

Метод дифференциальной диагностики узловых заболеваний щитовидной железы: анализ комбинации микроРНК (miРНК-21, -181A и -146A)

Р.Б. Самсонов^{1, 5, 6}, В.С. Бурдаков², Т.А. Штам^{2, 6}, З.А. Раджабова¹,
Ю.В. Чебуркин^{1, 6}, Д.А. Васильев¹, Е.В. Цырлина¹, С.Е. Титов^{3, 4}, М.К. Иванов⁴,
М.В. Филатов², Л.М. Берштейн¹, Н.Н. Колесников³, А.В. Малек^{1, 2, 6}

¹ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

²ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»; Россия, 188300, Ленинградская обл., Гатчина, м-р Орлова роща, д. 1;

³ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии» СО РАН;

Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8/2;

⁴АО «Вектор-Бест», Россия, 630559, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Кольцово, зона АБК; Научно-производственная зона, корп. 36, ком. 211, 630117, Новосибирск-117, а/я 492;

⁵ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России, Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 70;

⁶ООО «Онкосистема», Россия, 143026 Москва, территория инновационного центра «Сколково», ул. Луговая, 4, стр. 9, помещение 16

Контакты: Роман Борисович Самсонов Rom_207@mail.ru

Введение. В клинической практике существует проблема дифференциальной диагностики узловых заболеваний щитовидной железы (ЩЖ), решению которой может способствовать разработка новых, надежных и специфических, онкомаркеров. Малые регуляторные рибонуклеиновые кислоты (РНК) — микроРНК, или миРНК, — выполняют функцию посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. Внутриклеточные и секретируемые во внеклеточное пространство миРНК могут быть использованы в качестве маркеров различных заболеваний, включая онкологические. Стабильность внеклеточной миРНК определяется связью с белками, липопротеинами или «упаковкой» в мембранные микровезикулы — экзосомы. Есть основания предполагать, что экзосомы со специфическим составом миРНК являются результатом процесса активной и биологически значимой секреции, в то время как высвобождение других форм миРНК сопровождается апоптотической или некротической гибелью клеток. Это определяет особую диагностическую ценность экзосомальной фракции циркулирующих миРНК, которая может отражать наличие и клинически значимые свойства опухоли.

Цель исследования — отработка метода выделения и анализа экзосомальной миРНК, определение «маркерных» миРНК и оценка их диагностической значимости.

Материалы и методы. В работе были использованы образцы сыворотки крови 57 больных с различными узловыми образованиями ЩЖ и 13 здоровых доноров. Экзосомы выделяли из сыворотки крови пациентов классическим методом ультрацентрифугирования и анализировали с помощью атомной силовой микроскопии, лазерной корреляционной спектроскопии и метода вестерн-блоттинга. Анализ содержания миРНК проводили по методу полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. Были определены миРНК, содержание которых в экзосомах коррелирует со статусом узлового заболевания ЩЖ. Показано, что профиль экспрессии 3 миРНК (миРНК-21, -146a и -181a) имеет характерные черты при различных формах узловых заболеваний ЩЖ и его анализ может иметь диагностическую ценность.

Выводы. Экзосомы, выделенные ультрацентрифугированием из сыворотки крови, являются источником РНК, пригодной для последующего анализа миРНК. Уровни содержания различных миРНК в экзосомах сыворотки могут отличаться на 1–2 порядка. «Маркерные» экзосомальные миРНК имеют характерный профиль представленности в циркулирующих экзосомах пациентов с различной природой узловых образований ЩЖ. Клиническая значимость тестирования экзосомальных миРНК у больных с доброкачественными и злокачественными узловыми образованиями ЩЖ может быть повышена путем параллельной оценки нескольких молекул и анализа профиля их представленности в экзосомах. МиРНК-181a, -146a и -21 формируют диагностически значимую комбинацию представленных в циркулирующих экзосомах «маркерных» молекул, которую можно расширить и использовать для диагностики (дифференциальной диагностики) узловых образований ЩЖ.

Ключевые слова: щитовидная железа, узловые образования, микроРНК, миРНК, экзосомы, маркер

Analysis of a miRNA set (miR-21, -181a, and -146a) as a method of differential diagnosis of thyroid nodules

R.B. Samsonov^{1, 5, 6}, V.S. Burdakov², T.A. Shtam^{2, 6}, Z.A. Radzhabova¹, Y.V. Cheburkin^{1, 6}, D.A. Vasilyev¹, E.V. Tsyrlina¹, S.E. Titov³, M.K. Ivanov³, M.V. Filatov², L.M. Bernstein¹, N.N. Kolesnikov³, A.V. Malek^{1, 2, 6}

¹N.N. Petrov Research Institute of Oncology at the Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaya St., Pesochnyy Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia;

²Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Center "Kurchatov Institute"; 1 Orlova Roshcha, Gatchina, Leningrad District 188300, Russia;

³Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 8/2 Akademika Lavrentieva Av., Novosibirsk 630090, Russia;

⁴Vector-Best Ltd.; ABK zone, Koltsovo Settlement, Novosibirsk District 630559, Russia;

⁵Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, Ministry of Health of Russia; 70 Leningradskaya St., Pesochnyy Settlement, Saint-Petersburg 197758, Russia;

⁶Oncosystem; room 16, 4–9 Lugovaya St., Skolkovo Innovation Center, Moscow 143026, Russia

Introduction. In clinical practice, differential diagnosis of nodular thyroid diseases poses a serious problem which can be solved by development of new, safe, and specific thyroid tumor markers. Small regulatory RNAs (microRNA, miRNA) are a class of molecules that control gene expression at the post-transcriptional level. miRNAs, both intracellular and secreted into the extracellular space, can be used as markers of various diseases, including cancer. Stability of extracellular miRNAs is determined by binding to proteins and lipoproteins, or by "packing" into membrane microvesicles — exosomes. It is considered that exosomes with specific miRNA content are a result of active and biologically significant secretion, while release of other forms of miRNA is associated with apoptotic or necrotic cell death. This determines diagnostic value of exosomal fraction of circulating miRNAs, which may reflect presence or clinically significant properties of a tumor.

The study objective was to explore a method of exosomal miRNA isolation, identify marker miRNAs, and estimate diagnostic value of their analysis.

