

С. В. Якубовский¹, О. В. Красько², В. Н. Кипень³, М. В. Фридман¹,
Г. Г. Кондратенко¹, В. А. Лемеш³

ЭКСПРЕССИЯ МИКРОРНК В НОРМЕ И ПРИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
Минск, Республика Беларусь¹

ГНУ «Объединенный институт проблем информатики
Национальной академии наук Беларуси»,
Минск, Республика Беларусь²

ГНУ «Институт генетики и цитологии
Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь³

Изучение молекулярных механизмов патогенеза заболеваний щитовидной железы (ЩЖ) способствовало выявлению новых диагностических и прогностических маркеров различных ее заболеваний. МикроРНК (миРНК) – это эндогенные некодирующие малые молекулы РНК, которые регулируют экспрессию генов и рассматриваются в качестве биомаркеров доброкачественных и злокачественных патологических процессов. В настоящее время остается неизученным вопрос изменений экспрессии микроРНК при субклинических аутоиммунных и гиперпластических процессах. Последнее необходимо как для изучения молекулярно-генетических аспектов патогенеза доброкачественных заболеваний ЩЖ, так и для разработки критериев отбора референсных образцов ткани щитовидной железы для последующих исследований.

Цель. Определить характер экспрессии отобранных микроРНК при фолликулярной узловой болезни, аутоиммунном тиреоидите Хашимото и сочетании фолликулярной узловой болезни с хроническим лимфоцитарным тиреоидитом, а также при наличии морфологических признаков очагового хронического лимфоцитарного тиреоидита и диффузных гиперпластических изменений без клинико-лабораторных проявлений.

Материалы и методы. Методом количественной ПЦР изучена экспрессия 18 микроРНК в 72 образцах фиксированной формалином и залитой парафином ткани ЩЖ. Выбор нормализующих микроРНК выполнен при помощи веб-приложения NormiRazor. Для сравнения нормализованных значений уровня экспрессии микроРНК (ΔCt) в изучаемых группах образцов использовали тест Манна-Уитни-Вилкоксона с поправкой Бонферрони.

Результаты. Установлено, что возникновение минимальных морфологических изменений в ткани щитовидной железы сопровождалось аномальной, зависящей от характера патологического процесса, экспрессией большинства изученных микроРНК. При сочетанном поражении ткани щитовидной железы присутствием аутоиммунного воспалительного процесса сопровождалось наиболее выраженными изменениями экспрессии микроРНК.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости разработки строгих критериев отбора референсных образцов ткани щитовидной железы для молекулярно-генетических исследований и необходимы для последующих исследований, направленных на создание подходов к анализу результатов изучения экспрессии микроРНК при различных патологических состояниях.

Ключевые слова: щитовидная железа, фолликулярная узловая болезнь, аутоиммунный тиреоидит, нормализация, микроРНК, референсные гены.

S. U. Yakubouski¹, O. V. Krasko², V. N. Kipen³, M. V. Fridman¹,
H. H. Kandratsenka¹, V. A. Lemesh³

MICRORNA EXPRESSION PROFILE IN THE NORMAL THYROID AND ITS BENIGN LESIONS

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus¹

*United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus²*

*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus³*

Studies of molecular mechanisms of thyroid diseases contribute to the discovery of diagnostic and prognostic markers of its various disorders. MicroRNA (miRNA) – endogenous non-coding small RNA molecules that regulate gene expression and are considered as biomarkers of benign and malignant conditions. Currently, aberrations of the microRNA expression in the settings of subclinical autoimmune and hyperplastic processes remain largely unexplored. The latter is necessary for studying the molecular mechanisms of benign thyroid conditions, as well as for developing criteria for selection of reference thyroid tissue samples for subsequent studies.

Aim: To determine the expression pattern of selected microRNAs in a follicular nodular disease, autoimmune thyroiditis and combination of a follicular nodular disease with focal chronic lymphocytic thyroiditis, as well as in the presence of latent focal chronic lymphocytic thyroiditis and diffuse hyperplastic changes.

Materials and methods: The expression of 18 microRNAs in 72 samples of formalin-fixed, paraffin-embedded thyroid tissue was studied using quantitative PCR. Normalizing microRNAs were selected using the NormiRazor web application. The Mann-Whitney-Wilcoxon test with Bonferroni correction was used to compare normalized values of microRNA expression levels (ΔCt).

Results: Minimal morphological alterations in the thyroid tissue were accompanied by abnormal expression of most of the studied microRNAs, depending on the nature of the pathological process. In combined lesions of the thyroid tissue, the presence of autoimmune inflammation influenced microRNAs expression in the greatest extent.

Conclusion: The present findings identify the necessity for developing stringent criteria for selecting reference samples of thyroid tissue for molecular studies, and may aid in subsequent studies aimed at developing approaches to the analysis of microRNA expression in various pathological conditions.

Key words: thyroid gland, follicular nodular disease, autoimmune thyroiditis, normalization, microRNA, reference genes.

Спектр заболеваний щитовидной железы (ЩЖ) чрезвычайно широк, и варьирует от минимальных структурных изменений до существенных морфофункциональных расстройств. К наиболее распространенным относятся такие патологические состояния, как узловой зоб (фолликулярная узловая болезнь) и аутоиммунная патология ЩЖ, прежде всего аутоиммунный (лимфоцитарный) тиреоидит Хашимото [1, 2].

Одним из важных этапов обследования пациентов с узловым зобом, а в ряде случаев, и с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ), является дифференциальная диагностика со злокачественными опухолями ЩЖ, включающая цитологический метод исследования [3]. Несмотря на то, что в большинстве случаев это не вызывает затруднений, схожие цитологические признаки не всегда позволяют уверенно дифференцировать ряд инкапсулированных форм высококодифференцированного

рака ЩЖ, от доброкачественных опухолей и опухолеподобных заболеваний, в том числе, от фолликулярной узловой болезни и АИТ, особенно, когда имеет место сочетанная патология, что приводит к избыточной хирургической активности [3, 4].

Для решения этой проблемы могут использоваться различные подходы, в том числе молекулярно-генетический анализ [5]. В качестве молекулярных маркеров, позволяющих дифференцировать узловые образования ЩЖ, рассматриваются различные показатели, включая изучение генетических мутаций, кодирующей и не кодирующей РНК и другие [6]. В качестве таковых, в частности, рассматриваются микроРНК (миРНК) – эндогенные не кодирующие малые молекулы РНК, регулирующие экспрессию множества генов на транскрипционной и посттранскрипционной стадиях и модулирующие многие клеточные процессы, такие как пролиферация, инвазия и метастазирова-

ние [7]. Была показана возможность использования микроРНК в качестве диагностических биомаркеров для дифференциальной диагностики АИТ, фолликулярной узловой болезни, доброкачественных и злокачественных новообразований щитовидной железы, что имеет наибольшее значение при неэффективности цитологического исследования [8].

В настоящее время количественная полимеразная цепная реакция (кПЦР) благодаря высокой чувствительности, специфичности и доступности метода широко используется в изучении экспрессии микроРНК [9]. Однако особенностью исследования экспрессии микроРНК методом кПЦР является относительный характер изучаемых показателей, требующий выбора стандарта, точки отсчета для сопоставления получаемых результатов. В качестве таковой могут выступать значения экспрессии нормализующих микроРНК, демонстрирующих стабильные показатели во всех типах тканей. В этом случае для выбора нормализатора применяются различные подходы, являющиеся предметом продолжающейся дискуссии [10]. С другой стороны, традиционно в медико-биологических исследованиях в роли эталонного (контрольного) образца принято использовать ткани без признаков морфологических изменений; источником таких образцов обычно является операционный материал.

В реальной клинической практике макроскопически неизменная ткань ЩЖ, удаляемая вместе с узловым образованием, зачастую характеризуется присутствием разнообразных фоновых микроскопических изменений различной степени выраженности, включающих лимфоцитарную инфильтрацию, а также дегенеративные и гиперпластические процессы, частота которых увеличивается с возрастом [11]. Эти изменения интерпретируются как нормальный компенсаторно-приспособительный процесс, связанный с возрастной инволюцией ЩЖ, не сопровождающийся клиническими проявлениями [12]. С другой стороны, подобные изменения морфологической структуры могут отражать и влияние факторов окружающей среды, таких как дефицит йода, либо аутоиммунное воспаление. Такие диффузные и минимально выраженные изменения тиреоидной ткани при прогрессировании патологического процесса могут приводить к формированию зоба, или клинически значимого аутоиммунного тиреоидита Хашимото [13]. Патогенез этих заболеваний в настоящее время окончательно не выяснен, но, несомненно, обусловлен сочетанием генетических мутаций, влиянием факторов окружающей среды и эпигенетическими нарушениями [14, 15].

