

Оценка диагностической роли микроРНК в составе экзосом циркулирующей крови при раке щитовидной железы

Р.Б. Самсонов^{1,2}, В.С. Бурдаков³, Д.А. Ракитина¹, Р.А. Нажмудинов¹,
Д.А. Васильев¹, З.А. Раджабова¹, М.В. Филатов³, А.В. Малек^{1,3}

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

²ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России; Россия, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 70;

³Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» ФГБОУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова»; Россия, 188300, Ленинградская обл., Гатчина, Орлова роща

Контакты: Анастасия Валерьевна Малек anastasia@malek.com

Проблема дифференциальной диагностики рака щитовидной железы (РЩЖ) остается актуальной в связи с распространенностью бессимптомных узловых образований щитовидной железы и отсутствием методов их неинвазивной дифференциальной диагностики. Опухоли щитовидной железы делятся на доброкачественные и злокачественные, соотношение встречаемости оценивается как 9:1. Корректная и своевременная дифференциальная диагностика является основой правильного выбора лечебной тактики и, соответственно, определяет результаты лечения. В течение последних лет методы молекулярно-генетического анализа активно разрабатываются и внедряются в клиническую практику, позволяя оптимизировать диагностический процесс. Анализ внутриклеточной и секретируемой (экзосомальной) фракций малых регуляторных РНК (микроРНК) является одним из наиболее перспективных методов диагностики онкологических заболеваний, включая РЩЖ. Стабильность внеклеточной микроРНК определяется связью с белками, липопротеинами или ее «упаковкой» в мембранные микровезикулы – экзосомы. Есть основания предполагать, что экзосомы со специфическим составом микроРНК являются результатом процесса активной и биологически значимой секреции, в то время как высвобождение других форм микроРНК сопровождается апоптотической или некротической гибелью клеток. Это определяет особую диагностическую ценность экзосомальной фракции циркулирующих микроРНК, которая может отражать наличие и клинически значимые свойства опухоли. В данной работе представлены методы и предварительные результаты собственных исследований по разработке нового метода диагностики и мониторинга РЩЖ, обсуждается современное состояние проблемы. Так, уровень экзосомальной микроРНК-21 отличает пациентов с фолликулярным РЩЖ, а уровень микроРНК-31 – больных с папиллярным РЩЖ от пациентов с доброкачественными узловыми образованиями. Реципрокные изменения концентрации микроРНК-21 и микроРНК-181a были определены при сравнении группы пациентов с папиллярным и фолликулярным РЩЖ.

Ключевые слова: щитовидная железа, узловой зоб, папиллярный рак, фолликулярный рак, микроРНК, экзосомы, маркер, дифференциальная диагностика, профиль экспрессии

DOI: 10.17650/2222-1468-2015-5-3-45-49

Assessment of diagnostic potency of exosomal microRNA in circulating blood of patient with thyroid cancer

R. B. Samsonov^{1,2}, V. S. Burdakov³, D. A. Rakitina¹, R. A. Nazhmudinov¹,
Z. A. Radzhabova¹, D. A. Vasilyev¹, M. V. Filatov³, A. V. Malek^{1,3}

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

²Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, Ministry of Health of Russia;
70 Leningradskaya St., Pesochnyi Settlement, Saint Petersburg, 197758, Russia;

³National Research Center “Kurchatov Institute”, B. P. Konstantinov Saint Petersburg Institute of Nuclear Physics;
Orlov Roshcha, Gatchina, Leningrad Region, 188300, Russia

Diagnostics of thyroid cancer (TC) remains a challenging issue due to the high incidence of asymptomatic thyroid nodular pathologies and absence of non-invasive methods of their assessment. Thyroid tumors are classified as benign and malignant with incidence ration approximated as 9:1. Correct and timely differential diagnosis is the basis for correctly choosing a treatment policy and hence determines treatment results. Methods for molecular genetic analysis are being recently developed and introduced into clinical practice, enabling the diagnostic process to be optimized. Analysis of the intracellular and secreted (exosomal) fractions of small regulatory RNAs (microRNAs) is one of the most promising methods for the diagnosis of cancers, including TC.