Methods. We used serum samples from 57 patients with nodular thyroid diseases and 13 healthy donors. Exosomes were isolated from serum by ultracentrifugation and analyzed by atomic force microscopy, laser correlation spectroscopy, and western blotting. Analysis of exosomal miRNAs was carried out by RT-PCR.

Results. We have identified a specific correlation between certain miRNAs and status of thyroid nodular disease. Expression profiles of three miRNAs (miRNA-21, miRNA-146a, and miRNA-181a) exhibited specific characteristics for different forms of nodular thyroid disease and their analysis may have diagnostic value.

Conclusions. Exosomes isolated by ultracentrifugation from serum are a source of RNA suitable for subsequent analysis of miRNA. The levels of different miRNAs in serum exosomes may differ by 1–2 times. «Marker» exosomal miRNAs have specific profiles in circulating exosomes of patients with different thyroid nodules. Clinical significance of testing exosomal miRNAs in patients with benign and malignant nodules of the thyroid gland can be increased by a parallel assessment of several molecules and analysis of the profile of their representation in exosomes. MiRNA-181a, -146a, and -21 form a diagnostic combination of «marker» molecules present in the circulating exosomes, which can be extended and used for diagnosis (differential diagnosis) of thyroid nodules.

Key words: thyroid gland, nodules, miRNA, exosomes, marker

Введение

Злокачественные новообразования, развивающиеся из фолликулярных или С-клеток щитовидной железы (ЩЖ), составляют разнородную группу онкологических заболеваний. Их классификация основана на степени дифференцировки и форме гистопатологического строения опухолевой ткани и включает следующие основные варианты: папиллярная, фолликулярная, медуллярная карциномы и анапластический рак. Наиболее часто встречающаяся форма — папиллярная карцинома — характеризуется относительно благоприятным прогнозом [1]. При выявлении ее на ранних стадиях 90 % пациентов проживают 5 и более лет [2]. Но даже с учетом относительно благополучных показателей эпидемиологической статистики диагностика и лечение папиллярного рака ЩЖ (РЩЖ) часто представляют собой нетривиальную клиническую задачу [3]. В частности, эффективный скрининг пациентов, имеющих асимптомные узловые образования ЩЖ, или динамическое наблюдение за больными, перенес-

шими радикальное хирургическое лечение, осложняется нехваткой надежных, специфических и чувствительных биомаркеров [4].

Исследования физиологической роли и патологических эффектов «некодирующих» регуляторных рибонуклеиновых кислот (РНК) показали возможность их использования в качестве маркеров различных заболеваний, включая онкологические [5]. Например, нарушения состава и активности системы посттранскрипционного контроля генной экспрессии, опосредуемой короткими одноцепочечными молекулами микроРНК (миРНК), имеют характерные признаки при ряде онкологических заболеваний [6], включая РЩЖ [7]. Оценка таких изменений может лежать в основе разработки диагностических и прогностических тест-систем [8, 9]. Например, уже разработаны и допущены к клиническому использованию системы для диагностики рака легких, почек, мезотелиомы и неизвестной первичной локализации [10]. На стадии клинических испытаний находятся тест-системы для

первичной или дифференциальной диагностики РЩЖ, представленные компанией Rosetta Genomics (США).

В дополнение к достаточно детально исследованной функции внутриклеточной регуляции генной экспрессии следует добавить, что миРНК могут секретироваться клеткой во внеклеточное пространство и попадать в кровь, мочу, ликвор и другие биологические жидкости. Во внеклеточном пространстве миРНК обнаруживаются в комплексе с белками, липопротеидами или в составе мембранных микровезикул, так называемых экзосом. На основе современных экспериментальных данных можно предположить, что именно экзосомальные миРНК являются активной и биологически значимой формой [11]. Их специфический состав, возможность направленного транспорта и избирательного «акцептирования» экзосом окружающими клетками или клетками анатомически отдаленных органов свидетельствуют о значимой регуляторной и «коммуникационной» роли экзосом и экзосомальных миРНК [12]. Особое патогенное значение имеют экзосомы, секретруемые опухолевыми клетками [13]. Как показано в экспериментальных исследованиях, опухолевые экзосомы опосредуют угнетение активности иммунной системы [14], ускоряют процесс метастазирования [15] и участвуют в развитии резистентности к химиотерапии [16]. Непосредственными медиаторами этих эффектов являются экзосомальные миРНК.

Очевидно, что детекция циркулирующих миРНК может иметь диагностическое и прогностическое значение, что было показано в ряде исследований, включая работы, посвященные РЩЖ [17–19]. Есть основания предположить, что выделение и анализ экзосомальной фракции циркулирующих миРНК могут повысить специфичность и клиническую значимость тестов для диагностики РЩЖ, ускорить их разработку и внедрение в клиническую практику. Отработка методики такого анализа и подтверждение его клинической значимости составили задачи данного исследования.

Материалы и методы

Дизайн исследования (рис. 1). Первым этапом работы был скрининг относительно большого числа миРНК, имеющих известное значение в развитии онкологических заболеваний, в целях выбора наиболее перспективных «маркерных» молекул. Проведен сравнительный анализ экзосомальной фракции миРНК, полученной из сыворотки крови пациентов ($n = 10$) с папиллярным РЩЖ, до тиреоидэктомии и через 7–10 дней после нее. Предполагалось, что удаление опухоли приведет к снижению содержания опухолевых экзосом в кровотоке и, следовательно, к изменению профиля детектируемых миРНК. В результате из 84 было выбрано 11 миРНК, детектируемый уровень содержания которых в экзосомах снижался после операции. Вторым этапом исследования была оценка диа-

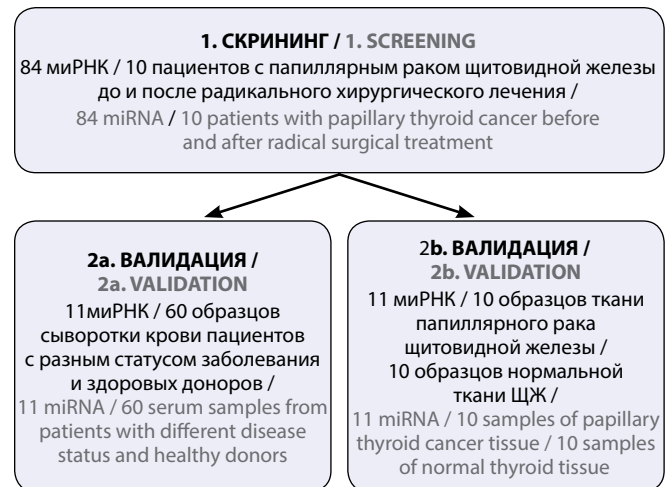


Рис. 1. Дизайн исследования
Fig. 1. Study design

гностической значимости выбранных потенциальных «маркеров» путем анализа экзосомальных миРНК, выделенных из сыворотки крови пациентов с разным клиническим статусом заболевания и здоровых доноров ($n = 60$).