В настоящее время вопрос изменений экспрессии микроРНК при наличии подобных фоно-

вых, без клинико-лабораторных проявлений, изменений, остается неизученным. Но исследования в этом направлении необходимы как для оценки целесообразности использования «неизменной» тиреоидной ткани в качестве контрольного образца, так и для разработки критериев отбора референсных образцов ткани щитовидной железы для последующих исследований. Полученные данные нужны для изучения молекулярно-генетических звеньев патогенеза фолликулярной узловой болезни и аутоиммунного тиреоидита, а также поиска молекулярных маркеров, позволяющих дифференцировать различные новообразования щитовидной железы на дооперационном этапе при невозможности достижения этого при помощи стандартных методов предоперационного обследования.

Цель исследования: определить характер экспрессии отобранных микроРНК при фолликулярной узловой болезни, аутоиммунном тиреоидите Хашимото и сочетании фолликулярной узловой болезни с хроническим лимфоцитарным тиреоидитом, а также при наличии морфологических признаков очагового хронического лимфоцитарного тиреоидита и диффузных гиперпластических изменений без клинико-лабораторных проявлений.

Материалы и методы

Образцы ткани щитовидной железы

Все образцы представляли собой операционный материал пациентов, проходивших лечение в УЗ «Минский городской клинический онкологический центр» (г. Минск, Республика Беларусь) в период 2021–2023 гг.

Молекулярно-генетические исследования выполнены на базе ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси» (г. Минск, Республика Беларусь).

Статистическая обработка выполнена на базе ГНУ «Объединенный институт проблем информатики Национальной академии наук Беларуси» (г. Минск, Республика Беларусь).

Было исследовано 22 образца ткани ЩЖ с фолликулярной узловой болезнью (группа 1); 10 образцов ткани ЩЖ, характеризующихся сочетанием фолликулярной узловой болезни и хронического лимфоцитарного тиреоидита (ХЛТ) (группа 2); 13 образцов классического тиреоидита Хашимото с соответствующими клинико-лабораторными и сонографическими признаками (группа 3); 3 образца – с очаговым ХЛТ, характеризующимся незначительно выраженной очаговой лимфоидной инфильтрацией без клинико-лабораторных проявлений (группа 4); 8 образцов ткани щитовидной железы с незначительно выраженными диффуз-

ными гиперпластическими изменениями без клинико-лабораторных проявлений (группа 5); а также 16 образцов нормальной ткани щитовидной железы – контрольная группа.

Критерии отбора для группы 1: наличие клинических и цитологических признаков многоузлового зоба, при патоморфологическом исследовании – узлы фолликулярной архитектоники с частичной инкапсуляцией и неоднородной гистоархитектоникой [16] (рис. 1).

Критерии отбора для группы 2 включали наличие признаков группы 1 в сочетании с лимфоидной инфильтрацией [13] (рис. 2).

Критерии отбора для группы 3: наличие патоморфологических признаков, а также клинико-лабораторных и инструментальных диагностических критериев хронического аутоиммунного тиреоидита (Хашимото) [14] (рис. 3).

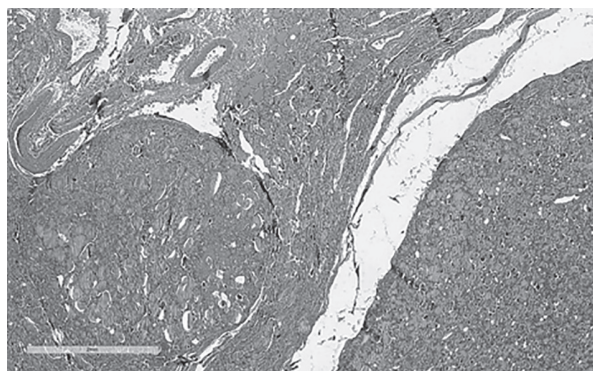


Рис. 1. Фолликулярная узловая болезнь щитовидной железы (аденоматозный зоб). В поле зрения два узла фолликулярной архитектоники, каждый из которых окружен тонкой капсулой. Окраска гематоксилин и эозин, х15

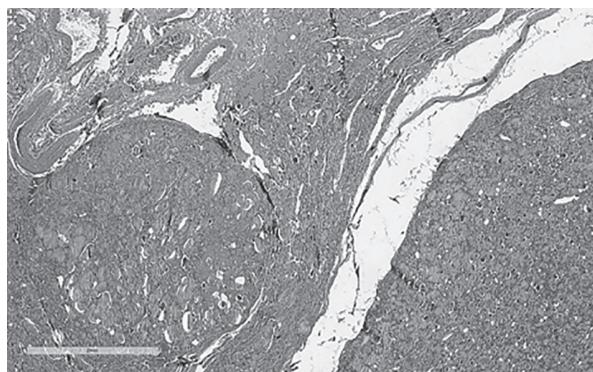


Рис. 2. Фолликулярная узловая болезнь в сочетании с хроническим лимфоцитарным тиреоидитом: формирование гиперпластических узлов с неоднородной гистоархитектоникой, нодулярные лимфоидные скопления без формирования герминативных центров. Окраска гематоксилин и эозин, х30

Критерии отбора для группы 4: наличие очагов лимфоцитарной инфильтрации до 50 % поля зрения; отсутствие фиброза и атрофии паренхимы, фолликулярных структур с центрами размножения, а также иных патоморфологических признаков, клинико-лабораторных и ультразвуковых критериев аутоиммунного тиреоидита Хашимото [17] (рис. 4).

Критерии отбора для группы 5: нормальный размер ЩЖ, при микроскопическом исследовании – отсутствие узлов в ткани железы, наличие зон структурной гетерогенности с очагами гиперплазии и неинкапсулированными скоплениями фолликулов, отражающими начало формирования узлов, чередующихся с участками нормальной тиреоидной ткани [13] (рис. 5).

Критерии отбора контрольной группы – тиреоидная ткань без патологических изменений (рис. 6).

Для контрольной группы, а также опытных групп 4 и 5 использовался материал, полученный из макроскопически неизмененной ткани противоположной доли после выполнения, согласно дейст-



Рис. 3. Тиреоидит Хашимото (аутоиммунный тиреоидит): диффузная пролиферация лимфоидных элементов с формированием фолликулярных структур с центрами размножения, распространение процесса за пределы капсулы щитовидной железы. Окраска гематоксилин и эозин, х15

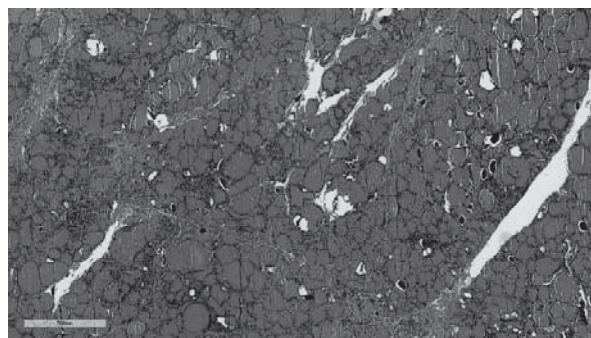


Рис. 4. Очаговый хронический лимфоцитарный тиреоидит. Мелкие узелки из лимфоидных элементов в окружности фолликулов. Окраска гематоксилин и эозин, х30

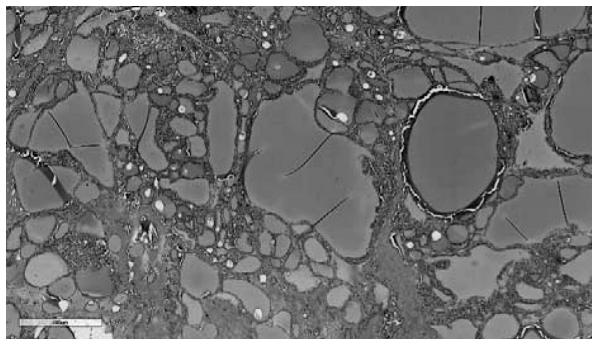


Рис. 5. Субклинические гиперпластические изменения. Диффузный нетоксический зоб. Доминируют фолликулы большого диаметра, коллоид однородный. Окраска гематоксилин и эозин, х30

вующему в Республике Беларусь клиническому протоколу «Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований», тиреоидэктомии у пациентов с моноузловой формой рака ЩЖ [18]. Образцы ткани щитовидной железы, включенные в опытные группы 1–3, были получены в ходе выполнения геми- или тиреоидэктомии у пациентов с клиническим диагнозом «нетоксический узловой/многоузловой зоб» и «хронический аутоиммунный тиреоидит».