The stability of extracellular microRNA is determined by bonds to proteins, lipoproteins, or its encapsulation into the membrane microvesicles – exosomes. There is reason for suggesting that exosomes with the specific composition of microRNA are a result of the process of active

and biologically important secretion while release of other microRNA forms accompanies apoptotic or necrotic cell death. This determines the special diagnostic value of the exosomal fraction of circulating microRNAs, which may reflect the presence and clinically relevant properties of a tumor. This paper discusses the state of the problem and presents methods and preliminary results of the studies conducted by the authors to develop a novel method for diagnosing and monitoring TC. Thus, level of plasma exosomal miR-21 was shown to distinguish patients with benign tumor and follicular CT, while miR-31 can help to distinguish patients with benign tumor and papillary TC. Moreover, reciprocal character of miR-21 and miR-181a concentration in plasma exosomes was detected by comparison of patient with papillary and follicular TC.

Key words: thyroid, nodular goiter, papillary cancer, follicular cancer, microRNA, exosomes, marker, differential diagnosis, expression profile

Введение

В течение последних лет тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) считается оптимальным методом диагностики узловых образований щитовидной железы, так как обеспечивает относительно высокие показатели чувствительности и специфичности (65–98 и 72–100 % соответственно) [1]. Существенным недостатком этого метода является высокий процент «неинформативных» исследований, когда в силу различных объективных причин не удается установить цитологический диагноз. По данным разных авторов, от 10 до 25 % проведенных ТАБ не дают клинически значимой информации [2, 3]. Кроме того, в ряде случаев даже при получении достаточного по качеству и количеству материала затруднена оценка степени злокачественности ткани узла, что может приводить к неоднозначной интерпретации и ошибкам в тактике лечения. Например, авторы исследования, проведенного на базе Institute of Head and Neck Studies and Education, University Hospital of Coventry, UK, пришли к выводу, что около 80 % пациентов, перенесших тиреоидэктомию, могли избежать этой операции и, соответственно, многих послеоперационных осложнений [4]. Поэтому разработка новых – вспомогательных или альтернативных – методов диагностики узловых образований щитовидной железы является актуальной и клинически востребованной задачей.

В нескольких недавних публикациях отечественных и зарубежных авторов был отчетливо продемонстрирован потенциал диагностических методов, основанных на анализе малых регуляторных РНК (микроРНК) ткани узлов щитовидной железы [5–7]. Было показано, например, что экспрессия некоторых микроРНК специфично повышается при малигнизации ткани узла [5, 6] или достоверно отличается при различных гистологических вариантах опухоли [8]. Кроме того, известно, что опухолевые клетки секретируют специфический набор микроРНК в составе мембранных везикул, так называемых экзосом. В течение последних нескольких лет специфические изменения состава экзосомальной микроРНК были показаны для диагностики многих онкологических заболеваний, включая рак молочной железы [9–13], предстательной железы [14, 15], колоректальный рак [16] и др. С учетом результатов этих работ, анализ состава микроРНК циркулирующих экзосом рассматривается как новый перспективный ме-

тод диагностики, прогнозирования и мониторинга терапии онкологических заболеваний [17].

К настоящему моменту в базе PubMed представлено более 200 публикаций, посвященных составу микроРНК в ткани рака щитовидной железы (РЩЖ), проведены исследования корреляций этого состава с различными гистологическими вариантами заболевания и клиническими параметрами, но работы о параллельных изменениях состава микроРНК циркулирующих экзосом отсутствуют.

Задачи исследования

- Отработка метода выделения экзосом из плазмы и получения экзосомальной микроРНК в достаточном для последующего анализа количестве.
- Отработка метода анализа уровня экспрессии микроРНК методом обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (RT-qPCR) с использованием различных вариантов реакции ОТ (микроРНК-специфичной и универсальной).
- Оценка изменений профиля экспрессии микроРНК в циркулирующих экзосомах, полученных до и после оперативного удаления папиллярного РЩЖ у небольшой группы пациентов, и выбор микроРНК-молекул – вероятных маркеров заболевания.
- Валидация диагностической значимости выбранных микроРНК на материале, полученном от большой группы пациентов с различными узловыми заболеваниями щитовидной железы.

