

ОЦЕНКА СОПОСТАВИМОСТИ ДАННЫХ ПО ЭКСПРЕССИИ микроРНК В ПРЕПАРАТАХ ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

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

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

²ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

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

COMPARABILITY ASSESSMENT OF *microRNA* EXPRESSION IN THYROID TISSUE SAMPLES

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

¹Educational institution “Belarusian state medical university”, Minsk, Belarus

²The Institute of Genetics and Cytology National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

³Health Care Institution “Minsk City Clinical Cancer Centre”, Minsk, Belarus

Введение. Рак щитовидной железы (РЩЖ) относится к наиболее распространенным злокачественным новообразованиям органов эндокринной системы. Изучение клеточной морфологии позволяет подтвердить характер образования в 70-75% случаев, тогда как остальные аспираты относятся к группе категорий неопределенного цитологического заключения [Naugen B.R. et al., 2016]. Последнее затрудняет выбор оптимального метода лечения этих пациентов, и приводит в ряде случаев к избыточно агрессивной тактике ведения пациентов.

МикроРНК (миРНК) представляют собой эндогенные некодирующие РНК. Идентифицированы специфичные для каждого гистологического типа РЩЖ паттерны экспрессии микроРНК, которые в значительной степени зависят от условий окружающей среды и генетико-популяционной структуры исследуемых групп пациентов [Ferris R.L. et al., 2015]. Данные паттерны экспрессии могут использоваться для разработки молекулярно-генетических тест-систем, позволяющих проводить предоперационную дифференциальную диагностику узловых образований щитовидной железы (ЩЖ).

Экспрессия микроРНК может изучаться в различных образцах тканей ЩЖ, как нефиксированных (замороженных), так и в фиксированных гистологических препаратах [Martinez-Hernandez R. et al., 2018].

Цель. Оценить сопоставимость результатов изучения экспрессии микроРНК в ткани ЩЖ (нефиксированных, замороженных образцах), а также экспрессии микроРНК в фиксированной формалином и залитой парафином ткани ЩЖ.

Материалы и методы. *Нефиксированная (замороженная) ткань.* 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 ЩЖ у этих же пациентов – контрольная группа 1.

Фиксированная в формалине и залитая парафином ткань. Было исследовано 88 образцов ткани папиллярной (опытная группа 1), и 27 образцов медуллярной карциномы у пациентов, оперированных в Минском городском клиническом онкологическом центре (МГКОЦ) в 2021-2023 годах, а также 16 образцов нормальной ткани ЩЖ – контрольная группа 2. Контрольная группа 2 была сформирована из образцов удаленной ЩЖ в тех случаях, когда при тотальной тиреоидэктомии, выполненной согласно действующим в Республике Беларусь протоколам лечения пациентов с онкологическими заболеваниями, в контралатеральной доле в ходе предоперационного ультразвукового и послеоперационного макро- и микроскопического исследования признаков патологии не выявлялось.

Забор и первичное гистологическое исследование материала осуществлялось врачом-патоморфологом патологоанатомической лаборатории МГКОЦ. Для гистологических исследований образцы ткани ЩЖ фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине и заключали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Включенные в исследование образцы ткани подвергались повторному экспертному патоморфологическому исследованию.

Депарафинизация среза гистологического препарата осуществлялась с использованием толуола и цетана; выделение микроРНК производилось с использованием набора LRU-100-50 (Biolabmix, Россия) по адаптированному протоколу [Кипень В.Н. и др., 2023]. В образцах опухолевой и нормальной ткани определяли содержание 13 микроРНК, которые были выбраны для исследований на основании анализа литературных данных (hsa-miR-21-5p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-144-5p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-187-3p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-375-3p). Синтез кДНК осуществляли с использованием набора ArtMMLV Total (АртБиоТех, Беларусь) согласно оригинальному протоколу [Кипень В.Н. и др., 2023]

Для анализа графиков, полученных при проведении кПЦР, использован метод прямого сравнения графиков Cp (crossing point), реализованный в программе LinRegPCR v.11.0. Оценку изменения уровня экспрессии микроРНК в опытном образце по отношению к контрольному вычисляли по формуле M.W. Pfaffl (2001).

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel 2019 и SPSS v.20.0 (IBM, США).

Результаты и обсуждение. В нефиксированной (замороженной) ткани 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 и miR-205 была подавлена.

В фиксированных образцах папиллярной карциномы была выявлена тенденция к гиперэкспрессии лишь miR-21, miR-146b, miR-187, miR-200b, miR-221, miR-222. В ткани медуллярной карциномы гиперэкспрессированы были miR-21, miR-125a, miR-138, miR-187, miR-200a, miR-200b, miR-221, miR-222.

Таким образом, в ходе проведенных исследований была установлена однонаправленная динамика изменений экспрессии большинства микроРНК при медуллярном раке (12 из 13), что на наш взгляд, подтверждает сопоставимость методов изучения экспрессии микроРНК в фиксированных и нефиксированных образцах ткани. Различия в направленности экспрессии ряда микроРНК при папиллярной карциноме (6 из 13 демонстрировали гиперэкспрессию), на наш взгляд, могут объясняться как разнородностью группы, включающей различные гистологические подтипы данной опухоли, что влияет на профиль экспрессии микроРНК [Santiago K. et al., 2020], так и характером образца, использованного в исследовании [Martinez-Hernandez R., Marazuela M., 2023].

Выводы.

Данные, полученные при изучении экспрессии микроРНК в фиксированных и нефиксированных образцах позволяют предположить наличие сопоставимости получаемых при их использовании результатов. Имеющиеся расхождения в характере экспрессии ряда микроРНК могут объясняться как разнородностью изученной группы папиллярной карциномы, так и особенностями подготовки образцов. Вместе с тем, разработанная методика изучения экспрессии микроРНК в фиксированных в формалине и залитых в парафин образцах ткани позволяет использовать традиционные архивные материалы, что значительно расширяет возможности исследования данного класса эпигенетических маркеров.