Клинический диагноз «нетоксический узловой/многоузловой зоб» или «хронический аутоиммунный тиреоидит» устанавливался на амбулаторном этапе на основании данных клинико-лабораторных и инструментальных методов обследования (клиническая картина, ультразвуковые и цитологические признаки для пациентов с нетоксическим узловым/многоузловым зобом; наличие первичного гипотиреоза, повышение титра антитиреоидных антител (прежде всего, АТ-ТПО) и ультразвуковые признаки тиреоидита для пациентов с хроническим аутоиммунным тиреоидитом) в соответствии с клиническим протоколом «Диагностика и лечение пациентов с заболеваниями щитовидной железы (взрослое население)» [19].

В работе использованы классификация хронического тиреоидита, предложенной Y. Mizukami и соавт. (1992) [17] и классификация опухолей щитовидной железы 5-го пересмотра (ВОЗ, 2022) [16].

Показаниями к операции у пациентов групп 1–3 являлись наличие косметического дефекта и/или компрессионного синдрома.

Для гистологических исследований образцы ткани щитовидной железы фиксировали в 10 %-ном нейтральном забуференном формалине и заключали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Включенные в исследование архивные образцы ткани подвергались повторному экспертному патоморфологическому исследованию.

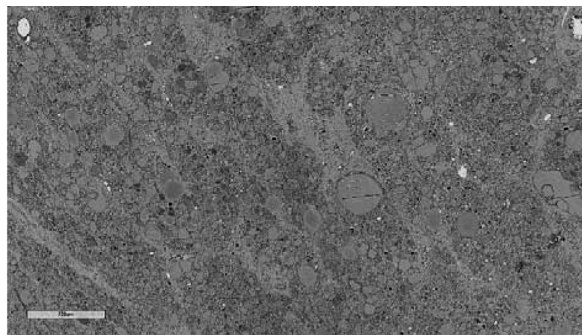


Рис. 6. Ткань щитовидной железы без патологических изменений. Дольки сформированы фолликулами различного диаметра. Окраска гематоксилин и эозин, х30

Способ формирования выборки – произвольный; исследование одноцентровое, ретроспективное, с использованием архивных образцов ткани щитовидной железы.

Оценка экспрессии микроРНК

Депарафинизация среза гистологического препарата осуществлялась с использованием толуола и цетана согласно оригинальному протоколу [20]. Выделение микроРНК производилось с использованием набора LRU-100-50 (ООО «Биолабмикс», РФ) по адаптированному протоколу [20].

В образцах ткани щитовидной железы методом кПЦР определяли содержание 18 микроРНК, которые были выбраны для исследований на основании анализа литературных данных (табл. 1).

Синтез кДНК осуществляли с использованием набора ArtMMLV Total (АртБиоТех, Беларусь) по протоколу [21].

ПЦР проводили на амплификаторе QuantStudio 5 (Applied Biosystems, США). Для ПЦР использовали мастер-микс «БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX (2x)» для кПЦР (ООО «Биолабмикс», РФ), в качестве интеркалирующего красителя использовали EvaGreen (Jena Bioscience, Германия). Последовательности праймеров представлены в [21].

Статистический анализ

Для анализа графиков, полученных при проведении количественной ПЦР (кПЦР), использовали LinRegPCR v.11.0 [22]. Оценка стабильности экспрессии и выбор нормализующих микроРНК (miR-138 и -181b) выполнен при помощи веб-приложения NormiRazor [23]. Данные были нормализованы при помощи геометрического среднего порогового числа циклов ПЦР (Ct) отобранных микроРНК.

Нормализованные значения уровня экспрессии микроРНК (ΔCt) сравнивали в шести группах

Таблица 1. Перечень исследованных микроРНК

№	микроРНК	Индивидуальный номер*	Хромосомная локализация**
1	hsa-miR-021-5p	MIMAT0000076	chr17: 59841266-59841337
2	hsa-miR-031-5p	MIMAT0000089	chr9: 21512115-21512185
3	hsa-miR-125a-3p	MIMAT0004602	chr19: 51693254-51693339
4	hsa-miR-138-5p	MIMAT0000430	chr3: 44114212-44114310
5	hsa-miR-144-5p	MIMAT0004600	chr17: 28861533-28861618
6	hsa-miR-146b-5p	MIMAT0002809	chr10: 102436512-102436584
7	hsa-miR-181b-5p	MIMAT0000257	chr1: 198858873-198858982
8	hsa-miR-187-3p	MIMAT0000262	chr18: 35904818-35904926
9	hsa-miR-197-3p	MIMAT0000227	chr1: 109598893-109598967
10	hsa-miR-199b-5p	MIMAT0000263	chr9: 128244721-128244830
11	hsa-miR-200b-3p	MIMAT0000318	chr1: 1167104-1167198
12	hsa-miR-200a-3p	MIMAT0000682	chr1: 1167863-1167952
13	hsa-miR-205-5p	MIMAT0000266	chr1: 209432133-209432242
14	hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	chrX: 45746157-45746266
15	hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	chrX: 45747015-45747124
16	hsa-miR-375-3p	MIMAT0000728	chr2: 219001645-219001708
17	hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	chr4: 38868032-38868127
18	hsa-miR-885-5p	MIMAT0004947	chr3: 10394489-10394562

Примечания.

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

**https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000001405.26/ (дата доступа 02.05.2025)

попарно тестом Манна-Уитни-Вилкоксона с поправкой Бонферрони на множественные сравнения. Относительную экспрессию микроРНК ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$) в группах рассчитывали по методу [24].

Анализ данных проводили в офисном приложении Microsoft Excel 2019 и в статистическом пакете R, библиотека NormqPCR [25]

Уровень ошибки I рода $\alpha = 0,05$ был принят значимым для статистических выводов.

Результаты

На основании экспериментальных данных были рассчитаны средние значения величины изменения экспрессии микроРНК в материале ткани щитовидной железы всех опытных групп относительно образцов нормальной ткани.

Нормализованные значения экспрессии всех исследованных микроРНК в каждой группе продемонстрированы на рис. 7, средние значения ΔCt и $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ приведены в табл. 2.

Профиль экспрессии микроРНК в образцах ткани с морфологическими признаками аутоиммунного тиреоидита

Изучение профиля экспрессии микроРНК в образцах нормальной ткани с субклиническим ХЛТ (группа 4) и образцах ткани ЩЖ при наличии клинически значимого тиреоидита Хашимото (группа 3) позволило установить, что начальные проявления ХЛТ сопровождались наиболее выраженными (более, чем в 2 раза по сравнению с нормой) изменениями экспрессии miR-21, -146b, -187, -200b

и -574, которые, однако, не достигали статистической значимости.

Нарастание выраженности АИТ характеризовалось значимыми по сравнению с нормой изменениями экспрессии miR-21, -144, -146b, -199b, -200a и -200b (табл. 2, рис. 8).

Проведенные в дальнейшем парные сравнения экспрессии микроРНК в образцах ткани ЩЖ с субклиническим ХЛТ и клинически выраженным тиреоидитом Хашимото, однако, не позволили продемонстрировать значимые различия экспрессии изученных микроРНК.

Профиль экспрессии микроРНК в образцах ткани с морфологическими признаками фолликулярной узловой болезни

Изучение профиля экспрессии изучаемых микроРНК в образцах нормальной ткани с фоновыми гиперпластическими изменениями (группа 5) и образцах ткани ЩЖ при фолликулярной узловой болезни (группа 1) показало, что начальные гиперпластические изменения по сравнению с нормальной тканью сопровождались значимыми изменениями экспрессии miR-125a, -197 и -200b.

Дальнейшее развитие фолликулярной узловой болезни характеризовалось значимыми по сравнению с нормальной тканью изменениями экспрессии miR-21, -31, -144, -197, -199b, -200b и -222.