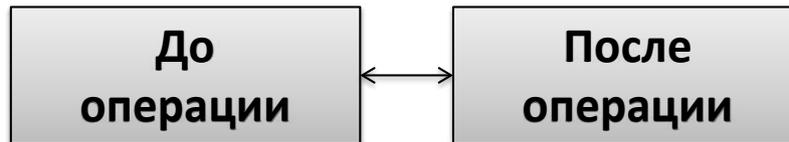
План исследования

План исследования, предполагающего 2 этапа, представлен на рис. 1.

На 1-м этапе был проведен анализ 84 раково-ассоциированных микроРНК в экзосомах 10 пациентов до и после операции. Предполагалось, что удаление опухоли приведет к снижению концентрации «опухолевых» экзосом в плазме, что отразится на профиле экзосомальных микроРНК и позволит отобрать вероятные маркерные молекулы.

На 2-м этапе была проведена количественная оценка маркерных микроРНК в экзосомах, выделенных из плазмы 50 пациентов с различными узловыми заболеваниями щитовидной железы, включая аденому

1. Скрининг 84 микроРНК (10 пациентов)



2. Валидация 14 микроРНК (50 пациентов)

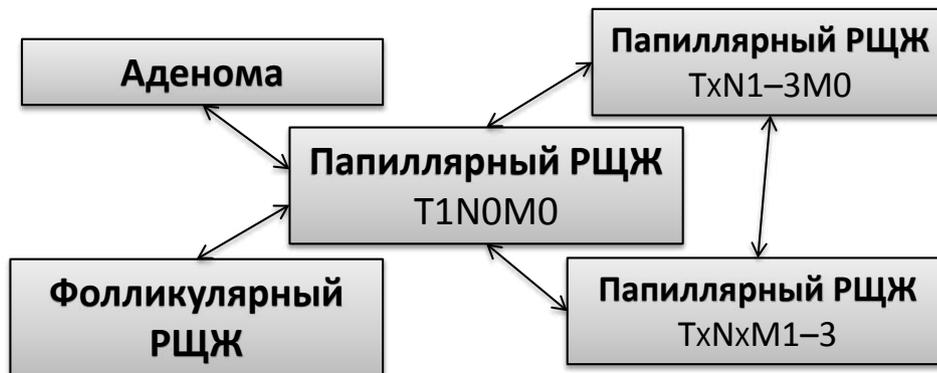


Рис. 1. Схема исследования

($n = 8$), фолликулярный ($n = 8$), локальный ($n = 10$), местно-распространенный ($n = 10$) и метастатический ($n = 14$) РЦЖ.

Методология

1. Выделение экзосом из плазмы методом ультрацентрифугирования [18]. Выделение тотальной РНК с использованием spin-колонок производства компании БиоСилика (Россия, г. Новосибирск).

2. Профайлинг микроРНК с помощью ОТ-ПЦР-наборов (Cancer Focus microRNA (miRNA) PCR Panels) производства компании Qiagen (Дания).

3. Анализ «маркерных» микроРНК с помощью ОТ-ПЦР-систем, разработанных и предоставленных для тестирования в рамках программы сотрудничества компанией Вектор-Бест (Россия, г. Новосибирск).

Результаты

Для нескольких микроРНК показано снижение уровня экспрессии в экзосомах пациентов с папиллярным РЦЖ до и после операции (рис. 2, выделено зеленым). Пример такого снижения уровня экзосомальной фракции микроРНК-126 (miR-126-3p) представлен на рис. 3. Для представления изменений различной интенсивности использована логарифмическая шкала (Ln), на рис. 3 также обозначена кратность снижения концентрации микроРНК-126 после операции.

