили зафиксировать изменения экспрессии miR-205 в исследованных образцах, соответствующие вышеуказанным литературным сведениям.

В ряде исследований было установлено, что для кластера miR-221/222 характерна гиперэкспрессия как в ткани папиллярной карциномы, для которой он был предложен в качестве независимого фактора риска рецидива, так и в ткани медуллярной карциномы. Полученные нами данные с использованием обоих наборов позволили зафиксировать аналогичные изменения экспрессии miR-221/222 в исследованных образцах [7].

Экспрессия miR-375 также является хорошо известным диагностическим маркером различных видов карцином щитовидной железы, включая медуллярную. MiR-375 является проонкогенной и вызывает клеточную пролиферацию путем модулирования PI3K/Akt сигнального каскада. Выявлено повышение экспрессии этой микроРНК и в ткани папиллярной карциномы. Изучение экспрессии miR-375 в исследованных образцах при использовании обоих наборов позволили зафиксировать изменения, согласующиеся с другими научными литературными источниками [7].

Закключение. На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Разработанная и освоенная методика выделения микроРНК из замороженной ткани щитовидной железы позволяет изучить изменение экспрессии микроРНК в опухолевой ткани по отношению к условно нормальной ткани щитовидной железы. Полученные результаты для большинства изученных микроРНК соответствуют описанным в научной литературе данным.

2. Имеющиеся расхождения в характере изменения экспрессии микроРНК с ранее опубликованными результатами исследований требуют дальнейшего изучения с увеличением количества образцов, а также использования синтетических микроРНК в качестве контрольных образцов с заведомо

известной концентрацией и построением калибровочных прямых, отражающих зависимость Ср от количества матрицы.

3. Данные, полученные при использовании наборов для выделения РНК LRU-100-50 (Biolabmix, Россия) и РНК-ЭКСТРАН («Синтол», Россия), статистически значимо и высоко скоррелированы, что подтверждает наше предположение о сопоставимости получаемых при их использовании результатов. Сорбционный метод

с использованием набора LRU-100-50 (Biolabmix, Россия) позволяет получить микроРНК с меньшим количеством посторонних примесей. В дальнейших исследованиях необходимо адаптировать протокол использования данного набора для выделения микроРНК при анализе биологического материала фиксированных формалином и залитых парафином гистологических препаратов, а также биологического материала фиксированных цитологических препаратов.

С ПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer / B. R. Haugen [et al.] // *Thyroid*. — 2016. — Vol. 26, № 1. — P. 1–133.
2. Nikiforova, M. N. MicroRNA expression profiles in thyroid tumors / M. N. Nikiforova, S. I. Chiosea, Y. E. Nikiforov // *Endocr Pathol*. — 2009. — Vol. 20, № 2. — P. 85–91.
3. American Thyroid Association Statement on Surgical Application of Molecular Profiling for Thyroid Nodules: Current Impact on Perioperative Decision Making / R. L. Ferris [et al.] // *Thyroid*. — 2015. — Vol. 25, № 7. — P. 760–768.
4. LinRegPCR (11.0). Analysis of quantitative RT-PCR data [Electronic resource]. — Mode of access: https://www.gene-quantification.de/LinRegPCR_help_manual_v11.0.pdf. — Date of access: 26.04.2023.
5. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res*. — 2001. — Vol. 29, № 9. — P. 45.
6. The PDCD4/miR-21 pathway in medullary thyroid carcinoma / G . Pennelli [et al.] // *Hum. Pathol*. — 2015. — Vol. 46. — P. 50–57.
7. Профили экспрессии микроРНК и мутации генов BRAF V600E и RET-PTC1 в новообразованиях щитовидной железы разного типа / С. Е. Титов [и др.] // *Новости «Вектор-Бест»*. — 2015. — Т. 78, № 4 — С. 2–8.

First experience of microrna detection in frozen thyroid tissue in the Republic of Belarus

Yakubouski S. U.¹, Kipen V. N.², Fridman M. V.^{1,3}, Kondratovich V. A.³, Byrakova A. A.², Dobysh O. I.², Lemesh V. A.², Kandratsenka H. H.¹

¹*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;*

²*Institute of Genetics and Cytology National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus;*

³*Minsk City Clinical Cancer Centre, Minsk, Republic of Belarus*

MicroRNAs are non-coding RNAs that regulate the expression of many genes. Currently, they are important diagnostic and prognostic markers of cancer of various localization. This study is devoted to the description of the first experience of studying microRNA expression in frozen thyroid tissue and a comparative analysis of methods for miRNA isolation.

11 samples of tumor tissue were used, as well as 11 samples of normal thyroid tissue. A direct comparison was made using 2 methods of miRNA isolation — sorption method, on a column with a silicon filter (LRU-100-50; Biolabmix, Russia), and Khomchinsky extraction method (RNK-EXTRAN; Sintol, Russia).



The expression of miR-21, miR-31, miR-144, miR-146b, miR-181b, miR-187, miR-199b, miR-200a, miR-200b, miR-205, miR-221, miR-222, miR-375.

In the tissue of papillary carcinoma, hyperexpression of all studied miRNAs was revealed; in medullary carcinoma tissue, expression of miR-21, miR-31, miR-199b, and miR-205 was suppressed. A significant correlation was established ($r = 0.773$, $p = 0.00000368$, $R^2 = 0.627$) using both methods. The use of the sorption method made it possible to obtain miRNAs with a lower content of foreign impurities.

The developed technique makes it possible to study changes in microRNA expression in tumor tissue relative to normal thyroid tissue. The existing discrepancies in the nature of changes in miRNA expression require further studies.

Keywords: microRNA, thyroid cancer, thyroid, thyroid nodule, molecular-genetic studies.

Поступила 23.06.2023