Проведенные в дальнейшем парные сравнения экспрессии микроРНК в образцах ткани ЩЖ с субклиническими гиперпластическими изменениями и образцов с клинически значимой

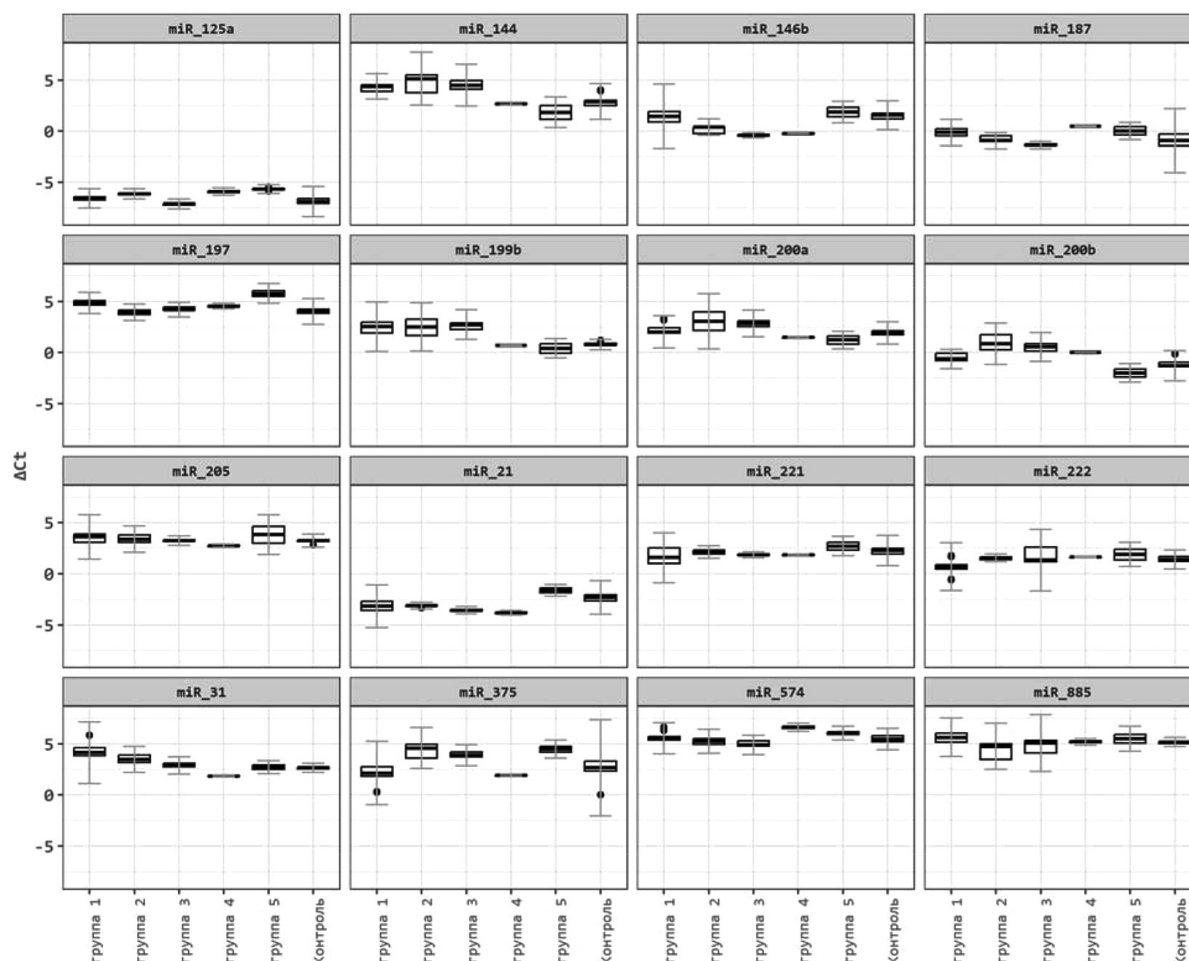


Рис. 7. Диаграммы размаха нормализованных значений экспрессии изученных микроРНК

П р и м е ч а н и е. Группа 1 – фолликулярная узловая болезнь; группа 2 – фолликулярная узловая болезнь в сочетании с хроническим лимфоцитарным тиреоидитом; группа 3 – тиреоидит Хашимото; группа 4 – субклинический очаговый хронический лимфоцитарный тиреоидит; группа 5 – субклинические диффузные гиперпластические изменения; контроль – нормальная ткань щитовидной железы.

фолликулярной узловой болезнью, показали, что развитие фолликулярной узловой болезни по сравнению с фоновыми (начальными) гиперпластическими явлениями сопровождалось значимыми изменениями экспрессии miR-21, -31, -125a, -144, -197, -199b, -200a, -200b, -222 и -375 (табл. 2, рис. 9).

Профиль экспрессии микроРНК при фолликулярной узловой болезни и аутоиммунном тиреоидите

Проведенные парные сравнения экспрессии микроРНК в образцах ткани ЩЖ с клинически значимым тиреоидитом Хашимото (группа 3) и фолликулярной узловой болезнью (группа 1) продемонстрировали значимые различия в экспрессии miR-31, -125a, -146b, -187, -197, -200b, -222, -375 и -574.

Проведенные в дальнейшем парные сравнения экспрессии микроРНК в образцах ткани ЩЖ

при наличии клинически значимого тиреоидита Хашимото и образцах ткани при сочетании фолликулярной узловой болезни и ХЛТ (группы 3 и 2), показали, что в условиях фонового гиперпластического процесса статистически значимо по сравнению с тиреоидитом Хашимото изменилась только экспрессия miR-21, -125a и -187. Сравнение экспрессии микроРНК в образцах фолликулярной узловой болезни и сочетания ХЛТ и фолликулярной узловой болезни (группы 1 и 2) выявили значимые отличия экспрессии miR-125a, -146b, -187, -197, -200b, -375 и -885 (табл. 2).

Обсуждение

МикроРНК являются хорошо известными модификаторами экспрессии генов, благодаря чему они играют важнейшую роль в регуляции основных процессов жизнедеятельности клетки, в частности,

Таблица 2. Результаты сравнительного анализа экспрессии микроРНК

Тип ткани для каждой микроРНК	ΔCt нормализованное среднее	Группы сравнения. Относительные значения экспрессии 2 [^] (-ΔΔCt)				
		Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5	Контроль
		n = 10	n = 13	n = 3	n = 8	n = 16
miR_21						
Группа 1	-3,24	1,07	0,80	0,67	3,05*	1,85*
Группа 2	-3,13		0,75*	0,62	2,84*	1,72
Группа 3	-3,56			0,84	3,82*	2,31*
Группа 4	-3,81				4,55	2,76
Группа 5	-1,63					0,61
Контроль	-2,35					
miR_31						
Группа 1	4,24	0,62	0,41*	0,19	0,35*	0,33*
Группа 2	3,54		0,67	0,31	0,56*	0,54*
Группа 3	2,96			0,46	0,85	0,81
Группа 4	1,84				1,83	1,74
Группа 5	2,71					0,96
Контроль	2,65					
miR_125a						
Группа 1	-6,56	1,36*	0,67*	1,57	1,86*	0,81
Группа 2	-6,12		0,49*	1,16	1,37*	0,60*
Группа 3	-7,13			2,34	2,77*	1,21
Группа 4	-5,90				1,18	0,52
Группа 5	-5,66					0,44*
Контроль	-6,85					
miR_144						
Группа 1	4,24	1,45	1,21	0,34	0,19*	0,40*
Группа 2	4,77		0,83	0,24	0,13*	0,28*
Группа 3	4,51			0,28	0,16*	0,33*
Группа 4	2,69				0,55	1,17
Группа 5	1,84					2,12
Контроль	2,92					
miR_146b						
Группа 1	1,38	0,42*	0,29*	0,33	1,40	1,13
Группа 2	0,14		0,69	0,78	3,33*	2,69*
Группа 3	-0,39			1,12	4,80*	3,89*
Группа 4	-0,23				4,27	3,46
Группа 5	1,87					0,81
Контроль	1,57					
miR_187						
Группа 1	-0,13	0,64*	0,44*	1,52	1,11	0,55
Группа 2	-0,78		0,70*	2,38	1,73	0,87
Группа 3	-1,30			3,42	2,49*	1,25
Группа 4	0,47				0,73	0,36
Группа 5	0,01					0,50
Контроль	-0,98					
miR_197						
Группа 1	4,88	0,52*	0,66*	0,79	1,85*	0,53*
Группа 2	3,93		1,28	1,54	3,58*	1,02
Группа 3	4,29			1,20	2,80*	0,80
Группа 4	4,55				2,33	0,66
Группа 5	5,77					0,29*
Контроль	3,96					
miR_199b						
Группа 1	2,46	1,03	0,98	0,29	0,24*	0,33*
Группа 2	2,50		0,96	0,28	0,23*	0,32*
Группа 3	2,44			0,29	0,25*	0,33*
Группа 4	0,68				0,83	1,13
Группа 5	0,41					1,36
Контроль	0,85					
miR_200a						
Группа 1	2,22	1,83	1,44	0,60	0,50*	0,81