Описанные результаты были получены с помощью реакции так называемой «универсальной ОТ», которая предполагает одновременное и равновероятное транскрибирование всех молекул микроРНК, присутствующих в исследуемом образце. Такой подход оптимален в случае параллельного анализа многих микроРНК в ограниченном количестве материала (скрининг). Чувствительность анализа может быть повышена путем проведения микроРНК-специфичной ОТ, но такой метод может быть использован для исследования ограниченного количества молекул микроРНК (валидация). Первый этап данного исследования был проведен с помощью универсальной ОТ и ПЦР в режиме реального времени с использованием реагентов компании Qiagen (Дания). Для 2-го этапа был выбран метод микроРНК-специфичной ОТ-ПЦР. Дизайн олигонуклеотидов и подбор условий для ОТ-ПЦР-анализа выбранных микроРНК был проведен специалистами компании Вектор-Бест (Россия, г. Новосибирск). Для нескольких образцов выполнили прямое сравнение результатов, полученных 2 разными методами. Пример, представленный на рис. 4, демонстрирует различие абсолютных значений, но схожие соотношения уровней экспрессии нескольких микроРНК. Причем некоторые микроРНК детектировались только методом микроРНК-специфичной ОТ-ПЦР, что подтверждает его более высокую чувствительность. Наблюдаемая

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	let-7a-5p	let-7b-5p	let-7c	let-7d-5p	UniSp2C	UniSp3 IPCC	let-7g-5p	let-7i-5p	1	100-5p	let-7f-5p	101-3p
B	103a-3p	106a-5p	106b-5p	107	UniSp4C	UniSp6 CPC	125b-5p	126-3p	130a-3p	132-3p	10b-5p	133a
C	141-3p	143-3p	145-5p	146a-5p	UniSp5C	UniSp3 IPCC	150-5p	155-5p	15a-5p	15b-5p	149-3p	16-5p
D	17-5p	181a-5p	181b-5p	182-5p	39-3pC	UniSp3 IPCC	186-5p	18a-5p	191-5p	192-5p	148a-3p	194-5p
E	195-5p	196a-5p	19a-3p	19b-3p	200a-3p	200b-3p	200c-3p	202-3p	10a-5p	205-5p	206	20a-5p
F	20b-5p	21-5p	210	214-3p	215	SNORD3 8B	22-3p	221-3p	222-3p	223-3p	U6 snRNA	23a-3p
G	23b-3p	24-3p	25-3p	26a-5p	26b-5p	27a-3p	27b-3p	29a-3p	29b-3p	29c-3p	30b-5p	30c-5p
H	30d-5p	31-5p	34a-5p	SNORD4 9A	423-5p	7-5p	9-5p	let-7e-5p	92b-3p	93-5p	99a-5p	Blank (H2O)

Рис. 2. Дизайн 96-луночного планшета «Cancer Focus microRNA PCR Panel» (Exiqon) и микроРНК, количество которых в экзосомах плазмы снизилось после операции

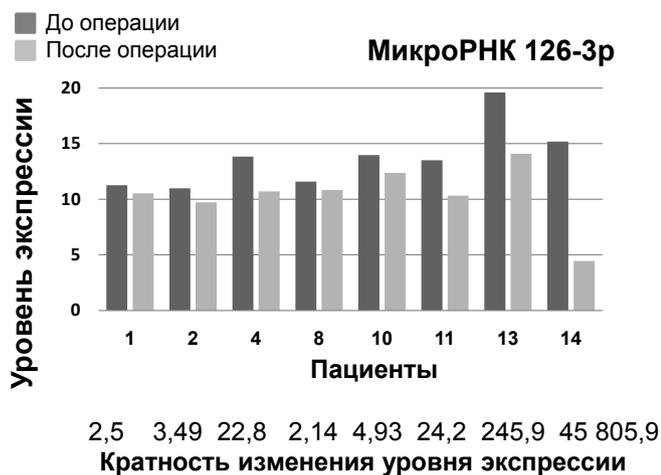


Рис. 3. Пример изменения уровня экспрессии микроРНК 126-3p в экзосомах 8 пациентов с папиллярным РЩЖ до и после операции. Для демонстрации изменений большой амплитуды использована логарифмическая шкала (LN)

воспроизводимость результатов была признана удовлетворительной, и 2-й этап работы был проведен с помощью только микроРНК-специфичной ОТ-ПЦР.