В исследование были включены следующие группы: 8 пациентов с аденомой ЩЖ, 8 – с фолликулярным РЩЖ, 10 – с начальной стадией (T1N0M0) папиллярного РЩЖ, 9 – с локально распространенным (T2–4N0M0) РЩЖ, 12 – с метастатическим (TxN1–xM1–x) РЩЖ и 13 здоровых доноров. Параллельно был проведен анализ экспрессии 11 выбранных на первом этапе миРНК в образцах ткани папиллярного рака и неизменной ткани ЩЖ.

Клинический материал. Проведение исследования и использование клинических данных, операционного материала и сыворотки пациентов были одобрены этическим комитетом ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Для получения венозной крови применялись вакуумные системы для забора венозной крови. В течение 2 ч с момента забора крови сыворотка отделялась путем центрифугирования (1500g, 15 мин, +4 °C), аликвотировалась и замораживалась при –80 °C до дальнейшего использования. Ткань (опухолевая и неизменная ткань ЩЖ) была получена сразу после операции и заморожена в жидком азоте.

Выделение и характеристика экзосом сыворотки крови. Для выделения экзосом сыворотка (2 мл) размораживалась до +4 °C, разводилась (1 : 1) в фосфатно-солевом буфере и центрифугировалась (20 000g, 1 ч, +4 °C) для осаждения клеточного детрита и крупных мембранных везикул. Экзосомы выделялись из супернатанта путем ультрацентрифугирования (100 000g, 3 ч, +4 °C). Осадок, содержащий экзосомы, разводился в фосфатно-солевом буфере для анализа физических характеристик или в соответствующем лизис-буфере (для выделения белков или РНК).

Атомная силовая микроскопия (АСМ). Применялась для прямой визуализации экзосомных частиц и их агрегатов, что требовало дополнительной промывки (осаждения) центрифугированием экзосом для удаления мажорных плазменных белков. Затем образцы наносили на свежесколотую слюду, фиксировали 0,5 % глутаровым альдегидом, промывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре. Исследования проводили на сканирующем зондовом микроскопе (СЗМ) Solver Bio (ООО «НТ-МДТ», Россия, Зеленоград) в полуконтактном режиме сканирования на воздухе. Использовали зонды серии NSG03 (ООО «НТ-МДТ») с константой жесткости ~5 Н/м, амплитудой сканирования 4 нм, скоростью сканирования 1 Гц. Полученные СЗМ-изображения обрабатывали с помощью прилагаемого программного обеспечения Image Analysis Nova.

Лазерная корреляционная спектроскопия (ЛКС). Метод использовали в качестве основного метода регистрации экзосом в биологических жидкостях. Размер наночастиц (гидродинамический радиус) рассчитывали на основе данных о коэффициенте диффузии. Измерения проводили на лазерном корреляционном спектрометре «ЛКС-03» (ООО «Интокс», Россия, Санкт-Петербург). Результат измерений представляется в виде гистограммы распределения частиц по размерам (гистограмма фракционного состава), на которой ось абсцисс — шкала размеров, представленная в нанометрах, а по оси ординат отложен вклад в общее рассеяние образца частиц данного размера в процентах. При этом суммарное рассеяние всех частиц образца принимается за 100 %.

Обогащение выделяемого методом ультрацентрифугирования осадка специфическими экзосомальными маркерами оценивалось по методу вестерн-блоттинга. Для этого взвесь экзосом, осажденных ультрацентрифугированием, и образец исходной сыворотки лизировали в растворе, содержащем 0,05 М Tris-HCl, pH 7,4; 0,15 М NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % SDS, в присутствии смеси ингибиторов протеолиза P8340 (Sigma Aldrich, США) в течение часа при +4 °С. После центрифугирования (17 000g, 20 мин, +4 °С) белковые экстракты были нормализованы с помощью набора для измерения концентрации белка BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США), для анализа использовалось 40 мкг белка. Электрофорез проводился в 10 % растворе SDS-PAGE (додецилсульфат натрия — электрофорез в полиакриламидном геле), для нанесения использовался стандартный нередуцирующий буфер Laemlli Sample Buffer, белки денатурировали при +95 °С, 5 мин перед нанесением в гель. Разделенные электрофорезом белки переносили на поливиниловую мембрану, которую блокировали в течение часа в 0,1 % растворе казеина в триссолевом буфере с твином-20 и инкубировали с антителами против экзосомальных маркерных белков

TSG101 (sc-7964, Santa Cruz, USA), CD63 (sc-15363, Santa Cruz, США) в разведении 1: 200. Визуализацию блотов проводили с помощью вторичных антител, меченных люминесцентной меткой, на сканере блотов (LI-COR Biotechnology, США).