Окончание таблицы 2

Тип ткани для каждой микроРНК	ΔCt нормализованное среднее	Группы сравнения. Относительные значения экспрессии 2 ^{Δ(-ΔΔCt)}				
		Группа 2 n = 10	Группа 3 n = 13	Группа 4 n = 3	Группа 5 n = 8	Контроль n = 16
Группа 2	3,09		0,79	0,33	0,27*	0,44
Группа 3	2,75			0,41	0,35*	0,56*
Группа 4	1,47				0,84	1,35
Группа 5	1,22					1,61
Контроль	1,91					
miR_200b						
Группа 1	-0,49	2,78*	1,95*	1,42	0,35*	0,66*
Группа 2	0,99		0,70	0,51	0,12*	0,24*
Группа 3	0,48			0,73	0,18*	0,34*
Группа 4	0,02				0,24	0,46
Группа 5	-2,01					1,90*
Контроль	-1,09					
miR_205						
Группа 1	3,60	0,87	0,80	0,54	1,15	0,75
Группа 2	3,41		0,91	0,62	1,32	0,86
Группа 3	3,27			0,68	1,45	0,94
Группа 4	2,71				2,14	1,39
Группа 5	3,81					0,65
Контроль	3,19					
miR_221						
Группа 1	1,64	1,39	1,17	1,13	2,06	1,58
Группа 2	2,11		0,84	0,82	1,48	1,14
Группа 3	1,86			0,97	1,76*	1,35
Группа 4	1,82				1,82	1,40
Группа 5	2,68					0,77
Контроль	2,30					
miR_222						
Группа 1	0,64	1,81	2,67*	1,96	2,33*	1,65*
Группа 2	1,50		1,47	1,08	1,28	0,91
Группа 3	2,06			0,73	0,87	0,62
Группа 4	1,62				1,19	0,84
Группа 5	1,86					0,71
Контроль	1,37					
miR_375						
Группа 1	2,11	4,75*	3,72*	0,88	5,16*	1,42
Группа 2	4,36		0,78	0,18	1,09	0,30
Группа 3	4,01			0,24	1,39	0,38
Группа 4	1,92				5,89	1,62
Группа 5	4,48					0,27
Контроль	2,62					
miR_574						
Группа 1	5,64	0,76	0,66*	1,98	1,33	0,93
Группа 2	5,23		0,87	2,62	1,76*	1,22
Группа 3	5,03			3,01	2,03*	1,41
Группа 4	6,62				0,67	0,47
Группа 5	6,05					0,69
Контроль	5,52					
miR_885						
Группа 1	5,63	0,41*	0,47	0,75	0,91	0,72
Группа 2	4,35		1,15	1,82	2,23	1,75
Группа 3	4,55			1,58	1,94	1,53
Группа 4	5,21				1,23	0,97
Группа 5	5,50					0,79
Контроль	5,16					

Примечание. * статистически значимые различия между группами

Группа 1 – фолликулярная узловатая болезнь; группа 2 – фолликулярная узловатая болезнь в сочетании с хроническим лимфоцитарным тиреоидитом; группа 3 – тиреоидит Хашимото; группа 4 – субклинический очаговый хронический лимфоцитарный тиреоидит; группа 5 – субклинические диффузные гиперпластические изменения; контроль – нормальная ткань щитовидной железы.

пролиферации, инвазии и апоптоза, что позволило использовать их в дифференциальной диагностике опухолей ЩЖ [26]. Кроме того, они участвуют во всех основных клеточных функциях, включая иммуномодуляцию и развитие воспалительной реакции. Последнее позволяет использовать микроРНК в качестве биомаркеров многих аутоиммунных заболеваний, включая аутоиммунный тиреоидит [27].

В данном исследовании был изучен профиль экспрессии 18 микроРНК при таких заболеваниях щитовидной железы, как фолликулярная узловая болезнь, аутоиммунный тиреоидит Хашимото,

в сочетании фолликулярной узловой болезни с хроническим лимфоцитарным тиреоидитом, а также при наличии фоновых (без клинико-лабораторных проявлений) диффузного гиперпластического процесса и очагового хронического лимфоцитарного тиреоидита.

При изучении экспрессии микроРНК на фоне развития АИТ значимые изменения по сравнению с контрольной группой отмечались у шести микроРНК: miR-21, -144, -146b, -199b, -200a и -200b. Указанные микроРНК ранее неоднократно демонстрировали тенденцию к выраженным изменениям экспрессии в условиях АИТ, что связано

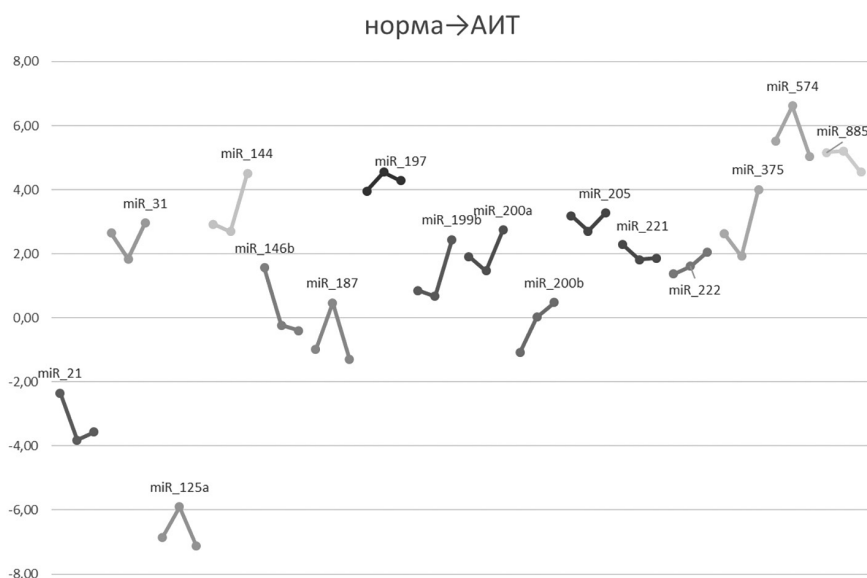


Рис. 8. Изменение средних значений нормализованных ΔC_t изученных микроРНК при нарастании явлений аутоиммунного тиреоидита (контрольная группа → группа 4 → группа 3)

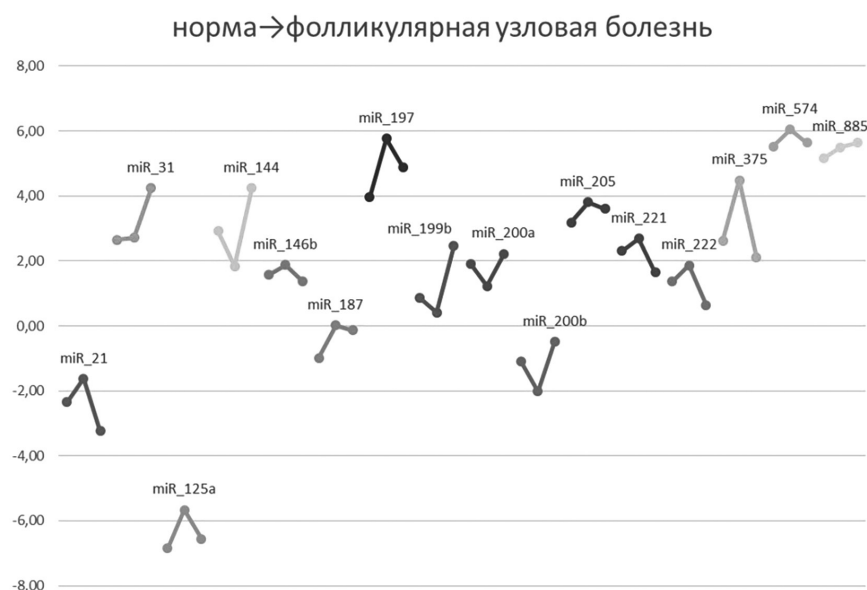


Рис. 9. Изменение средних значений нормализованных ΔC_t изученных микроРНК при нарастании гиперпластических изменений (контрольная группа → группа 5 → группа 1)

с их ролью в патогенезе аутоиммунных заболеваний щитовидной железы [28].

Следует отметить отсутствие значимых различий экспрессии изученных микроРНК между группами образцов с субклиническим ХАТ и клинически значимым тиреоидитом Хашимото, а также между нормальной тканью железы и субклиническим ХАТ. На наш взгляд, это может объясняться, как характером молекулярных изменений, возникающих в дебюте заболевания, так и малым количеством образцов в группе с начальными проявлениями ХАТ.