Количественный анализ 14 выбранных потенциально маркерных молекул был проведен в образцах, полученных от пациентов с различными стадиями папиллярного РЩЖ, фолликулярным РЩЖ и доброкачественными узловыми образованиями. Так, сравнение групп пациентов с различными стадиями папиллярного РЩЖ не выявило закономерных изменений концентрации ни одной из 14 анализируемых ми-

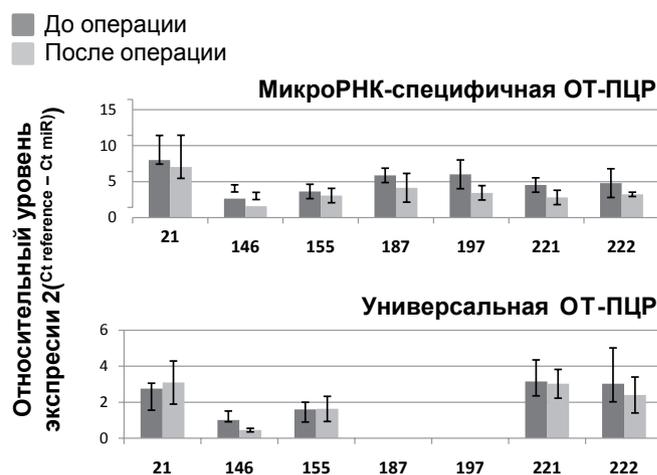


Рис. 4. Сравнение методов анализа: концентрация 7 молекул микроРНК была оценена в образцах, полученных от пациента до и после тиреоэктоми. Показаны усредненные результаты 3 измерений и стандартные отклонения

кроРНК. Сравнение пациентов с папиллярным РЩЖ и аденомой показало статистически значимое повышение концентрации микроРНК-31 в экзосомальной фракции циркулирующих микроРНК (рис. 5). Фолликулярный РЩЖ отличается от аденомы повышенным уровнем микроРНК-21 (см. рис. 5). Наиболее интересные результаты получены при сравнении пациентов с различными вариантами высокодифференцированного РЩЖ. Так, при прямом сравнении концентрация микроРНК-21 статистически достоверно выше у пациентов с фолликулярным РЩЖ, а микроРНК-181a –

у больных папиллярным РЩЖ. Такой реципрокный характер представленности 2 микроРНК в экзосомах плазмы пациентов с различными формами РЩЖ может определить возможность их непосредственного сравнения в 1 образце и получения клинически значимой информации.

Дальнейшие исследования, основанные на материале большего числа пациентов, необходимы для валидации полученных результатов и создания новых тест-систем для дифференциальной диагностики РЩЖ.