Выделение РНК и анализ миРНК. Для выделения РНК из препаратов экзосом использовались наборы для выделения производства компании «БиоСилика» (Россия, Новосибирск). Профайлинг 84 микро-РНК проводился с использованием полимеразных цепных реакций с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) набора для обратной транскрипции миРНК и синтеза кДНК, панелей опухолевых миРНК и мастер-микса для ПЦР в реальном времени (производство компании Epiqon, Дания). Анализ выбранных в результате скрининга 11 потенциальных «маркерных» миРНК был проведен с помощью реагентику, разработанной и предоставленной для тестирования в рамках научного сотрудничества с компанией «Вектор-Бест» (Россия, Новосибирск). Последовательности праймеров для обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР) могут быть предоставлены авторами по запросу. ПЦР проводилась на аппарате для ПЦР в реальном времени в формате 96-луночных планшетов (Bio-Rad, США). Результаты были нормализованы относительно референсных миРНК — миРНК-191-5p и малой ядерной РНК U6 (миРНК U6) — или среднего для каждого эксперимента значения C_t по формуле: $2^{(C_{\text{reference}} - C_{\text{target}})}$, где C_t — значение цикла, на котором кривая флуоресценции пересекает пороговое значение. Статистические расчеты выполнены с помощью программы Graph Pad Prism 6.0.

Результаты и обсуждение

Выделение и оценка свойств экзосом. Визуализация экзосом, фиксированных на поверхности с помощью АСМ, позволяет приблизительно определить их форму и размерность. На рис. 2 изображение экзосом смоделировано в 2D (а) и 3D (б) форматах. В обоих случаях можно сделать заключение о том, что это отдельные структуры почти или практически округлой формы, размеры которых колеблются в пределах 50–300 нм. Более детальное представление о размере экзосом может быть получено с помощью ЛКС (рис. 2в). Как и в ряде предыдущих исследований, в данной работе мы наблюдали специфическое распределение анализируемых микровезикул на 2 дискретных класса с характерным диаметром частиц около 20 и 100 нм. С учетом данных литературы, можно предположить, что везикулы диаметром 100 нм представляют собой экзосомы. Везикулы меньшего диаметра являются либо специфическим классом экзосом, либо комплексами протеинов или липидными мицеллами, присутствующими в сыворотке и соосаждаемыми в процессе ультрацентрифугирования. Как показал вестерн-блоттинг, смесь везикул,

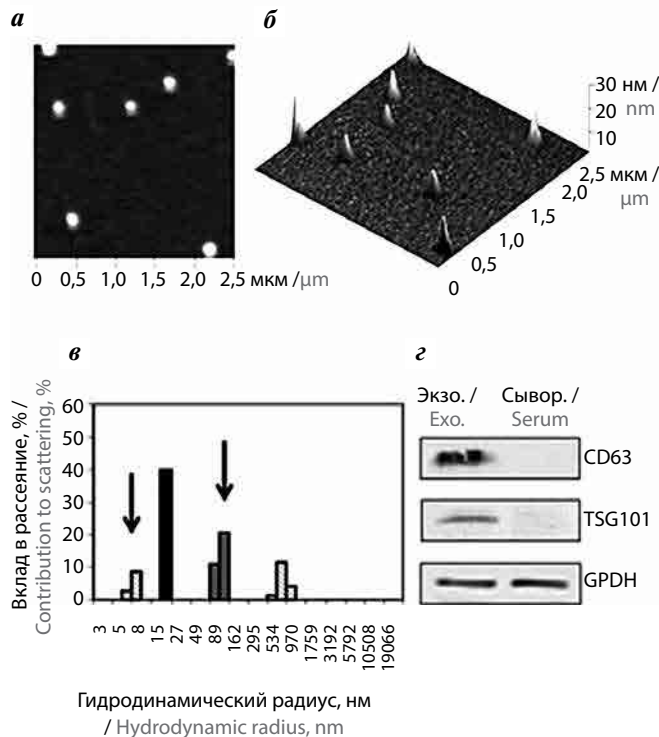


Рис. 2. Физические и биохимические характеристики выделяемых везикул: а и б — 2D и 3D изображения везикул, выделенных из сыворотки, полученные в ходе атомной силовой микроскопии; в — результат анализа состава и размерности смеси везикул методом лазерной корреляционной спектроскопии (фракции везикул показаны стрелками); г — вестерн-блоттинг экзосомальных маркеров (CD63 — мембранного белка семейства тетраспанинов и TSG101 — компонента эндосомального комплекса внутриклеточного транспорта) и белка GPDH (ген «домашнего хозяйства», по которому нормируется количество материала, наносимого на электрофорез — контроль количества белка) в получаемом после ультрацентрифугирования осадке в сравнении с исходной сывороткой. Экзо. — фракция экзосом, выделенная ультрацентрифугированием, Сывор. — сыворотка крови

Fig. 2. Physical and biochemical characteristics of isolated vesicles: а и б — 2D and 3D atomic force microscopy views of the vesicles isolated from serum; в — result of laser correlation spectroscopy analysis of composition and dimensions of the vesicle mixture (arrows show vesicle fractions); г — western blotting of exosomal markers (CD63 — membrane protein of the tetraspanin family, TSG101 — component of the endosomal complex of intracellular transport) and GPDH protein (housekeeping gene used for normalization of material applied to electrophoresis — protein quantity control) in the precipitate collected after ultracentrifugation compared to initial serum. Exo. — exosome fraction isolated by ultracentrifugation, Serum — blood serum

получаемая в результате ультрацентрифугирования, существенно обогащена так называемыми экзосомальными маркерами: компонентом эндосомального комплекса внутриклеточного транспорта TSG101 и мембранным белком семейства тетраспанинов CD63 (рис. 2г). На основе этих данных мы можем заключить, что получаемая смесь везикул обогащена экзосомами, но методы, использованные в данном исследовании, не позволяют определить точный состав смеси и оценить присутствие других типов везикул.

Профайлинг экзосомальных миРНК и выбор потенциальных «маркерных» молекул. В целом было прове-

дено 1680 тестов: уровень экспрессии 84 миРНК был оценен в 20 пробах (10 пациентов, до и после тиреоидэктомии). Детектируемое количество молекул миРНК было выявлено в 36 % наблюдений (в 608 случаях из 1680). Два типа молекул (миРНК-16-5p и -186-5p) не были детектированы ни в одном случае, 40 молекул были детектированы меньше чем в половине тестов (менее 10 случаев) и уровень экспрессии 42 молекул был выше порога чувствительности метода более чем в половине проведенных тестов (10 и более случаев).