Поскольку в настоящее время считается, что диффузные гиперпластические изменения тиреоидной ткани предшествуют возникновению аденоматозного зоба [13], именуемого в настоящее время фолликулярной узловой болезнью [16], мы предприняли попытку рассмотреть изменения экспрессии микроРНК с позиций прогрессирования гиперпластических процессов в тиреоидной ткани.

Значимые изменения экспрессии микроРНК при субклинических гиперпластических изменениях, по сравнению с контрольной группой, отмечались у miR-125a, -197 и -200b.

При изучении характера изменения экспрессии микроРНК по мере нарастания гиперпластических изменений была выявлена значимая разница между контрольной группой и группой с признаками фолликулярной узловой болезни в экспрессии ряда микроРНК (miR-21, -31, -144, -197, -199b, -200b, и -222), что согласуется с ранее опубликованными исследованиями [29].

Для miR-21, -31, -144, -199b была установлена значимые изменения динамики экспрессии по сравнению с контрольной группой и группой с начальными гиперпластическими изменениями лишь при формировании фолликулярной узловой болезни. В то же время экспрессия miR-197, -200b и -222 в изученных группах изменялась значимо, но разнонаправленно по мере нарастания выраженности патологических изменений.

Данное наблюдение, на наш взгляд, может отражать как факт отсутствия запуска молекулярных процессов, регулируемых рядом изученных нами микроРНК (miR-21, -31, -144, -199b), так и гетерогенную природу фолликулярной узловой болезни, включающую как гиперпластические изменения, так и клональные опухоли [16].

Проведенные парные сравнения экспрессии микроРНК в образцах ткани ЩЖ с фолликулярной узловой болезнью и клинически значимым тиреоидитом Хашимото продемонстрировали значимые различия в экспрессии miR-31, -125a, -146b, -187, -197, -200b, -222, -375 и -574. Полученные нами данные в дальнейшем могут быть использованы для выбора наиболее информативных биомаркеров, позволяющих различить вышеуказан-

ные патологические состояния и дифференцировать их от злокачественных новообразований ЩЖ, что не всегда возможно в ходе стандартного предоперационного цитологического исследования [4].

Установленные значимые различия в экспрессии лишь miR-21, -125a и -187 в образцах ткани ЩЖ с клинически значимым тиреоидитом Хашимото и образцах ткани, характеризующихся наличием сочетания очагового ХАТ и фолликулярной узловой болезни, с одной стороны, и выявление значимых различий в экспрессии 7 микроРНК (miR-125a, -146b, -187, -197, -200b, -375 и -885) в образцах фолликулярной узловой болезни и сочетания очагового ХАТ и фолликулярной узловой болезни с другой стороны, позволяет предположить более значительное влияние аутоиммунного воспалительного процесса, нежели гиперпластических изменений, на клеточный гомеостаз в ткани ЩЖ.

Несмотря на выявление значимых изменений экспрессии miR-21, -125a, -144, -146b, -187, -197, -199b, -200a, -200b, -221 и -574 в образцах тканей с явлениями тиреоидита Хашимото и фоновым гиперпластическим процессом, общая направленность этих изменений (гипер- и гипоекспрессия соответственно) говорит о возможности использования данных микроРНК в качестве диагностических биомаркеров у пациентов как с изолированным АИТ, так и у пациентов с сочетанием АИТ и гиперпластических процессов, что особенно важно в свете значительной распространённости такого рода изменений в популяции, прежде всего в старших возрастных группах для целей дифференциальной диагностики с опухолями щитовидной железы.

Наличие таких изменений необходимо учитывать при выборе диагностически значимого уровня экспрессии микроРНК для целей дифференциальной диагностики данных патологических состояний и злокачественных опухолей щитовидной железы.

К возможным ограничениям данного исследования, помимо малого числа наблюдений в группе с очаговым ХАТ, можно потенциально отнести способ выбора нормализующих микроРНК, поскольку различные способы нормализации приводят к значительным изменениям относительных значений экспрессии микроРНК, что обуславливает получение различных, а зачастую и противоречивых результатов в ходе исследований [23]. Это указывает на необходимость выработки стандартизированных алгоритмов выбора референсных микроРНК, учитывающих контекст конкретной решаемой задачи [30].

Обнаружение выраженных изменений в экспрессии ряда изученных микроРНК даже в тканях щитовидной железы с минимальными признаками гиперпластических изменений или аутоиммунной воспалительной реакции свидетельствует о необ-

ходимости тщательного подбора образцов нормальной тиреоидной ткани, используемых в качестве контрольных. На наш взгляд, последнее говорит о малой целесообразности использования нормальных тканей в качестве контрольных образцов при изучении экспрессии микроРНК и указывает на необходимость использования подходов, основанных на использовании нормализующих микроРНК для изучения их экспрессии, что позволит корректно описывать характер патологического процесса и выявлять имеющиеся изменения.

Заключение

В ходе представленного исследования было установлено, что возникновение минимальных морфологических изменений в ткани щитовидной железы сопровождалось аномальной, зависящей от характера патологического процесса, экспрессией большинства изученных микроРНК. При сочетанном поражении ткани щитовидной железы присутствие аутоиммунного воспалительного процесса сопровождалось наиболее выраженными изменениями экспрессии микроРНК. Полученные данные могут быть использованы как для разработки критериев отбора референсных образцов ткани щитовидной железы для молекулярно-генетических исследований, так и для последующих исследований, направленных на разработку диагностических биомаркеров, позволяющих дифференцировать узловые образования щитовидной железы. Результаты данного исследования могут быть использованы в дальнейшем при разработке подходов к анализу результатов изучения экспрессии микроРНК при различных патологических состояниях.

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 биоэтической этике УО «Белорусский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РБ (протокол № 9 от 23.03.2022). Все данные, полученные из медицинских записей, были анонимизированы. В связи с ретроспективным характером исследования и использованием архивных материалов, согласие пациентов не требовалось.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Болезни эндокринной системы в Беларуси – статистические и демографические сопоставления / С. С. Корытко, И. М. Хмара, О. Б. Салко, В. В. Антипов // Медицинские новости. – 2013. – № 3. – С. 42–48.
2. Эпидемиология доброкачественных заболеваний щитовидной железы у взрослого населения Республики Беларусь: анализ общенациональных статистических данных за период 2009–2019 гг. / С. В. Якубовский, Г. Г. Кондратенко, О. Б. Салко, Е. И. Кузьменкова // Проблемы эндокринологии. – 2022. – № 3 (68). – С. 30–43. doi: <https://doi.org/10.14341/probl12844>.
3. Ali, S. Z. The 2023 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology / S. Z. Ali, Z. W. Baloch, B. Cochand-Priollet [et al.] // Thyroid. – 2023. – Vol. 33, Issue 9. – P. 1039–1044. doi:10.1089/thy.2023.0141.
4. Yakubouski, S. U. Diagnostic Performance of Thyroid FNA: Experience of Belarusian National Referral Thyroid Cancer Center / S. U. Yakubouski, H. H. Kandratsenka, M. V. Fridman, V. A. Kondratovich, O. A. Perkhova // Diagn Cytopathol. – 2024. – Vol. 52, Issue 12. – P. 763–773. doi:10.1002/dc.25391.
5. Haugen, B. R. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer / B. R. Haugen, E. K. Alexander, K. C. Bible [et al.] // Thyroid. – 2016. – Vol. 26, Issue 1. – P. 1–133. doi:10.1089/thy.2015.0020.
6. Coca-Pelaz, A. Molecular Diagnostics and Personalized Therapeutics in Differentiated Thyroid Carcinoma: A Clinically Oriented Review / A. Coca-Pelaz, J. P. Rodrigo, M. Zafereo [et al.] // Diagnostics (Basel). – 2025. – Vol. 15, Issue 19. – article number: 2493. doi:10.3390/diagnostics15192493.
7. Imran, K. Epigenetic dysregulation in cancer: mechanisms, diagnostic biomarkers and therapeutic strategies / K. Imran, M. J. Iqbal, M. M. Ahmed [et al.] // Med Oncol. – 2025. – Vol. 42, Issue 8. – article number: 359. doi:10.1007/s12032-025-02905-z.
8. Titov, S. Preoperative detection of malignancy in fine-needle aspiration cytology (FNAC) smears with indeterminate cytology (Bethesda III, IV) by a combined molecular classifier / S. Titov, P. S. Demenkov, S. A. Lukyanov [et al.] // J Clin Pathol. – 2020. – Vol. 73, Issue 11. – P. 722–727. doi:10.1136/jclinpath-2020-206445.
9. Wang, H. A. Review of Nanotechnology in microRNA Detection and Drug Delivery / H. A. Wang // Cells. – 2024. – Vol. 13, Issue 15. – article number: 1277. doi:10.3390/cells13151277.
10. Madadi, S. MicroRNA expression studies: challenge of selecting reliable reference controls for data normalization / S. Madadi, H. Schwarzenbach, J. Lorenzen [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. – 2019. – Vol. 76, Issue 18. – P. 3497–3514. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03136-y>.
11. Ajish, T. P. Geriatric thyroidology: An update / T. P. Ajish, R. V. Jayakumar // Indian J Endocrinol Metab. – 2012. – Vol. 16, Issue 4. – P. 542–547. doi:10.4103/2230-8210.98006.
12. Teti, C. Iodophylaxis and thyroid autoimmunity: an update / C. Teti, M. Panciroli, E. Nazzari [et al.] // Immunol Res. – 2021. – Vol. 69, Issue 2. – P. 129–138. doi:10.1007/s12026-021-09192-6.
13. Braverman, L. E. Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text. 11th edition. / L. E. Braverman, D. S. Cooper, P. A. Kopp. – Wolters Kluwer, 2021. – 912 p.
14. Ralli, M. Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies.