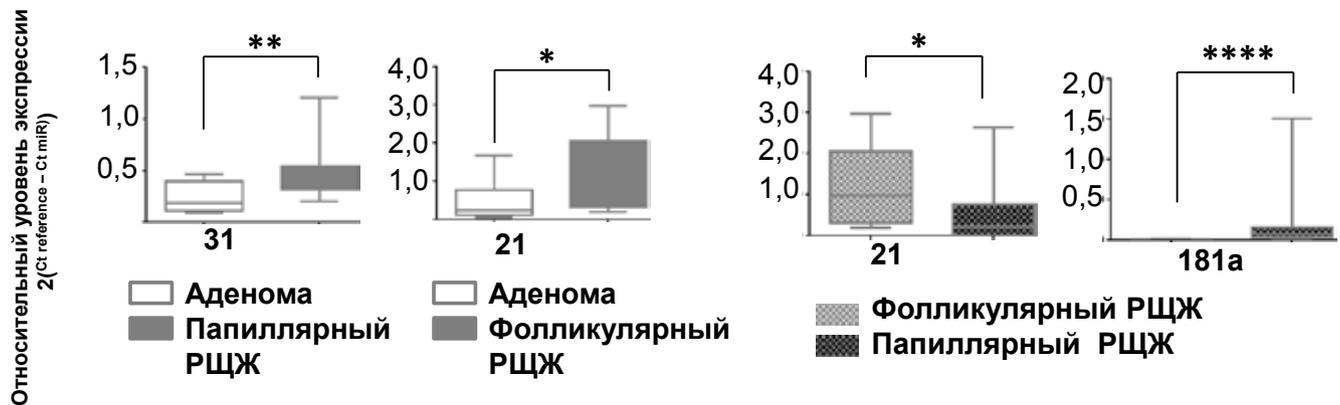


Рис. 5. Различия в концентрации экзосомальной микроРНК в плазме пациентов с различными вариантами узловых заболеваний щитовидной железы. Статистическая значимость оценена с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$; **** $p > 0,00005$

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gharib H., Papina E., Paschke R. et al. American Association of Clinical Endocrinologists and Associazione Medici Endocrinologi medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules. *Endocr Pract* 2006;12(1):63–102.
- Kato M.A., Fahey T.J. 3rd. Molecular markers in thyroid cancer diagnostics. *Surg Clin North Am* 2009;89(5):1139–55.
- Wang C.C., Friedman L., Kennedy G.C. et al. A large multicenter correlation study of thyroid nodule cytopathology and histopathology. *Thyroid* 2011;21(3):243–51.
- Mehanna H.M., Jain A., Morton R.P. et al. Investigating the thyroid nodule. *BMJ* 2009;338:b733.
- Keutgen X.M., Filicori F., Crowley M.J. et al. A panel of four miRNAs accurately differentiates malignant from benign indeterminate thyroid lesions on fine needle aspiration. *Clin Cancer Res* 2012;18(7):2032–8.
- Zhang Y., Zhong Q., Chen X. et al. Diagnostic value of microRNAs in discriminating malignant thyroid nodules from benign ones on fine-needle aspiration samples. *Tumour Biol* 2014;35(9):9343–53.
- Колесников Н.Н., Титов С.Е., Веряскина Ю.А. МикроРНК, эволюция и рак. *Цитология* 2013;55(3):159–64. [Kolesnikov N.N., Titov S.E., Ver'yaskina Yu.A. MicroRNAs, evolutions and cancer. *Tsitologiya = Cytology* 2013;55(3):159–64. (In Russ.)].
- Nikiforova M.N., Tseng G.C., Steward D. et al. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(5):1600–8.
- Guzman N., Agarwal K., Asthagiri D. et al. Breast Cancer-Specific miR Signature Unique to Extracellular Vesicles Includes “microRNA-like” tRNA Fragments. *Mol Cancer Res* 2015;13(5):891–901.
- Fong M.Y., Zhou W., Liu L. et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat Cell Biol* 2015;17(2):183–94.
- Singh R., Pochampally R., Watabe K. et al. Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer. *Mol Cancer* 2014;13:256.
- Cereghetti D.M., Lee P.P. Tumor-Derived Exosomes Contain microRNAs with Immunological Function: Implications for a Novel Immunosuppression Mechanism. *Microna* 2014;2(3):194–204.
- Wei Y., Lai X., Yu S. et al. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2014;147(2):423–31.
- Huang X., Yuan T., Liang M. et al. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 2015;67(1):33–41.
- Kim J., Morley S., Le M. et al. Enhanced shedding of extracellular vesicles from amoeboid prostate cancer cells: potential effects on the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 2014;15(4):409–18.
- Ogata-Kawata H., Izumiya M., Kurioka D. et al. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS One* 2014;9(4):e92921.
- 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.
- Shtam T.A., Kovalev R.A., Varfolomeeva E.Y. et al. Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells *in vitro*. *Cell Commun Signal* 2013;11:88.