Средние значения нормализованных показателей экспрессии этих 42 миРНК показаны на рис. 3. Заметна разница между количеством отдельных миРНК, содержащимся в экзосомах сыворотки: уровни экспрессии различных миРНК отличаются на 1–2 порядка. Аналогичные данные получены и в других исследованиях [20]. Кроме того, рис. 3 отражает стандартные отклонения, которые характеризуют определенный в ходе анализа размах флюктуаций представленности различных молекул миРНК. Для большинства молекул рассчитанное значение стандартного отклонения оказывается незначительным. Это свидетельствует о том, что представленность таких молекул в экзосомах мало отличается в анализируемых образцах. Представленность ряда других молекул миРНК в экзосомах заметно варьировала, хотя эти изменения в большинстве случаев носили случайный характер.

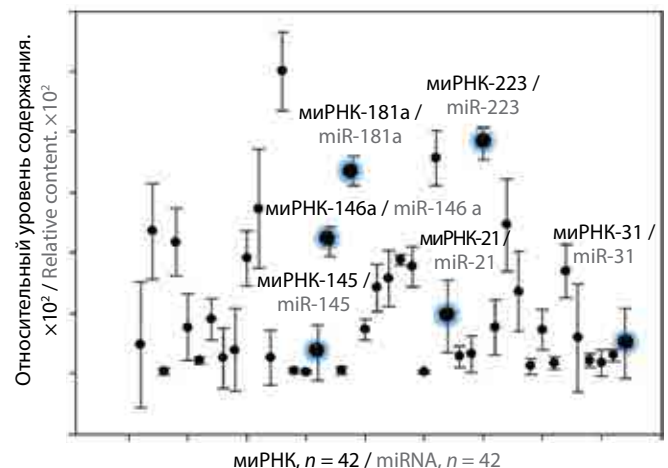


Рис. 3. Уровни содержания миРНК в экзосомах сыворотки крови больных раком щитовидной железы, определенные с помощью реагенти Cancer Focus microRNA PCR Panels (компания Exiqon, Дания). Приведены усредненные данные по содержанию 42 миРНК, определенному как минимум в 10 из 20 проведенных измерений до и после операции у 10 пациентов. Колебания показателя отражены стандартными отклонениями. Выделены миРНК, значимость изменений которых планируется показать в последующих экспериментах

Fig. 3. miRNA levels in serum exosomes of patients with thyroid cancer determined using Cancer Focus microRNA PCR Panels (Exiqon, Denmark). Averaged data on 42 miRNAs are presented. miRNA levels were determined in at least 10 of 20 performed measurements in 10 patients before and after surgery. Fluctuations of the characteristic are shown by standard deviation. Significance of highlighted miRNAs is going to be shown in the subsequent experiments

Целью данного этапа работы было определение таких миРНК, количество которых снижалось бы после операции. Статистически значимого снижения представленности не было выявлено ни для одной из 42 миРНК, включенных в анализ и представленных на рис. 3. При более детальном рассмотрении мы отобрали одиннадцать миРНК, представленность которых в экзосомах сыворотки крови пациентов с РЩЖ имела тенденцию к снижению после операции: миРНК-126-3р, -145-5р, -146а-5р, -150-5р, -155-5р, NA-181а-5р, -206, -21-5р, 221-3р, -223-3р и -31-5р. Полученные данные не дают возможности определить, что именно снизилось: содержание миРНК в циркулирующих экзосомах или количество циркулирующих экзосом, содержащих определенные миРНК. С учетом литературных данных [21] более вероятен 2-й вариант.

Анализ экспрессии 11 потенциальных «маркерных» молекул миРНК в опухолевой и нормальной ткани ЩЖ. Следующим этапом работы был поиск возможной корреляции между наличием потенциальных «маркерных» миРНК в экзосомах сыворотки и уровнем их экспрессии в ткани папиллярного РЩЖ. Тотальная РНК была выделена из препарата опухоли и нормальной ткани (10 пар образцов), полученных после тиреоидэктомии, уровень экспрессии 11 миРНК был оценен с помощью реакции миРНК-специфической ОТ и последующей ПЦР. Результаты по каждому образцу ткани были получены в ходе 3 параллельных ОТ-ПЦР, усреднены и нормализованы относительно мяРНК U6. При анализе результатов по 10 пациентам статистически значимое повышение уровня экспрессии в ткани опухоли относительно нормальной ткани ЩЖ было определено только для 3 из 11 миРНК (рис. 4). В остальных случаях наблюдалась аналогичная, но статистически незначимая разница уровней экспрессии «маркерных» миРНК в опухолевой ткани относительно нормальной.

Ни одна из 11 включенных в анализ миРНК не была экспрессирована в нормальной ткани выше, чем в опухолевой. Эти результаты дают основание предполагать, что опухолевая ткань могла быть источником экзосом, содержащих эти молекулы. С другой стороны, полученные данные не позволяют исключить возможность того, что другие ткани могут секретировать в кровотоке экзосомы, содержащие «маркерные» миРНК, вне зависимости от наличия или отсутствия опухолевого процесса. Кроме того, в нескольких экспериментальных исследованиях было показано наличие механизма внутриклеточной «сортировки» миРНК в процессе формирования экзосом и доказана разница между профилем миРНК внутри клетки и в экзосомах, секретируемых клеткой [22]. В целом, этот вопрос имеет скорее фундаментальное, а не прикладное значение, т. к. для практического использования миРНК в качестве онкомаркера важна связь между наличием

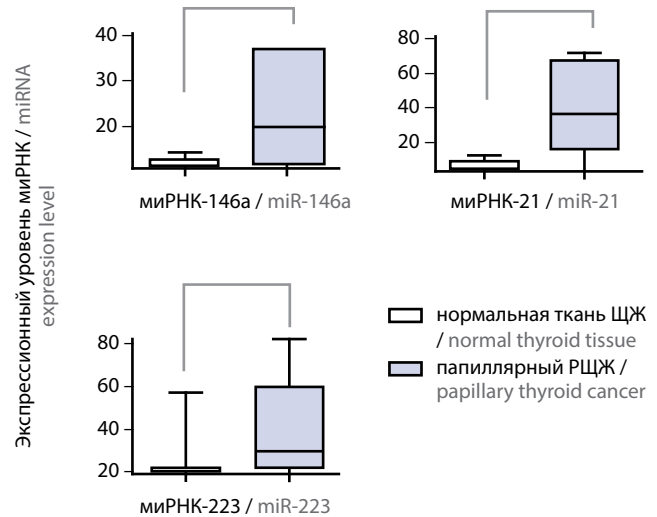


Рис. 4. Сравнительная экспрессия миРНК в неизменной ткани щитовидной железы (ЩЖ) и ткани папиллярного рака ЩЖ (РЩЖ), определенная с помощью полимеразных цепных реакций с обратной транскрипцией. Статистическая значимость оценена с помощью парного 2-выборочного t-теста: миРНК-146а ($p = 0,026$), -223 ($p = 0,0245$) и -21 ($p = 0,0048$)