tegies, and potential malignant transformation / M. Ralli, D. Angeletti, M. Fiore [et al.] // *Autoimmun Rev.* – 2020. – Vol. 19, Issue 10. – article number: 102649. doi:10.1016/j.autrev.2020.102649.

15. Condello, V. MicroRNA regulator gene mutations in thyroid follicular nodular disease and thyroid cancer: does it all come down to timing? / V. Condello, C. C. Juhlin // *Eur Thyroid J.* – 2024. – Vol. 13, Issue 6:e240298. doi:10.1530/ETJ-24-0298.

16. Baloch, Z. W. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms / Z. W. Baloch, S. L. Asa, J. A. Barletta [et al.] // *Endocr Pathol.* – 2022. – Vol. 3, Issue 1. – P. 27–63. doi: 10.1007/s12022-022-09707-3.

17. Mizukami, Y. Chronic thyroiditis: thyroid function and histologic correlations in 601 cases / Y. Mizukami, T. Michigishi, M. Kawato [et al.] // *Hum Pathol.* – 1992. – Vol. 23, Issue 9. – P. 980–988. doi:10.1016/0046-8177(92)90258-5.

18. Клинический протокол «Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований», утвержденный Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 июля 2018 г. № 60. Доступно по: <https://minzdrav.gov.by/upload/dadvfiles/КП%20Алгоритмы%20диагностики%20и%20лечения%20злоака.%20новообр%20пост.%20МЗ%20РБ%20от%2006.07.2018%20№%2060.pdf>. Дата доступа: 06.09.2025.

19. Клинический протокол «Диагностика и лечение пациентов с заболеваниями щитовидной железы (взрослое население)», утвержденный Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 21 июля 2021 г. № 85. Доступно по: https://minzdrav.gov.by/upload/dadvfiles/СРпротокол/2КП_Диагностика_и_лечение_пациентов_с_заболеваниями_щитовидной_железы_взр_нас_пост_МЗ_21062021_85.pdf. Дата доступа: 06.09.2025.

20. Методика определения микроРНК в гистологических препаратах щитовидной железы, фиксированных формалином и залитых парафином / Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. – Минск: Право и экономика. – 2023. – 32 с. – ISBN 978-985-887-097-3.

21. Экспрессия эпигенетических маркеров при аутоиммунном тиреоидите / С. В. Якубовский, В. Н. Кипень, М. В. Фридман [и др.] // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики : рецензир. ежегод. сб. науч. тр. : в 2 т. / М-во здра- воохр. Респ. Беларусь, Бел. гос. мед. ун-т, под ред. С. П. Рубникова, В. А. Филонюка. – Минск: БГМУ 2024. – Вып. 14. – Т. 1: Клиническая медицина. – 245 с. – С. 231–238.

22. Untergasser, A. Web-based LinRegPCR: application for the visualization and analysis of (RT)-qPCR amplification and melting data / A. Untergasser, J. M. Ruijter, V. Benes, M. J. B. van den Hoff // *BMC Bioinformatics.* – 2021. – Vol. 22, Issue 1. – article number:398. doi:10.1186/s12859-021-04306-1.

23. Grabia, S. NormiRazor: tool applying GPU-accelerated computing for determination of internal references in microRNA transcription studies / S. Grabia, U. Smyczynska, K. Pagacz, W. Fendler. // *BMC Bioinformatics.* – 2020. – Vol. 21, Issue 1. – article number:425. doi:10.1186/s12859-020-03743-8.

24. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods.* – 2001. – Vol. 25, Issue 4. – P. 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

25. Perkins J. R., ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data / J. R. Perkins, J. M. Dawes, S. B. McMahon [et al.] // *BMC Genomics.* – 2012. – Vol. 13. – article number: 296. doi:10.1186/1471-2164-13-296.

26. Zhang, T. The Application of microRNAs in Papillary Thyroid Cancer: A Bibliometric and Visualized Analysis /

T. Zhang, B. Yuan, S. Yu // *Int J Gen Med.* – 2024. – Vol. 17. – P. 4681–4699. doi:10.2147/IJGM.S487239.

27. Martínez-Hernández, R. MicroRNAs in autoimmune thyroid diseases and their role as biomarkers / R. Martínez-Hernández, M. Marazuela // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* – 2023. – Vol. 37, Issue 2. – article number: 101741. doi:10.1016/j.beem.2023.101741.

28. Martínez-Hernández, R. Integrated miRNA and mRNA expression profiling identifies novel targets and pathological mechanisms in autoimmune thyroid diseases / R. Martínez-Hernández, A. Serrano-Somavilla, A. Ramos-Leví [et al.] // *EBioMedicine.* – 2019. – Vol. 50. – P. 329–342. doi:10.1016/j.ebiom.2019.10.061.

29. Titov, S. E. MiRNA profiling, detection of BRAF V600E mutation and RET-PTC1 translocation in patients from Novosibirsk oblast (Russia) with different types of thyroid tumors / S. E. Titov, M. K. Ivanov, E. V. Karpinskaya [et al.] // *BMC Cancer.* – 2016. – Vol. 16. – article number: 201. doi:10.1186/s12885-016-2240-2.

30. Marabita, F. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR / F. Marabita, P. de Candia, A. Torri [et al.] // *Brief Bioinform.* – 2016. – Vol. 17, Issue 2. – P. 204–212. doi:10.1093/bib/bbv056.

References

1. Koritko, S. S. Bolezni jendokrinnoj sistemy v Belarusi – statisticheskie i demograficheskie sopostavleniya [Endocrine disorders in Belarus – statistical and demographic comparisons] / S. S. Koritko, I. M. Hmara, O. B. Salko, V. V. Antsipau // *Meditsinskie novosti.* – 2013. – № 3. – P. 42–48. [in Russian].

2. Yakubouski, S. U. Jepidemiologija dobrokachestvennyh zabolevanij shhitovidnoj zhelezy u vzroslogo naselenija Respubliki Belarus': analiz obshhenacional'nyh statisticheskikh dannyh za period 2009–2019 gg [Epidemiology of benign thyroid disorders in the adult population of the Republic of Belarus: analysis of nationwide statistics 2009 to 2019] / S. U. Yakubouski, H. H. Kandratsenka, O. B. Salko, E. I. Ku-z'menkova. // *Problemy Jendokrinologii.* – 2022. – № 3 (68). – S. 30–43. [in Russian] doi: <https://doi.org/10.14341/probl12844>.

3. Ali, S. Z. The 2023 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology / S. Z. Ali, Z. W. Baloch, B. Cochand-Priollet [et al.] // *Thyroid.* – 2023. – Vol. 33, Issue 9. – P. 1039–1044. doi:10.1089/thy.2023.0141.

4. Yakubouski, S. U. Diagnostic Performance of Thyroid FNA: Experience of Belarusian National Referral Thyroid Cancer Center / S. U. Yakubouski, H. H. Kandratsenka, M. V. Fridman, V. A. Kondratovich, O. A. Perkhova // *Diagn Cytopathol.* – 2024. – Vol. 52, Issue 12. – P. 763–773. doi:10.1002/dc.25391.

5. Haugen, B. R. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer / B. R. Haugen, E. K. Alexander, K. C. Bible [et al.] // *Thyroid.* – 2016. – Vol. 26, Issue 1. – P. 1–133. doi:10.1089/thy.2015.0020.