Fig. 4. Comparative expression of miRNA in normal thyroid tissue and papillary thyroid cancer determined by reverse transcription – polymerase chain reaction. Statistical significance was determined using the paired 2-sample t-test: miRNA-146a ($p = 0.026$), -223 ($p = 0.0245$), and -21 ($p = 0.0048$)

опухоли и уровнем миРНК в сыворотке, даже если источником миРНК является неопухолевая ткань.

Анализ полученных данных и оценка клинической значимости анализа экзосомальных миРНК. Для определения диагностической значимости выбранных в ходе 1-го этапа работы потенциальных «маркерных» миРНК их представленность в экзосомах сыворотки крови пациентов с различным статусом заболевания (аденома щитовидной железы, фолликулярный РЩЖ, начальная стадия папиллярного РЩЖ, местно-распространенный и метастатический папиллярный РЩЖ) и здоровых доноров была оценена методом миРНК-специфической ОТ-ПЦР. Результаты по каждому образцу сыворотки были получены в ходе трех параллельных ОТ-ПЦР, усреднены и нормализованы относительно мяРНК U6 и миРНК-103а-5р, имеющих стабильный уровень экспрессии. Наиболее значимые результаты, полученные после объединения данных по клиническим группам, показаны на рис. 5. При этом можно проследить характерные изменения уровней экзосомальных миРНК, отражающие либо достоверные различия по этому параметру между клиническими ситуациями, либо прогрессирование заболевания. Например, уровень миРНК-181а повышен у пациентов с аденомой по сравнению с группой здоровых доноров и с больными РЩЖ. Причем эта разница статистически значима в случае местнораспространенного или метастатического РЩЖ и может, вероятно, быть использована не только в диагностических, но и прогно-

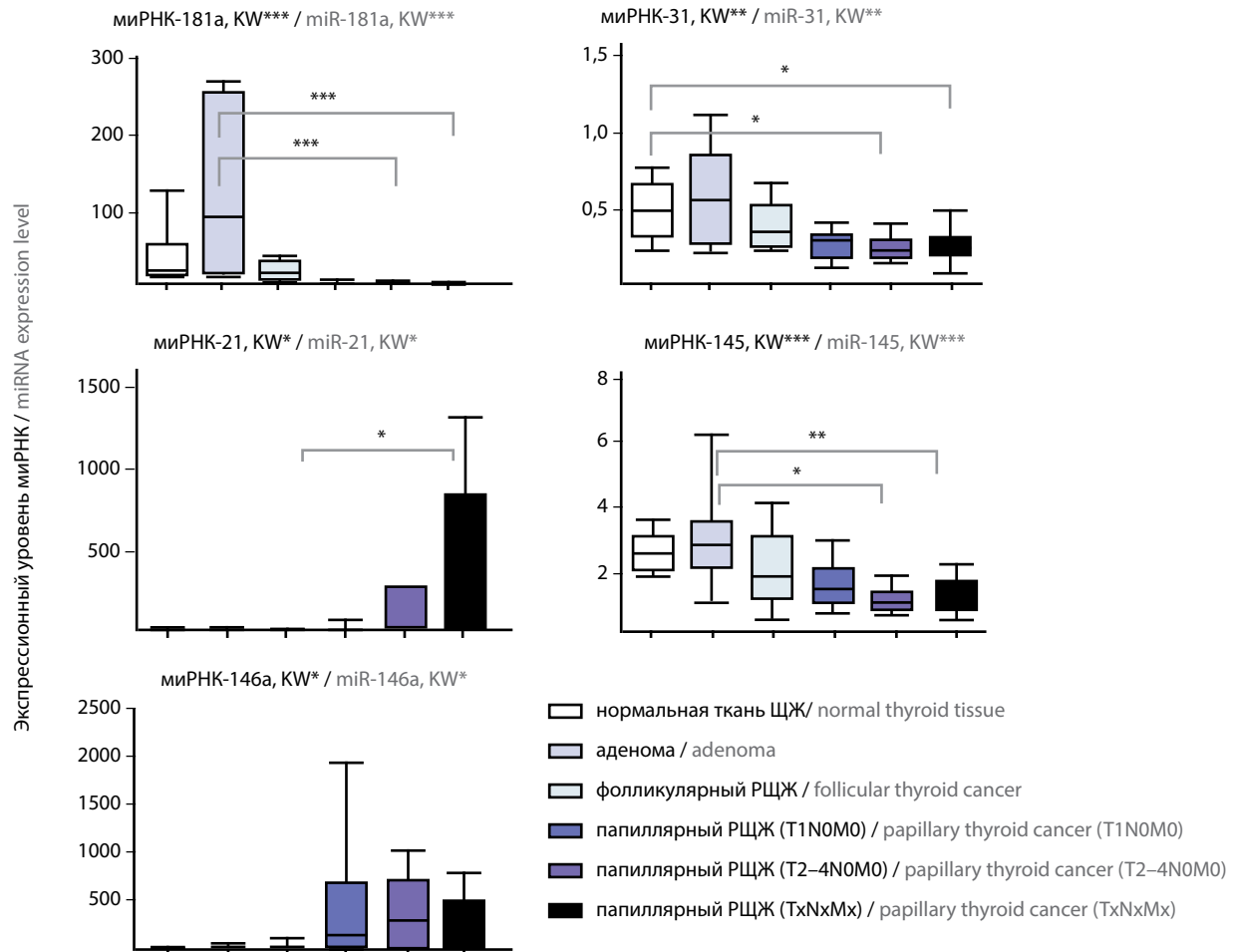


Рис. 5. Содержание маркерных миРНК в экзосомах сыворотки пациентов с различным статусом заболевания щитовидной железы (ЩЖ), определенное посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Статистическая значимость разницы между группами рассчитана с помощью критерия Краскела — Уоллиса (KW) при $*p < 0,05$, $**p < 0,005$, $***p < 0,0005$

Fig. 5. Marker miRNA levels in serum exosomes of patients with different thyroid disease status determined by reverse transcription — polymerase chain reaction. Statistical significance of difference between groups was determined using the Kruskal-Wallis test (KW) at $*p < 0.05$, $**p < 0.005$, $***p < 0.0005$

стических целях (поскольку, чем раньше определяется принадлежность больных РЩЖ к группам высокого или низкого прогностического риска, тем точнее намечаются лечебные мероприятия и их необходимый объем).

Похожий, но несколько «сглаженный» профиль изменения уровня экзосомальных миРНК в соответствии со статусом заболевания, был выявлен для миРНК-31 и -145. Максимальный уровень представленности этих миРНК характерен для доброкачественной опухоли ЩЖ, в то время как развитие фолликулярного или папиллярного РЩЖ сопровождается, как следует из полученных данных, снижением уровня миРНК-31 и -145 в составе циркулирующих экзосом. При папиллярном РЩЖ повышается уровень экзосомальных миРНК-146а и -21, при этом для последней это изменение отчетливо коррелирует с прогрессией заболевания и, в случае метастатического РЩЖ, является статистически значимым.

В целом представленные данные демонстрируют связь между уровнем «маркерных» экзосомальных миРНК и клиническим статусом пациентов с пролиферативными (доброкачественными и злокачественными) заболеваниями ЩЖ. Хотя исследование не привело к открытию «идеального» маркера папиллярного РЩЖ, связь между уровнем экзосомальных «маркерных» миРНК и развитием (прогрессией) заболевания прослеживается достаточно очевидно. Клиническая значимость оценки уровня «маркерных» миРНК может быть повышена путем параллельного анализа нескольких молекул. Например, на рис. 6 представлены профили 3 экзосомальных миРНК (миРНК-181а, -146а и -21), которые отчетливо различаются в случае аденомы, фолликулярного и папиллярного РЩЖ. Более того, можно заметить характерную тенденцию изменения этого профиля в процессе прогрессии папиллярного РЩЖ: относительное повышение уровня миРНК-21 при переходе от начальных стадий заболевания к его метастатической форме.

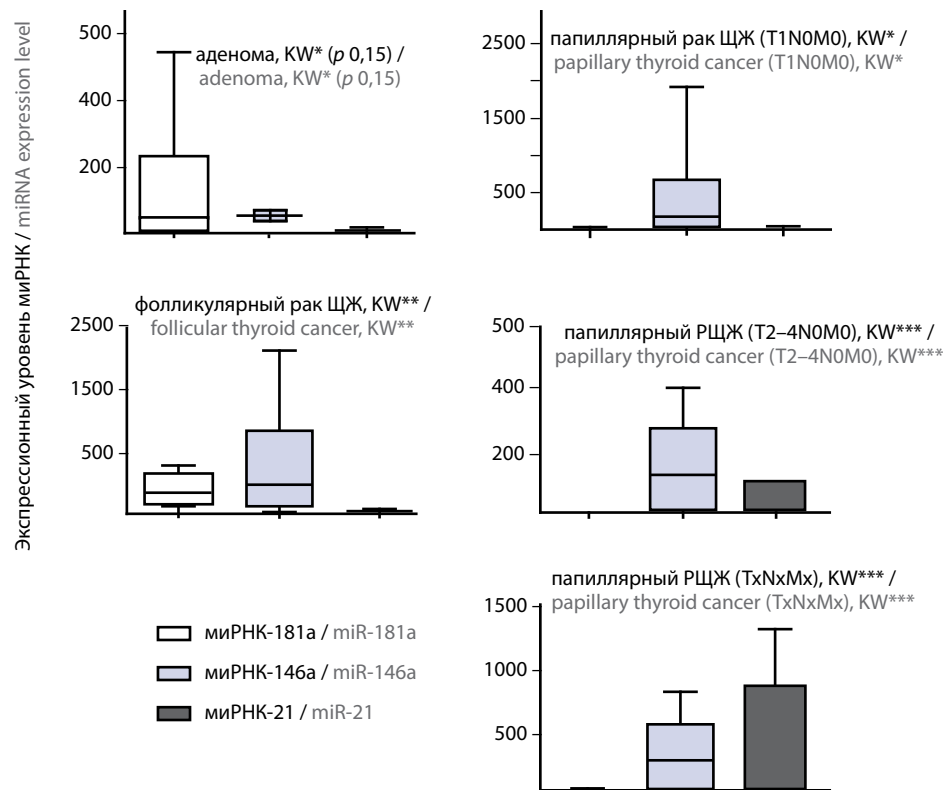


Рис. 6. Пример диагностически информативной комбинации миРНК, профиль представленности которых в экзосомах сыворотки пациентов показан при различных узловых заболеваниях щитовидной железы (ЩЖ). Статистическая значимость оценена путем расчета критерия Крускала–Уоллиса (KW) при * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$.

Fig. 6. Example of diagnostically informative combination of miRNAs. Exosome representation profile of these miRNAs in patient serum was identified in different nodular thyroid diseases. Statistical significance was determined using the Kruskal–Wallis test (KW) at * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$.

Таким образом, оценка профиля нескольких «маркерных» миРНК может иметь практическое значение для динамического наблюдения за больными с доброкачественными «латентными» узлами ЩЖ в качестве дополнительного метода дифференциальной диагностики растущих новообразований и контроля рецидивов или метастатической диссеминации РЩЖ после проведенного лечения.

Выводы

Приведенные данные и их анализ позволяют сделать следующие выводы по результатам нашего исследования.

1. Экзосомы могут быть выделены из сыворотки путем ультрацентрифугирования и служить источником РНК, пригодной для последующего анализа миРНК.