6. Coca-Pelaz, A. Molecular Diagnostics and Personalized Therapeutics in Differentiated Thyroid Carcinoma: A Clinically Oriented Review / A. Coca-Pelaz, J. P. Rodrigo, M. Zafereo [et al.] // *Diagnostics (Basel).* – 2025. – Vol. 15, Issue 19. – article number: 2493. doi:10.3390/diagnostics15192493.

7. Imran, K. Epigenetic dysregulation in cancer: mechanisms, diagnostic biomarkers and therapeutic strategies / K. Imran, M. J. Iqbal, M. M. Ahmed [et al.] // *Med Oncol.* –

2025. – Vol. 42, Issue 8. – article number: 359. doi:10.1007/s12032-025-02905-z.

8. Titov, S. Preoperative detection of malignancy in fine-needle aspiration cytology (FNAC) smears with indeterminate cytology (Bethesda III, IV) by a combined molecular classifier / S. Titov, P. S. Demenkov, S. A. Lukyanov [et al.] // J Clin Pathol. – 2020. – Vol. 73, Issue 11. – P. 722–727. doi:10.1136/jclinpath-2020-206445.

9. Wang, H. A. Review of Nanotechnology in microRNA Detection and Drug Delivery / H. A. Wang // Cells. – 2024. – Vol. 13, Issue 15. – article number: 1277. doi:10.3390/cells13151277.

10. Madadi, S. MicroRNA expression studies: challenge of selecting reliable reference controls for data normalization / S. Madadi, H. Schwarzenbach, J. Lorenzen [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. – 2019. – Vol. 76, Issue 18. – P. 3497–3514. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03136-y>.

11. Ajish, T. P. Geriatric thyroidology: An update / T. P. Ajish, R. V. Jayakumar // Indian J Endocrinol Metab. – 2012. – Vol. 16, Issue 4. – P. 542–547. doi:10.4103/2230-8210.98006.

12. Teti, C. Lodoprophylaxis and thyroid autoimmunity: an update / C. Teti, M. Panciroli, E. Nazzari [et al.] // Immunol Res. – 2021. – Vol 69, Issue 2. – P. 129–138. doi:10.1007/s12026-021-09192-6.

13. Braverman, L. E. Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text. 11th edition / L. E. Braverman, D. S. Cooper, P. A. Kopp. – Wolters Kluwer, 2021. – 912 p.

14. Ralli, M. Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation / M. Ralli, D. Angeletti, M. Fiore [et al.] // Autoimmun Rev. – 2020. – Vol. 19, Issue 10. – article number: 102649. doi:10.1016/j.autrev.2020.102649.

15. Condello, V. MicroRNA regulator gene mutations in thyroid follicular nodular disease and thyroid cancer: does it all come down to timing? / V. Condello, C. C. Juhlin // Eur Thyroid J. – 2024. – Vol.13, Issue 6:e240298. doi:10.1530/ETJ-24-0298.

16. Baloch, Z. W. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms / Z. W. Baloch, S. L. Asa, J. A. Barletta [et al.] // Endocr Pathol. – 2022. – Vol. 3, Issue 1. – P. 27–63. doi: 10.1007/s12022-022-09707-3.

17. Mizukami, Y. Chronic thyroiditis: thyroid function and histologic correlations in 601 cases / Y. Mizukami, T. Michigishi, M. Kawato [et al.] // Hum Pathol. – 1992. – Vol. 23, Issue 9. – P. 980–988. doi:10.1016/0046-8177(92)90258-5.

18. *Klinicheskij protokol «Algoritmy diagnostiki i lechenija zlokachestvennyh novoobrazovanij»* [Clinical protocol «Algorithms for the diagnosis and treatment of malignant neoplasms», utverzhdenyj Postanovleniem Ministerstva zdravoohraneniya Respubliki Belarus' ot 6 ijulja 2018 g. № 60. Access: <https://minzdrav.gov.by/upload/dadvfiles/КП%20Алгоритмы%20диагностики%20и%20лечения%20злокач.%20новообр%20пост.%20МЗ%20РБ%20от%2006.07.2018%20№%2060.pdf>. Access date: 06.09.2025. [in Russian].

19. *Klinicheskij protokol «Diagnostika i lechenie pacientov s zabolevanijami shhitovidnoj zhelezy (vzrosloe naselenie)»* [Clinical protocol «Diagnosis and treatment of patients with thyroid diseases (adult population)», utverzhdenyj Postanovleniem Ministerstva zdravoohraneniya Respubliki Belarus' ot 21 ijulja 2021 g. № 85. Access: https://minzdrav.gov.by/upload/dadvfiles/СПротокол/2КП_Диагностика_и_лечение_пациентов_с_заболеваниями_щитовидной_же

лезы_взр_нас_пост_МЗ_21062021_85.pdf Access date: 06.09.2025 [in Russian].

20. *Metodika opredeleniya mikroRNK v gistologicheskikh preparatakh shchitovidnoi zhelezy, fiksirovannykh formalinom i zalit'yx parafinom* [Methodology for determining microRNA in histological preparations of the thyroid gland, fixed in formalin and embedded in paraffin] / Institut genetiki i tsitologii Natsional'noi akademii nauk Belarusi. – Minsk : Pravo i ekonomika. – 2023. – 32 s. – ISBN 978-985-887-097-3. [in Russian].

21. Yakubouski, S. U. Jekspressija jepigeneticheskikh markerov pri autoimmunom tireoidite [Expression of epigenetic markers in autoimmune thyroiditis] / S. U. Yakubouski, V. N. Kipen, M. V. Fridman [et al.] // BGMU v avangarde meditsinskoj nauki i praktiki : retsenzir. ezhegod. sb. nauch. tr. : v 2 t. / M-vo zdravookhr. Resp. Belarus', Bel. gos. med. un-t; pod red. S. P. Rubnikovicha, V. A. Filonyuka. – Minsk: BGMU 2024. – Vyp. 14. – T. 1: Klinicheskaya meditsina. – 245 s. – S. 231–238. [in Russian].

22. Untergasser, A. Web-based LinRegPCR: application for the visualization and analysis of (RT)-qPCR amplification and melting data / A. Untergasser, J. M. Ruijter, V. Benes, M. J. B. van den Hoff // BMC Bioinformatics. – 2021. – Vol. 22, Issue 1. – article number:398. doi:10.1186/s12859-021-04306-1.

23. Grabia, S. NormiRazor: tool applying GPU-accelerated computing for determination of internal references in microRNA transcription studies / S. Grabia, U. Smczynska, K. Pagacz, W. Fendler. // BMC Bioinformatics. – 2020. – Vol. 21, Issue 1. – article number:425. doi:10.1186/s12859-020-03743-8.

24. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // Methods. – 2001. – Vol. 25, Issue 4. – P. 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

25. Perkins J. R., ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data / J. R. Perkins, J. M. Dawes, S. B. McMahon [et al.] // BMC Genomics. – 2012. – Vol. 13. – article number: 296. doi:10.1186/1471-2164-13-296.

26. Zhang, T. The Application of microRNAs in Papillary Thyroid Cancer: A Bibliometric and Visualized Analysis / T. Zhang, B. Yuan, S. Yu // Int J Gen Med. – 2024. – Vol. 17. – P. 4681–4699. doi:10.2147/IJGM.S487239.

27. Martínez-Hernández, R. MicroRNAs in autoimmune thyroid diseases and their role as biomarkers / R. Martínez-Hernández, M. Marazuela // Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. – 2023. – Vol. 37, Issue 2. – article number: 101741. doi:10.1016/j.beem.2023.101741.

28. Martínez-Hernández, R. Integrated miRNA and mRNA expression profiling identifies novel targets and pathological mechanisms in autoimmune thyroid diseases / R. Martínez-Hernández, A. Serrano-Somavilla, A. Ramos-Leví [et al.] // EBioMedicine. – 2019. – Vol. 50. – P. 329–342. doi:10.1016/j.ebiom.2019.10.061.

29. Titov, S. E. MiRNA profiling, detection of BRAF V600E mutation and RET-PTC1 translocation in patients from Novosibirsk oblast (Russia) with different types of thyroid tumors / S. E. Titov, M. K. Ivanov, E. V. Karpinskaya [et al.] // BMC Cancer. – 2016. – Vol. 16. – article number: 201. doi:10.1186/s12885-016-2240-2.

30. Marabita, F. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR / F. Marabita, P. de Candia, A. Torri [et al.] // Brief Bioinform. – 2016. – Vol. 17, Issue 2. – P. 204–212. doi:10.1093/bib/bbv056.

Поступила 12.12.2025 г.