2. Уровни содержания различных миРНК в экзосомах сыворотки могут отличаться на 1–2 порядка, но в рамках анализируемой группы образцов у больных

с патологией ЩЖ в этом отношении наблюдались лишь незначительные межиндивидуальные колебания содержания отдельных миРНК.

3. Несколько «маркерных» экзосомальных миРНК (миРНК-145, -146а, -181а, -21-5р, -31), определенных в результате исследования, имеют характерный профиль представленности в циркулирующих экзосомах пациентов с различной природой узловых образований ЩЖ.

4. Клиническая значимость тестирования экзосомальных миРНК у больных с доброкачественными и злокачественными узловыми образованиями ЩЖ может быть повышена путем параллельной оценки нескольких «маркерных» молекул и анализа профиля их представленности в экзосомах.

5. МиРНК-181а, -146а и -21 формируют диагностически значимую комбинацию представленных в циркулирующих экзосомах «маркерных» молекул, которая может быть расширена и использована для диагностики (дифференциальной диагностики) узловых образований ЩЖ.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Валдина Е.А. Заболевания щитовидной железы. СПб.: Питер, 2013. [Valdina E.A. Diseases of the thyroid gland. Saint Petersburg: Piter, 2013. (In Russ.)].
2. Dean D.S., Gharib H. Epidemiology of thyroid nodules. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22(6):901–11. DOI: 10.1016/j.beem.2008.09.019. PMID: 19041821.
3. Luster M., Weber T., Verburg F.A. Differentiated thyroid cancer-personalized therapies to prevent overtreatment. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10(9):563–74. DOI: 10.1038/nrendo.2014.100. PMID: 24981455.
4. Kato M.A., Fahey T.J. Molecular markers in thyroid cancer diagnostics. *Surg Clin North Am* 2009;89 (5):1139–55. DOI: 10.1016/j.suc. 2009.06.012. PMID: 19836489.
5. Zipeto M.A., Jiang Q., Melese E., Jamieson C.H. RNA rewriting, recoding, and rewiring in human disease. *Trends Mol Med* 2015;21(9):549–59. DOI: 10.1016/j.molmed.2015.07.001. PMID: 26259769.
6. Di Leva G., Garofalo M., Croce C.M. MicroRNAs in cancer. *Ann Rev Pathol* 2014;9:287–314. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012513–104715. PMID: 24079833.
7. Forte S., La Rosa C., Pecce V. et al. The role of microRNAs in thyroid carcinomas. *Anticancer Res* 2015;35(4):2037–47. PMID: 25862858.
8. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Веряскина Ю.А. и др. МикроРНК, эволюция и рак. *Цитология* 2013; 55(3):159–64. [Kolesnikov N.N., Titov S.E., Veriaskina Yu.A. et al. MicroRNA, evolution, and cancer. *Tsitologiya* = Cytology 2013;55(3):159–64. (In Russ.)].
9. Nikiforova M.N., Chiosea S.I., Nikiforov Y.E. MicroRNA expression profiles in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2009;20(2):85–91. DOI: 10.1007/s12022-009-9069-z. PMID: 19352602.
10. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Жимулев И.Ф. МикроРНК в диагностике рака. *Наука в России* 2013;6(198):27–33. [Kolesnikov N.N., Titov S.E., Zimulev I.F. MicroRNA in cancer diagnostics. *Nauka v Rossii* = Science in Russia 2013;6 (198):27–33. (In Russ.)].
11. Sato-Kuwabara Y., Melo S.A., Soares F.A., Calin G.A. The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles-diagnostic and therapeutic implications (Review). *Int J Oncol* 2015;46(1):17–27. DOI: 10.3892/ijo.2014.2712. PMID: 25338714.
12. Zhang J., Li S., Li L. et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2015;13(1):17–24. DOI: 10.1016/j.gpb.2015.02.001. PMID: 25724326.
13. Малек А.М., Берштейн Л.М., Филатов М.В., Беляев А.М. Система экзосомальных межклеточных коммуникаций и ее роль в процессе метастатической диссеминации. *Вопросы онкологии* 2014;60(4):429–36. [Malek A.V., Berstein L.M., Filatov M.V., Belyaev A.M. System of exosomal cell communications and its role in the process of metastatic dissemination. *Voprosy onkologii* = Problems in Oncology 2014;60(4): 429–36]. (In Russ.)].
14. Ye S.B., Li Z.L., Luo D.H. et al. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* 2014;5(14):5439–52. DOI: 10.18632/oncotarget.2118. PMID: 24978137.
15. Rana S., Malinowska K., Zoller M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia* 2013;15(3):281–95. PMID: 23479506.
16. Challagundla K.B., Wise P.M., Neviani P. et al. Exosome-mediated transfer of microRNAs within the tumor microenvironment and neuroblastoma resistance to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2015;107(7). DOI: 10.1093/jnci/djv135. PMID: 25972604.
17. Yu S., Liu Y., Wang J. et al. Circulating microRNA profiles as potential biomarkers for diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97 (6):2084–92. DOI: 10.1210/jc.2011–3059. PMID: 22472564.
18. Lee J.C., Zhao J.T., Clifton-Bligh R.J. et al. MicroRNA-222 and microRNA-146b are tissue and circulating biomarkers of recurrent papillary thyroid cancer. *Cancer* 2013;119(24):4358–65. DOI: 10.1002/cncr.28254. PMID: 24301304.
19. Lee Y.S., Lim Y.S., Lee J.C. et al. Differential expression levels of plasma-derived miR-146b and miR-155 in papillary thyroid cancer. *Oral Oncol* 2015;51 (1):77–83. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2014.10.006. PMID: 25456009.
20. Ferracin M., Lupini L., Salamon I. et al. Absolute quantification of cell-free microRNAs in cancer patients. *Oncotarget* 2015;6(16):14545–55. DOI: 10.18632/oncotarget.3859. PMID: 26036630.
21. Chevillet J.R., Kang Q., Ruf I.K. et al. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(41):14888–93. DOI: 10.1073/pnas.1408301111. PMID: 25267620.
22. Cha D.J., Franklin J.L., Dou Y. et al. KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes. *Elife* 2015;1(4): e07197. DOI: 10.7554/eLife.07197. PMID: 26132860.